

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral und Kinderchirurgie des
Universitätsklinikums Düsseldorf.

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Charakterisierung der Interaktion von Thrombozyten und
CD133-positiven Knochenmark-Stammzellen sowie deren Rolle
im Rahmen der Leberregeneration unter besonderer
Berücksichtigung der Ecto-ADPase CD39**

Dissertation

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

vorgelegt von

Arlette Ngepi Ngwewe

Düsseldorf

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jan Schulte am Esch

Zeitgutachter: Prof. Dr. Michael Sabel

Für Ella Océane

Eigene Publikation

Duhme, C., Lehwald, N., Kehrel, B.E., Bauchrowitz, E., **Ngepi, A.**, Schmelzle, M., Kolokotronis, T., Benhidjeb, T., Krüger, M., Jurk, K., Knoefel, W.T., Robson, S.C., Schulte Am Esch, J. *CD133⁺ bone marrow stem cells (BMSC) control platelet activation - Role of ectoNTPDase-1 (CD39)*. Blood Cells Mol Dis, 2019. **77**: 142-8.

Zusammenfassung

Einleitung und Ziele

Laut klinischen Studien spielen *Cluster of differentiation*-(CD)-133-positive-Knochenmarksstammzellen (KMSZ) eine essenzielle Rolle bei der Leberregeneration im Rahmen von Leberteilresektionen. Vermutlich ist in diesem Kontext die Interaktion zwischen CD133⁺KMSZ und Thrombozyten von entscheidender Bedeutung. Adenosindiphosphat (ADP) ist ein wesentlicher Bestandteil der Thrombozyten-Aggregation, somit beruht der hemmende Effekt der Thrombozytenaggregation möglicherweise auf dem Abbau von ADP durch die auf der Oberfläche von CD133⁺KMSZ exprimierte Ecto-ADPase -CD39. Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Analyse des potenziell hemmenden Einflusses von CD133⁺KMSZ auf die ADP-induzierte Thrombozyten-Aggregation.

Methodik

Für die Untersuchung wurden CD133⁺KMSZ aus humanen Knochenmark-Aspiraten gewonnen und durch *Magnetic activated cell sorting* (MACS) aufgereinigt. Vollblut wird aus Venenpunktion vom gleichen Spender entnommen. Die Thrombozyten-Suspensionen lassen sich mittels Zentrifugation aus dem Vollblut herstellen. Die Thrombozyten-Aggregation wurde mit der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch die grafische Darstellung der prozentualen Inhibition der ADP-induzierten Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ. Als Kontrolle wurde eine weitere Versuchsreihe mit Fibroblasten anstelle der CD133⁺KMSZ durchgeführt. Weiter wurde die Inhibition der Thrombozyten-Aggregation durch *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) analysiert.

Ergebnisse

Die LTA zeigte eine signifikante Inhibition der ADP-induzierten Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ ($t(46) = -9,4$, $p < 0,001$) im Vergleich zu den Ansätzen mit Fibroblasten. In der FACS-Analyse bestätigte sich dieser Effekt der CD133⁺KMSZ ($t(45) = 1,93$, $p < 0,06$).

Schlussfolgerung

Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass CD133⁺KMSZ Thrombozyten in Ihrer Aggregabilität kontrollieren. Derart könnte ein Mechanismus aufgezeigt sein, der es CD133⁺KMSZ in zu regenerierenden Organen, wie der Leber ermöglicht, Thrombozyten und deren Interaktionspotential mit Endothel zum Homing zu nutzen, ohne dass eine

überschießende, ADP-abhängige und kontraproduktive Thrombosierung lokal ausgelöst wird.

Summary

Background and Aims

Clinical studies were able to demonstrate that CD133-positive (+) bone marrow stem cells (BMSC) play an essential role in liver regeneration after partial liver resection. It is postulated that the interaction between CD133⁺BMSC and platelets is a crucial process. Since ADP is an essential component of platelet aggregation, a connection between the modification of adenosinediphosphate (ADP) by CD133⁺BMSC can be assumed. The goal of this work is to investigate the potential inhibitory properties of CD133⁺BMSC on ADP-induced platelet aggregation.

Methods

To investigate this thesis, CD133⁺BMSC are obtained from human bone marrow aspirates and then sorted out by magnetic cell sorting (MACS). Blood is taken from the same donor. The thrombocyte suspensions are prepared by centrifugation of the previously obtained peripheral blood. The thrombocyte aggregation measurements are then carried out according to the Born light transmission aggregometry (LTA). The evaluation is carried out by graphical representation of the percentage inhibition of thrombocyte aggregation by CD133⁺BMSC. In another test series, a comparison is made with fibroblasts as control cells. Similarly, the inhibition of thrombocyte aggregation is analyzed in a flow cytometric method – the Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).

Results

In the Born experiment, there was a significant reduction in amplitude in the trials with CD133⁺BMSC compared to fibroblasts ($t(46) = -9.4$, $p < 0.001$). In the FACS experiment, the addition of CD133⁺BMSC showed a significant reduction in inhibition (%): $t(45)=1.93$, $p < 0.06$, thus confirming the postulated hypotheses of platelet aggregation inhibition by CD133⁺BMSC.

Discussion

The Data of this work suggest that CD133⁺BMSC control platelet aggregability. A mechanism that allows CD133⁺BMSC in regenerative organs such as the liver could be demonstrated. The Mobilised BMSC take advantage of platelets and their interaction potential with the vascular endothelium of the damaged liver tissue for Homing purposes without triggering excessive, local ADP-dependent counterproductive thrombosis.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMSC	<i>Bone marrow stem cell</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLRV	Future Liver Remnant Volume
GP	Glykoprotein (Membranglykoproteine der Thrombozyten)
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
IL	Interleukin
KMSZ	Knochenmark-Stammzelle
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PRP	<i>Platelet-rich plasma</i>
PPP	<i>Platelet-poor plasma</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Widmung	
Eigene Publikation	
Zusammenfassung.....	I
Summary.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Klinische Grundlagen	1
1.2 Die Leber.....	3
1.2.1 Makro-Anatomie.....	3
1.2.2 Mikroanatomie der Leber	5
1.2.3 Leberfunktion	5
1.2.4 Regenerationsfähigkeit der Leber	5
1.3 Die Rolle von Stammzellen für die Leberregeneration	6
1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen.....	7
1.3.2 Lebergeneration durch Knochenmark-Stammzellen.....	10
1.4 Thrombozyten	11
1.5 Hämostase	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material und Methodik.....	14
2.1 Materialien.....	14
2.2 Patient*innenkollektiv	16
2.3 Verwendete Methoden	16
2.3.1 Stammzellpunktion.....	17
2.3.2 Isolierung von CD133 ⁺ -Stammzellen aus menschlichem Knochenmark.....	17
2.3.3 Thrombozyten-Aufreinigung.....	19
2.3.4 Fibroblasten-Kultur.....	20
2.3.5 Adenosindiphosphat (ADP) Herstellung	21
2.3.6 Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born	21
2.3.7 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS).....	26
2.3.8 Statistische Auswertung	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Lichttransmissionsaggregometrie-(LTA)-Versuche	30
3.1.1	Amplitude nach Co-Inkubation mit ADP/CD133 ⁺ KMSZ vs. ADP	30
3.1.2	Amplitudenänderung nach Co-Inkubation mit ADP/Fibroblasten vs. ADP 31	
3.1.3	Vergleich der Amplitudenänderung nach Co-Inkubation mit CD133 ⁺ KMSZ/ADP und Fibroblasten /ADP	32
3.2	Vergleich Amplitude Cd133, ADP, Fibroblasten	33
3.2.1	Korrelation zwischen den eingesetzten CD133 ⁺ KMSZ-Zahlen und dem Ausmaß der Amplitudenänderung	33
3.2.2	Korrelation zwischen den eingesetzten Fibroblasten-Zahlen und dem Ausmaß der Amplitudenänderung	34
3.3	FACS-Versuche	34
3.3.1	Korrelation zwischen ADP-Konzentration und Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation	35
3.3.2	Inhibierung in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration bei Zugabe von 100,000 CD133 ⁺ -Zellen	36
3.3.3	Inhibierung in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration bei Zugabe von 100,000 Fibroblasten	37
4	Diskussion	38
4.1	Einfluss von ADP auf die Thrombozyten-Aggregation	39
4.2	Effekt der ADP-Konzentration	40
4.3	Einfluss der CD133 ⁺ KMSZ auf die Thrombozyten-Aggregation	40
4.4	Effekt der CD133 ⁺ KMSZ-Zellzahl	42
4.5	Einfluss der CD39/NTPDase auf die die Thrombozyten-Aggregation	42
4.6	Unterschied zwischen CD133 ⁺ KMSZ und Fibroblasten	43
4.7	Einfluss der Herkunft der Stammzellen	44
4.8	Limitationen	45
4.9	Schlussfolgerung	46
	Bibliografie	47
	Abbildungsverzeichnis	56
	Tabellenverzeichnis	57
	Anhang	58
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlagen

Lebereigene Tumore und Metastasen stellen eine häufige Indikation für eine Leberteilresektion dar. Tumoröse Läsionen der Leber werden in primäre und sekundäre (Metastasen) Läsionen unterteilt; primäre Läsionen werden weiter in Entitäten mit hepatozellulärem und nicht-hepatozellulärem Ursprung untergliedert (Vyas & Jain, 2018). Bei Erwachsenen macht das hepatozelluläre Karzinom den größten Anteil der lebereigenen Tumore aus (ca. 80 %). Bei den sekundären Lebertumoren spielen kolorektale Metastasen eine herausragende Rolle.

Nach Angaben der aktualisierten deutschen S3-Leitlinie vom Juni 2021 zur „Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und der biliären Karzinome“ sollte unter Berücksichtigung operativer, lokalablativer und systemtherapeutischer Möglichkeiten eine komplette Resektion des Tumors (R0) angestrebt werden. Obwohl eine R0-Resektion prädictiv von enormer Bedeutung ist, ist sie aufgrund prognostisch wichtiger unterschiedlicher Faktoren nicht in allen Fällen möglich.

Inoperabilität kann aufgrund verschiedener Faktoren vorliegen. Technisch-operative Einschränkungen ergeben sich bei mangelnder funktioneller Leberreserve. Als onkologische Gründe für eine Inoperabilität kommen Größe, Lokalisation und die Anzahl der Tumoren sowie die Infiltration aller drei Lebervenen (Dasari et al., 2000) in Betracht.

Die Operabilität ist von der Ausdehnung der notwendigen Leberresektion, dem Stadium der Erkrankung (Okazaki et al., 1985) und von Komorbiditäten des Patienten beispielsweise Diabetes, Alter, fortgesetztem Alkoholkonsum, erniedrigter Thrombozytenzahl sowie einer vorbestehenden Leberzirrhose (Omata et al., 2017) abhängig.

Die S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom vom Januar 2019 empfiehlt bei Lebermetastasen eine Leberteilresektion unter Berücksichtigung möglicher neoadjuvanter Therapiemodalitäten. Zur Erzielung einer Tumorfreiheit ist häufig eine ausgedehnte Leberteilresektion notwendig. Das Ausmaß der Resektion ist jedoch aufgrund einer erhöhten postoperativen Morbidität bei Leberdysfunktionen und Infektionen bei mangelnden funktionellen Reserven der Leber oft eingeschränkt.

Bei erweiterten Leberresektionen von mehr als fünf Segmenten sollte präoperativ eine Restfunktion der Leber gesichert werden, um die postoperative Mortalität und Morbidität zu reduzieren (Brancatisano et al., 1998). Hierzu gehört die Evaluation des verbleibenden Leberanteils (*future liver remnant volume; FLRV*), da dessen Ausmaße in Relation zum Körpergewicht bzw. zum Lebergesamtvolumen minus Tumolvolumen prognostisch

relevant ist (Pagano & Gruttadauria, 2014; Schneider, 2004). Das FLRV soll mindestens 0,5 % des Körpergewichts (Schindl et al., 2005) oder 25 % des initialen Lebervolumens betragen (Truant et al., 2007).

Zu den etablierten Methoden zur Präkonditionierung des FLRV zu dessen präoperativer Volumensteigerung bzw. zur Minimierung einer postoperativen Leberinsuffizienz gehört die Durchführung einer portalvenösen Embolisation vor der Leberresektion (Narula & Aloia, 2017). Der portalvenöse Verschluss der zur Resektion geplanten Leberanteile führt zu einer Atrophie der reduziert perfundierten Parenchymanteile mit einer kompensatorischen Hyperperfusion und nachfolgender Hypertrophie der verbleibenden noch voll perfundierten Gegenseite (Abulkhir et al., 2008). Weitere Methoden zur perioperativen Steigerung der des FLRV sind neben der Portalvenen-Embolisation (PVE) die Portalvenen-Ligatur (PVL) und die Zweiphasen-Leberresektion (Treska, 2016). Bis zum Erreichen des erwünschten zukünftigen Volumens können bis zu 150 Tage vergehen (Broering et al., 2002). Aufgrund derartig langer Zeitintervalle, um eine adäquate Steigerung des FLRV zu erreichen, besteht das Risiko eines relevanten, zur Inoperabilität führenden Tumorwachstums. Um diesem Risiko zu begegnen, müssen neue effektivere Methoden entwickelt werden. Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

Klinische Studien legen die fördernde Wirkung von Cluster of differentiation 133-positiven (CD133⁺) Knochenmark-Stammzellen (KMSZ) auf die hepatische Proliferation bei einer Leberteilektomie nahe (Schulte am Esch et al., 2005). Die intraoperative Verabreichung von autologen CD133⁺KMSZ nach einer PVE beschleunigt die Regeneration des Restlebergewebes nach einer Hepatektomie bei Patienten mit malignen Leberläsionen im Vergleich zu Therapieregimes mit PVE ohne KMSZ-Applikation (Schulte am Esch et al., 2012).

Nach einer Leberschädigung lässt sich häufig eine Neubesiedlung von Lebersinusoiden mit Knochenmark-Endothelial-Progenitor-Zellen (Harb et al., 2009) detektieren. Die Zellen produzieren Hepatozyten-Wachstumsfaktoren, die im Gegenzug die Rekrutierung weiterer Stammzellen fördern. In diesem Kontext spielt die Ecto-ADPase durch die Hydrolyse von Adenosindiphosphat (ADP) eine wesentliche Rolle bei der Steuerung anti-inflammatorischer Vorgänge sowie bei der Rekrutierung weiterer pluripotenter KMSZ (Robson et al., 2006).

Ein wichtiger Beitrag der Ecto-ADPase bei der Vaskularisierung und Thrombogenese ist die Regulation der Interaktion zwischen Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten durch purinerge Prozesse (Robson et al., 2005). Zur Gewährleistung der Perfusion und

Vaskularisation muss die Thrombozyten-Aggregation gehemmt und die Fibrinolyse gefördert werden.

1.2 Die Leber

1.2.1 Makro-Anatomie

Die Leber ist das zentrale und größte Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Sie befindet sich im oberen rechten Quadranten des Abdomens unterhalb des Diaphragmas, wo sie durch das *Ligamentum falciforme hepatis* in einen großen rechten und einen kleineren links-lateralen Lappen unterteilt wird (siehe Abb. 1, oben). Anatomisch lassen sich mit dem *Lobus hepatis dexter*, *Lobus hepatis sinister*, *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus* vier Lappen unterscheiden (Bismuth, 1982). Klinisch relevant ist insbesondere die funktionelle Einteilung der Leber anhand der Blutgefäße und Gallengänge in acht Segmente nach Couinaud (siehe Abb. 1, unten) (Couinaud, 1989; Fasel, 2017). Die Leberlappen werden mikroanatomisch in Lobuli unterteilt, die u.a. aus Hepatozyten bestehen (siehe 1.2.2).

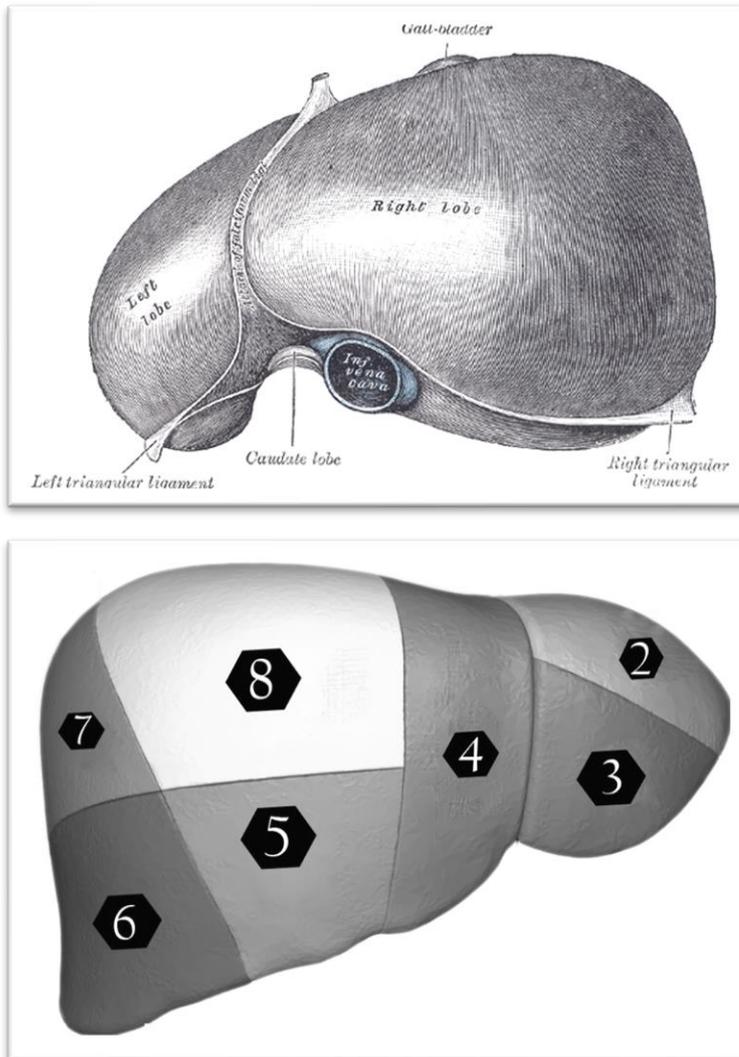


Abb. 1: Darstellung der linken und rechten Leberlappen, getrennt durch das Ligamentum falciforme (oben, Gray, 1918; lizenziert unter gemeinfrei über Wikimedia Commons); Einteilung der Leber nach Couinaud (unten, eigene Darstellung)

Über die Leberpforte (*Porta hepatis*) an der Unterseite der Leber treten Blutgefäße in die Leber ein und der Gallengang (*Ductus hepaticus*), Lymphgefäße und Nerven aus. Die Blutversorgung der Leber erfolgt über die Pfortader (*Vena portae*) und Leberarterien. Bei der Blutversorgung der Leber werden Gefäße, die die Eigenversorgung der Leber gewährleisten (*Vasa privata*), und Blutgefäße, die das Pfortader-System bilden (*Vasa publica*) unterschieden. Die *Arteria hepatica propria*, die die Leber eigenständig versorgt, entspringt aus dem *Truncus coeliacus* und teilt sich in die *Arteria hepatica dextra* und *Arteria hepatica sinistra* auf. Der venöse Abfluss erfolgt über die drei Hauptvenen *Vena hepatica dextra*, *Vena hepatica sinistra* und *Vena hepatica media*. Die drei Hauptvenen mündet in die *Vena cava inferior* ein (Schünke et al., 2015; Rassow et al., 2016).

1.2.2 Mikroanatomie der Leber

Das Parenchym ist aus Leberläppchen aufgebaut. Neben den Hepatozyten, die den Hauptanteil der Zellen ausmachen und die für die Stoffwechselfunktionen der Leber verantwortlich sind, kommen Ito-Zellen, Kupffer-Zellen sowie leberspezifische Makrophagen vor. Ein Leberläppchen hat die Form einer sechseckigen Säule. Zwischen mehreren Leberläppchen befindet sich ein periportales Feld, in dem die Gefäße der Glisson-Trias verlaufen. Die Glisson-Trias besteht aus der *Arteria interlobularis*, einem Ast der *Arteria hepatica propria*, dem interlobulären Gallengang und der *Vena interlobularis*, einem Ast der Pfortader. Die Hepatozyten sind in den Leberläppchen radiär um eine Zentralvene angeordnet. Die Hepatozyten werden speichenförmig von erweiterten Kapillarräumen (Lebersinusoide) durchgezogen, die in die Zentralvene münden. Die Lebersinusoide erhalten Mischblut aus der *Vena portae hepatis* und der *Arteria hepatica propria* und besitzen ein diskontinuierliches Endothel, über das eine Diffusion von Plasmabestandteilen aus dem Blut zu den Hepatozyten erfolgt (Wisse et al., 1985). Die Aufnahme der Stoffe erfolgt in dem perisinusoidalen Raum (Disse-Raum).

1.2.3 Leberfunktion

Die Leber ist mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1.500 g die größte Drüse des menschlichen Körpers. Sie erfüllt synthetische, exokrine, metabolische sowie regulierende Funktionen. Hepatozyten (Parenchymzellen) metabolisieren Medikamente sowie Hormone, synthetisieren lebenswichtige Proteine sowie Lipide und besitzen zusätzlich eine Speicher- und Entgiftungsfunktion. Die Phagozytose von Fremdkörpern wird von Kupffer-Zellen übernommen. Pit-Zellen (*Natural Killer-Zellen*) und Ito-Zellen sind leberspezifische Zellen, die sich an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligen, in dem sie Kollagen Typ 3 synthetisieren (Lüllman-Rauch, 2019). Die Leber spielt eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel. Sie verarbeitet und speichert über den Darm aufgenommene Nährstoffe. Dazu gehören Glukose in Form von Glykogen, fettlösliche Vitamine sowie Mikroelemente wie Kupfer und Eisen. Zudem ist die Leber an der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt (Schmidt-Lang-Thews).

1.2.4 Regenerationsfähigkeit der Leber

Die Leber besitzt ein außergewöhnliches hohes Regenerationspotenzial; ein Gewebeverlust kann innerhalb kürzester Zeit ausgeglichen werden. Bei der Leberregeneration spielen multiple Faktoren eine Rolle. Unter anderem beeinflussen Zytokine, Wachstumsfaktoren und metabolische Faktoren die Leberregenerationsfähigkeit (Fausto et al., 2006). Ausgereifte Leberzellen befinden sich hauptsächlich in der Ruhephase (G_0 -Phase). Eine Proliferation von Hepatozyten dient vor allem der Geweberegeneration

nach einer Gewebeschädigung, wie einer partiellen Hepatektomie. Der Regenerationsvorgang beinhaltet zwei Schritte, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden (Fausto et al., 1995; Fausto et al., 2006). Im ersten Schritt erfolgt das *Priming*, bei dem die Sensibilisierung der Hepatozyten für Wachstumsstimuli stattfindet (Fausto, 2000). Die Hauptstimulatoren sind der *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) und *Interleukin-6* (IL-6). Laut Yamada et al. (1997) erfolgt die Initiation der Leberregeneration durch TNF- α über die Aktivierung von IL-6-abhängigen Signalwegen. Im zweiten Schritt werden die Hepatozyten von der G₀-Phase in die Proliferationsphase G₁ überführt. Diese kritische Phase wird durch Wachstumsfaktoren wie den *Epidermal growth factor* (EGF), den *Hepatocyte growth factor* (HGF) und den *Transforming growth factor-alpha* (TGF- α) gesteuert (Michalopoulos, 1990). Durch diese Regenerationsprozesse kommt es unter optimalen Bedingungen innerhalb von 7–10 Tagen zu einer vollständigen Wiederherstellung des Lebergewebes.

1.3 Die Rolle von Stammzellen für die Leberregeneration

Bei Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte oder geringfügig differenzierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern (*self-renewal*) und sich in unterschiedliche Gewebstypen auszudifferenzieren (Morrison et al., 1997). Aus mitotischen Zellteilungen können weitere Stammzellen (embryonale Stammzellen) oder spezialisierte Zellen hervorgehen (adulte Stammzellen) (Jahagirdar & Verfaillie, 2005). Stammzellen werden anhand des onkogenetischen Alters und Differenzierungspotenzials klassifiziert.

Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen sich in allen Zellarten zu differenzieren, werden als totipotent bezeichnet. Solche Stammzellen kommen lediglich in der frühen embryonalen Phase von der befruchteten Eizelle bis zum Achtzellstadium vor. Ab dem Blastozysten-Stadium werden embryonale Stammstellen als pluripotent bezeichnet. Pluripotente Stammzellen können sich je nach biologischem Milieu zu Tochterzellen differenzieren, die die Teilungsfähigkeit der Ursprungszellen nicht mehr besitzen (Progenitorzellen), oder sie differenzieren sich weiter in primitive Keimstammzellen und somatische Stammzellen. Embryonale Stammzellen kommen nur im frühen Embryo vor, nach der Geburt spricht man von adulten Stammzellen. Adulte Stammzellen haben ein eingeschränkteres Differenzierungspotenzial als embryonale Stammzellen. Bei adulten Stammzellen werden hämatopoetische, mesenchymale und endotheliale Stammzellen unterschieden (Lüllmann-Rauch, 2006), sie befinden sich u. a im Knochenmark, in der Nabelschnur, in der Haut sowie im Pankreas.

Die Leber besitzt als einziges Organ die Fähigkeit, sich durch ein vermehrtes Wachstum der Hepatozyten selbst zu regenerieren (Michalopoulos, 2010). Kommt es aufgrund einer Einschränkung der Hepatozytenproliferation infolge einer Leberschädigung, wie beispielsweise einer partiellen Hepatektomie oder toxischen Schäden, werden intrahepatischen Progenitorzellen zusätzlich aktiviert (Fausto, 2003). Diese Zellpopulation befindet sich im Ruhezustand in einem Bereich, den sogenannten Hering Kanälen, die das Endsegment des Gallengangsystems mit parenchymalen Hepatozyten verbinden (Saxena et al., 1999). Diese Zellpopulation wird auch als *hepatic stem/progenitor cells (HpSCs)* bezeichnet (Caprino et al., 2016).

Die intrahepatischen Progenitorzellen werden aufgrund ihrer anatomischen Differenzen im humanen System als *liver progenitor cells* und im murinen System als *oval cells* bezeichnet (Roskams et al., 2004). Diese bipotente Stammzellpopulation ist in der Lage, sich in Hepatozyten, Darmeepithelzellen, Gallenzellen und Azinuszellen des Pankreas zu differenzieren. Die Differenzierung ist von Wachstumsfaktoren und direkten Wechselwirkungen mit der Extrazellulären Matrix abhängig (Vestentoft, 2013). Die Auswirkung der HpSCs auf die Leberregeneration ist nicht abschließend geklärt und wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

Die Hämatopoese findet bei erwachsenen Personen in der Milz, im Thymus sowie im Knochenmark statt. Der Hauptproduktionsort der Blutzellen ist im postnatalen Alter das Knochenmark. Die Hämatopoese wird hormonell gesteuert und reguliert. Das blutbildende, rote Knochenmark befindet sich in den Epiphysen der Röhrenknochen sowie in den kurzen und flachen Knochen. Es besteht aus hämatopoetischen Zellen, die sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Aus einer Reihe multipotenter Progenitor-Stammzellen entstehen über weitere Vorstufen Zellen des myeloischen und lymphatischen blutbildenden Systems mit unterschiedlichen Funktionen (s. Abb. 2).

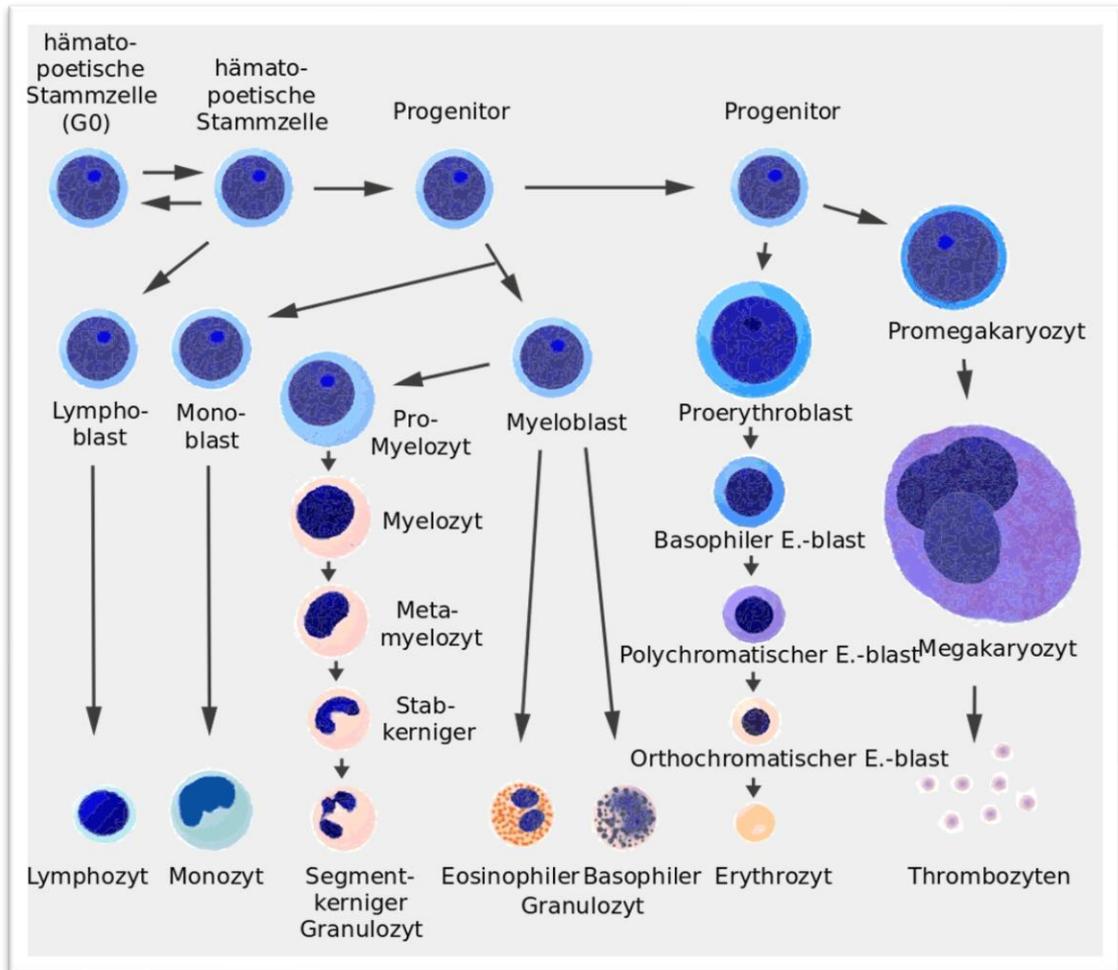


Abb. 2: Hämatopoetische Differenzierung (Quelle: Lizenziert unter gemeinfrei über Wikimedia Commons). Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell der hämatopoetischen Differenzierung.

Stamm- und Vorläuferzellen lassen sich anhand von immunphänotypischen Oberflächenmolekülen differenzieren. Diese spezifischen membrangebundenen Glykoproteine werden als *Cluster of Differentiation* (CD) bezeichnet, die sich mittels monoklonaler Antikörper nachweisen lassen. Für die vorliegende Arbeit werden hämatopoetische Stammzellen mit den folgenden CD-Merkmalen untersucht.

CD34

Civin et al. und Tindel et al. beschrieben 1981 unabhängig voneinander erstmals das Glykoprotein CD34 auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks. CD34 dient der Zell-Zell-Adhäsion und fördert die Bindung der hämatopoetischen Stammzellen an die extrazelluläre Matrix im Knochenmark.

Bei schweren Leberschäden werden CD34⁺-Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert (Fuji et al., 2002). CD34-Antigene sind in unreifen hämatopoetischen Stammzellen

nachweisbar. Im Gegensatz dazu exprimieren ausgereifte adulte hämatopoetische Zellen diesen Oberflächenmarker nicht (Andrews et al., 1989; Krause et al., 1996). Weiter kommt CD34 auch auf embryonalen Fibroblasten sowie Endothelzellen vor (Brown et al., 1991). Damit ist CD34 nicht spezifisch für hämatopoetische Stammzellen.

CD39

CD39 (Ectonucleoside triphosphat diphosphohydrolase-1 (Gen: ENTPD1; Protein: NTPDase1)) ist eine von Endothelzellen, Monozyten und glatten Muskelzellen exprimierte Ectonucleotidase. Die Hauptfunktion von CD39 ist die Hydrolyse von Nucleosid-Triphosphaten (z. B. Adenosintriphosphat (ATP)) zu Nucleosid-Diphosphaten (z. B. ADP) und Nucleosid-Monophosphaten (z. B. Adenosinmonophosphat (AMP)) (Robson et al., 2006).

ADP und ATP binden an purinerge Rezeptoren (P2-Rezeptoren) auf der Oberfläche von Zellen und steuern so verschiedene Zellfunktionen (Rassow et al., 2016). CD39 moduliert die durch extrazelluläre Nucleotide ausgelöste P2-Rezeptor vermittelte Wirkung auf Blutplättchen, Leukozyten und Endothelgewebe (Atkinson et al., 2006). Durch die Hydrolyse von ATP und ADP wird die ADP-induzierte Thrombozyten-Aggregation gehemmt. Die Expression von CD39 im Gefäßsystem steuert die Thrombozyten-Aktivierung, Thrombozyten-Stabilität und Thrombozyten-Größe.

CD45

Das CD45-Antigen (*leucocyte common antigen*) ist ein Transmembranprotein auf der Zelloberfläche von allen zellkernhaltigen Zellen der hämatopoetischen Zellreihe und Leukozyten. CD45 gehört zu der Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP). CD45 ist an der Regulation der Antigenrezeptor-vermittelten Aktivierung von B- und T-Zellen und somit an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt (Altin & Sloan, 1997). Zudem moduliert es zelluläre Funktionen wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung.

CD-133

Das CD133-Glycoprotein (Prominin-1) (Snippert et al., 2009) wurde erstmals 1997 beschrieben (Yin et al., 1997). Das Protein enthält fünf transmembranösen Domänen und besitzt ein Gewicht von 120 kDa (Miraglia et al., 1997). CD133 wird auf hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Progenitorzellen (Gehling et al., 2000) sowie neuronalen Stammzellen exprimiert.

Eine Subpopulation von Zellen, die das hämatopoetische Vorläuferzellantigen CD34 exprimieren, sind auch CD133 positiv. Diese KMSZ besitzen multipotente Differenzierungsmöglichkeiten und ein leberspezifisches Übertragungspotential (Handgretinger

et al., 2003). Die Funktion des CD133-Antigens ist weitgehend ungeklärt. Laut Studien kommt es in Patienten nach einer Leberresektion oder bei Leberschädigungen zu einer verstärkten Mobilisation von CD133⁺KMSZ (Gehling et al., 2005). Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass CD133⁺KMSZ die Leberregeneration fördern. Nach lokaler Applikation von CD133⁺KMSZ in die *Vena portae* kam es zu einer Zunahme der hepatischen Regeneration (Schulte am Esch et al., 2005).

1.3.2 Lebergeneration durch Knochenmark-Stammzellen

Laut einer These besitzen CD133⁺KMSZ eine unterstützende Funktion bei reparativen Prozessen der Leber Vorläuferzellen. Entscheidende Mechanismen sind dabei die chemotaktische Inhibition von apoptotischen Signalwegen, die Hemmung von entzündlichen Prozessen sowie die Förderung der Angiogenese und Proliferation von Leberzellen (Franchi et al., 2013). Evidenzbasierte Daten legen Effekte von KMSZ auf die Leberregeneration nahe (Schulte am Esch et al., 2005). Welche Wirkmechanismen dafür verantwortlich sind, ist aber letztendlich noch nicht vollständig geklärt.

Es werden hier unterschiedliche Mechanismen diskutiert:

Ein Mechanismus ist die Zell-Fusion (Wang et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003). Um eine Differenzierung von hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen in epithelialen hepatischen Zelllinien wie Oval Zellen, Hepatozyten und Gallengangepithel zu gewährleisten, erfolgt eine Fusion zwischen beiden Zellgruppen (Terada et al., 2002). Infolgedessen kommt es zu einer gesteigerten Zellteilung der fusionierten Zellen (Quintana et al., 2006). Veröffentlichte Daten legen jedoch nahe, dass Knochenmarkstammzellen keine signifikante physiologische Rolle beim Ersatz von Epithelzellen bei Leberschädigungen spielen (Grompe, 2003). Darüber hinaus können spontan fusionierte Knochenmarkszellen anschließend den Phänotyp der Empfängerzelle annehmen - ein Prozess, der als Dedifferenzierung oder Transdifferenzierung bezeichnet wird.

Hämatopoetische Knochenmarkstammzellen können nach einer in vivo Transplantation hepatozytenähnliche Zellen hervorbringen und die Leber vollständig neu bevölkern (Lagasse et al., 2000). Der Kontakt zwischen hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen und Hepatozyten ist ein ausreichender Stimulus um eine Differenzierung der Knochenmarkstammzellen in Hepatozytenähnliche Zellen zu bewirken (Newsome et al., 2003; Almeida-Porada et al., 2004).

Hepatozyten können sich aufgrund ihrer Entwicklungsplastizität in einem Prozess der Transdifferenzierung in gallenartige Gewebe umwandeln (Michalopoulos et al., 2005) und somit die Auflösung von cholestatischen Verletzungen fördern (Nejak-Bowen, 2020). Es wurde angenommen, dass Gallenepithelzellen Progenitorzellen beherbergen,

die zur Hepatozytenregeneration beitragen (Michalopoulos und Kahn, 2015; Falkowski et al., 2003). Forschungsarbeiten zeigen jedoch, dass Hepatozyten eher durch Selbstreplikation regeneriert werden, als dass sie von Gallenzellen in Situationen der akuten und subakuten Leberschädigungen erzeugt werden (Schaub et al., 2014).

Nach einem anderen Forschungsansatz induzieren Stammzellen die Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten durch unterstützende trophische Faktoren wie IL-6 (Aldeguer et al., 2002). Möglicherweise bestimmen epigenetische Umbauprozesse, unter anderem durch DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Chromatinumbau die Hepatozytendifferenzierung während der Leberregeneration (Macchi und Sadler, 2020). Die Transkriptionsfaktoren Klf6/Copeb wurden als mögliche regulierende Faktoren auf die Leberproliferation in Mäusen identifiziert (Yuan et al., 2015; Zhao et al., 2010).

Es wird außerdem die Hypothese vertreten, dass die Leberregeneration durch eine Neovaskularisierung mittels Angio- und Vaskulogenese unterstützt wird (Ueno et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Mechanismen und Zusammenhänge der Mobilisation und *Homing*-Prozesse von CD133⁺KMSZ und deren Interaktion mit Thrombozyten wie diese zum Beispiel im Rahmen der Leberregeneration stattfinden könnten, untersucht.

Das *Homing* von KMSZ beschreibt die Fähigkeit zirkulierender Stammzellen im peripheren Blut oder von exogen verabreichten Stammzellen eine Umweltische zu lokalisieren und in diese einzudringen. In der frühen postoperativen Phase der Leberresektion hängt das Regenerationspotenzial der Leber von den mobilisierten KMSZ ab (Lehwald et al., 2014). Ausschlaggebend für den Effekt der KMSZ auf die Leberregeneration ist die Mobilisation der Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie (Blutbahn) und ihre Anlagerung an das Gefäßendothel des geschädigten Gewebes bzw. Organs. Die *Homing*-Prozesse von KMSZ in die Leber sind streng regulierte Vorgänge, an denen intrinsische und extrinsische Faktoren beteiligt sind (Tsolaki et al., 2014). Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen KMSZ und Endothelzellen sind weitgehend ungeklärt. Vermutlich spielen Thrombozyten und von Thrombozyten stammende Faktoren eine Rolle.

1.4 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Zellpartikel mit einer Größe von 2–5 µm. Während der Thrombopoese werden sie aus Megakaryozyten abgespalten und in die Blutzirkulation freigesetzt (siehe Abb. 2). Im Blut adulter Menschen beträgt die Thrombozyten-Zahl 100.000–300.000/µl. Die durchschnittliche Lebensdauer von Thrombozyten liegt bei 8–

12 Tage. Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist die primäre Hämostase. Thrombozyten sind darüber hinaus auch an immunologischen, entzündlichen, angiogenetischen (Patzelt & Langer 2012) und malignen Prozessen beteiligt (McNicol & Israels, 2008). Bei einer Aktivierung von Thrombozyten kommt es über eine Expression multipler Membranrezeptoren zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an Stellen mit Gefäßläsionen. Von Thrombozyten freigesetzte Adhäsionsproteine, Wachstumsfaktoren und Zytokine wirken sowohl auf die Hämostase als auch auf entzündliche Prozesse.

1.5 Hämostase

Die Blutstillung ist ein lebenswichtiger, aus mehreren Schritten bestehender, physiologischer Prozess, der eine Blutung zum Stillstand bringt. Die Hämostase lässt sich in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilen. Die primäre Hämostase wird auch als zelluläre Hämostase bezeichnet, da bei diesen Prozessen Thrombozyten die Hauptrolle spielen.

Durch die primäre und sekundäre Hämostase werden verletzte Gefäße wieder „abgedichtet“. Die Hämostase beinhaltet ein Zusammenspiel aus Thrombozyten, Gefäßendothel und Gerinnungsfaktoren. An der primären Hämostase sind die Blutgefäße und die Thrombozyten beteiligt. Für die Adhäsion der Thrombozyten an das Gefäßendothel sowie für die Aggregation zwischen Thrombozyten spielen Aktivatoren wie ADP, ATP, Thromboxan und Thrombin eine ausschlaggebende Rolle. Die Aktivatoren fördern über G-Protein-gekoppelte Signalwege die Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts, der die Adhäsions- und Aggregationseffekte weiter verstärkt. Dabei kommt es zu einer Veränderung der Thrombozyten-Struktur und zur Ausbildung von Pseudopodien, die mit einer Oberflächenvergrößerung einhergeht, die die Bindung an andere Thrombozyten begünstigt. An der Gefäßwand-Adhäsion der Thrombozyten ist auch der von-Willebrand-Faktor (vWF) beteiligt (Savage et al., 1998). Der vWF stellt den Kontakt zwischen Kollagen und dem Thrombozyten-spezifischen vWF-Rezeptor (Glykoprotein (GP) Ib/IX) her. Durch diese Verbindung werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die eine endgültige Aktivierung der Thrombozyten durch eine Konformationsänderung bewirken. Die weitere Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen über das GPIIb/GPIIIa führt zu einer verstärkten Thrombozyten-Aggregation und zur Bildung weiterer Aggregate (Brass et al., 1997). Die Rekrutierung und Aktivierung der Thrombozyten ist ein multifaktorieller Prozess in dem Aktivierungsfaktoren und inhibierende Faktoren involviert sind.

Am Prozess der Aktivierung sind maßgeblich Thromboxan, Kollagen oder Thrombin beteiligt. ADP löst über seine Bindung an den ADP-Rezeptor P2Y₁ verschiedene Reaktionskaskaden und *second-messenger* Wege aus (Kahner et al., 2006). Die resultierende

Thrombozyten-Konformationsänderungen und Aktivierung weiterer Oberflächen-Rezeptoren (z. B. Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa) (Jackson, 2007; Varga-Szabo et al., 2008) fördert die Fibrinogen vermittelte Vernetzung der Thrombozyten und somit eine irreversible Thrombozyten-Aggregation. Die Agonisten werden entweder aus dem Gefäßendothel oder aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt (Varga-Szabo et al., 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufbauend auf den Ergebnissen der Forschungsarbeit zur Förderung der Leberregeneration durch die Applikation von CD133⁺KMSZ nach einer Leberteilresektion (Schulte am Esch et al., 2005) untersucht diese Arbeit die Modulation der ADP-abhängigen Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ. Diese soll wichtige Rückschlüsse für bisher kaum erforschte *Homing*-Mechanismen der CD133⁺KMSZ und die Interaktion der Zellen mit Gefäßendothel ermöglichen.

Ferner könnte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des Zusammenwirkens zwischen Thrombozyten und CD133⁺KMSZ beitragen.

2 Material und Methodik

2.1 Materialien

Chemikalien und Lösungen

- Ammoniumchlorid (NH₄Cl; Zentral Apotheke Universitätsklinikum Düsseldorf)
- Adenosindiphosphat (ADP; Sigma)
- Calciumchlorid (CaCl₂, 1 mM; Merk)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma Aldrich)
- *FcR-Blocking Reagent (Fragment-crystallisable-receptor)*
- *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS)
- *Magnetic activated cell sorting* (MACS) Puffer® (Miltenyi)
- *Microbeads* (Biotec)
- Natriumchlorid (NaCl; Merck)
- *Phosphate buffered saline* (PBS; Biochrom)
- Quantum 333-Fibroblasten Medium®
- *Red Blood Cell Lysis* (Miltenyi Biotec)
- Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll®)
- Trypsin (Gibco)
- Tryptanblau (Gibco)
- Paraformaldehyd (PFA; Merck)

Alle Chemikalien und Lösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und gelagert.

Antikörper/Antiseren für die Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Analyse

- CD45-PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine7 mouse anti-human CD45; BD, Miltenyi)
- CD45-FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat *anti-human* CD34; Hölzel Diagnostika)
- CD133/2-PE (CD133/2-PE (293C3) *human antibodies*; Miltenyi)
- CD34 APC (Allophycocyanin *Mouse anti-human* CD34; BD)
- CD42a-PerCP (Mouse Anti-Human CD42a; BD, Bioscience)
- ISO-CD45-APC (Bioscience)
- ISO-CD34-APC (Biosciences)
- ISO-CD133-PE (*mouse IgG-2b-PE isotype control antibodies*; Miltenyi)
- ISO-CD39-FITC (FITC *anti-mouse* IgG1, k isotype; Biosciences)

Kits

- Kits zur Aufreinigung von CD133 (*MicroBeads Kit human*; Miltenyi)
- MACS-Separationssäulen (Miltenyi)

Verbrauchsmaterialien

- *Blood Cell Counter* (Beckmann Coulter)
- Aggregationsröhrchen (Chrono-Log-Corporation)
- Aggregationsrührmagneten (Chrono-Log-Corporation)
- Einkanal-Pipette (Eppendorf)
- Spritzen (5 ml, 10 ml, 50 ml; Braun)
- Zellkulturschalen (Greiner Bio One)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml; Ratiolab)
- Pipettenspitze (Starlab)
- Superiorzählkammer (Marienfeld)
- T75 Kulturflaschen (Greiner Bio-One)
- Falcon-Zellkulturflaschen (Cellstar)
- Zentrifugenröhrchen (Ikamag)
- Polystyrolküvetten (VWR)
- 100 µm Filter (Becton Dickinson)
- Eingefrorene Cos1/Cos7 Zellen
- Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) (Eppendorf)
- FACS-Röhrchen (BD Falcon Bioscience)
- Magnetrührer (Chrono-Log-Corporation)
- Venenkanülen (20 G; Braun)

Geräte

- Aggregometer (Chronolog-Corporation, Whole Blood Luminoaggregometer)
- Zentrifugen (Thermoscientific, Heraeus multifuge x 1 R, Hettich Universal 30RF, Eppendorf Centrifuge 5810R)
- Mikrozentrifuge (Heraeus Fresco 17)
- Blutanalysegerät (Sysmex)
- Lichtmikroskop (Hund-Wilovert A)
- Brutschrank-Zellkultur (Heraeus)
- Gefrierschrank (Heraeus)
- Sterile Sicherheitswerkbank (The Baker Company)
- FACS-Gerät (BD-FACSCanto™, BD Biosciences)

Software

- Microsoft Excel 2018
- BD-FACSDIVA™ Software (BD Biosciences)

2.2 Patient*innenkollektiv

Das Knochenmark wurde im Rahmen einer allgemeinchirurgischen Operation in Narkose aus der *Crista iliaca anterior superior* punktiert. Die Patient*innen gaben nach einer umfassenden Aufklärung ihre Zustimmung zu der Punktion in Narkose. Die Zustimmung der Patient*innen erfolgte freiwillig; die Zustimmung oder Ablehnung hatte keinen Einfluss auf die weitere Behandlung der Patient*innen. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, unter den Antragsnummern 2852 und 2853 genehmigt. Vor der der Blutprobenabnahme zu einer Thrombozythenspende wurde sichergestellt, dass die Thrombozyten-Funktion beeinflussende Medikamente (z. B. Acetylsalicylsäure (ASS), Plavix) für einen angemessenem Zeitraum vor den Experimenten pausiert oder abgesetzt worden waren. Die Patient*innen wiesen keine Pathologien auf, die die Stammzell- und Thrombozyten-Funktion beeinflusst haben könnte. Zudem wurden präoperativ vor der Punktion der Quick-Wert, die partielle Thromboplastinzeit (pTT) und die Thrombozyten-Zahl bestimmt. Die Ergebnisse der Patient*innen mussten für die Aufnahme in die Studie im Normbereich liegen.

2.3 Verwendete Methoden

Einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Methoden gibt Abb. 3.

Versuchsvorbereitungen	
Stammzellpunktion	Thrombozyten-Reinigung <ul style="list-style-type: none"> • Herstellung von <i>Plateled rich plasma</i> (PRP) • Herstellung von <i>Plateled poor plasma</i> (PPP)
Isolierung der Stammzellen <ul style="list-style-type: none"> • Filter • Erylyse • Dichtengradienten-Zentrifugation • <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> (MACS)/Labeling • Zellzahlbestimmung 	Fibroblastenkultur (eingefrorene Cos1/Cos7 Zellen) Adenosindiphosphat-(ADP)-Herstellung

Versuchsablauf	
Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born	Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Abb. 3: Verwendete Methoden

2.3.1 Stammzellpunktion

Es werden 20–40 ml Knochenmark aus der *Crista iliaca posterior* lege artis mittels Knochenmarkskanülen in 50 ml Spritzen zur Weiterverarbeitung überführt und unmittelbar nach der Entnahme steril aufgearbeitet. Das Knochenmark wird in Citrat-Lösung aufgezogen.

Stammzellapherese

Das Apheresat wurde von der Klinik für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf bereitgestellt. Die Stammzell-Apherese erfolgt bei gesunden, aufgeklärten Patient*innen. Bei dem Verfahren werden multipotente Stammzellen aus dem Blut isoliert. Vorab erfolgt eine Behandlung mit dem *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), der die KMSZ-Produktion im Knochenmark und eine Mobilisierung von KMSZ in das periphere Blut fördert. Der Spendende wird über beidseitige Armvenenkanülen an das Apherese-Gerät angeschlossen. Das gespendete Blut wird mit Hilfe eines Zellseparationsgeräts abgeleitet. Die zellulären Blutkomponenten des gespendeten Bluts werden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Interphase wird entnommen. Nach der Zentrifugation wird das gespendete Blut wieder vermischt und über ein geschlossenes System zum anderen Patient*innenarm zurückgeführt. Das Apheresat wird bis zur weiteren Verwendung gekühlt und steril gelagert.

2.3.2 Isolierung von CD133⁺-Stammzellen aus menschlichem Knochenmark

Die Entfernung von Verunreinigungen (z. B. Knochen, Koagel) erfolgte über einen 100 µl Filter. Das Knochenmark wurde in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und im Verhältnis von 7:1 mit einem 2 mM EDTA-PBS Puffer verdünnt.

Erylyse

Das Ziel der Erylyse war die Entfernung von Erythrozyten aus dem Knochenmarkspunktat. Die Erylyse wurde in Abhängigkeit vom makroskopischem Erscheinungsbild des Sediments (Knochenmark-Pellet) durchgeführt. Bei einer deutlichen roten Färbung wurde das Sediment in 25 ml Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde

für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert, anschließend vermischt und bei 300 g/1500 *revolutions per minute* (rpm) für 10 Minuten bei 20 °C mit Bremsfunktion zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je nach Größe mit 25–40 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Lösung wurde erneut bei 300 g/1500 rpm für 10 Minuten bei 20 °C mit Bremsfunktion zentrifugiert. Der Wasch-/Zentrifugationsvorgang wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

Dichtegradientenzentrifugation

Das Knochenmark wurde in einem Verhältnis von 7:1 mit einer Lösung aus PBS und 2 mM EDTA-Puffer verdünnt und in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Zur Beseitigung von Zellklumpen und Unreinheiten wurde die Probe über einen 100 µm-Filter gereinigt. 35 ml der gefilterten Proben wurden vorsichtig auf eine in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegte 15 ml Ficoll®-Lösung geschichtet. Die mit Knochenmarklösung und Ficoll® befüllten Röhrchen wurden mit abgeschalteter Bremsfunktion bei 445 g und 20 °C für 35 Minuten zentrifugiert. Dabei sammelten sich die Zellpopulationen in unterschiedlichen Schichten mit unterschiedlicher Dichte an. Aufgrund ihrer hohen Dichte befanden sich Granulozyten, Erythrozyten und der Knochendetritus am Boden des Falcon-Röhrchens. Darüber lag eine trübe Interphase mit den mononukleären Knochenmarkzellen. Diese Schicht wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die aus mononukleären Zellen bestehende Lösung wurde mit 40 ml PBS-Puffer gewaschen und bei 300 g/1500 rpm für 10 Minuten bei 20 °C mit Bremsfunktion zentrifugiert.

Auf Scherkräfte durch Bremseinwirkungen musste dabei keine Rücksicht genommen werden. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in eine Küvette überführt.

Aufreinigung der Stammzellen/ *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

Prinzip: Mit dem MACS lassen sich Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene aus einem Pool verschiedener Zelltypen isolieren. Dazu werden die Zielzellen mit spezifischen Antikörpern markiert, die an magnetische Mikrobeads gekoppelt sind. Die Probe mit dem Pool unterschiedlicher Zellentypen passiert die MACS-Säule im magnetischen Feld. Aufgrund der magnetischen Antikörper verbleiben die Antikörper-spezifischen Zellen auf der Säule, während nicht-gebundene Zellen frei passieren können. Die Säulen werden nach Entfernung der Magnetfelder ausgespült und für weitere Versuche aufbewahrt. Sämtliche Aufreinigerungsverfahren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Magnetic-Labeling: Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet aus der Dichtegradientenzentrifugation (siehe oben) in 300 µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen aufgenommen. Die Antikörpermarkierung erfolgte mit einer Lösung aus 100 µl FcR-(*Fragment-crystallisable-receptor*)-Blocking Reagenz pro 10⁸ Zellen. Die Probe aus MACS-Puffer, KMSZ und FcR-Blocking-Reagenz wurde gut vermischt und für 30 Minuten bei 2–8 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl CD133/2 (293C3)-PE gefärbt und für 5 Minuten bei 2–8 °C im Dunkeln inkubiert und danach je nach Sedimentgröße mit 1–2 ml MACS®-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g/1500 rpm für 10 Minuten bei 20 °C mit Bremsvorgang.

Magnetic-Sorting: Die MACS®-Apparatur (Magnet, Magnetständer, MACS®-Säule, 30 µm Filter, Abfallröhrchen, Röhrchenständer) wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Der Filter wurde auf die MACS®-Säule aufgesetzt und mit 500 µl MACS®-Puffer angefeuchtet. Die Suspension mit dem markierten Zielzellsediment (500 µl pro 10⁸ Zellen) wurde auf die vorgebreitete Säule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit jeweils 500 µl MACS®-Puffer dreimal gespült. Durch diese Spülvorgänge wurden Zellen, die nicht an die Microbeads gebunden waren, von der Säule entfernt. Die selektierten Target-Zellen wurden nach Herstellerangaben von der Säule mit 1 ml MACS®-Puffer entfernt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Danach wurde die Zellzahl erneut mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zellzahlbestimmung: Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter einem Lichtmikroskop mittels Neubauer-Zählkammer. Zur Bestimmung des Mittelwerts wurden die Werte aus vier Quadranten berücksichtigt. Für die Versuche wurden Zellzahlen von 7500, 15000, 30000 und 50000 benötigt.

2.3.3 Thrombozyten-Aufreinigung

Herstellung von *Platelet Rich Plasma* (PRP)

Das entnommene venöse Vollblut wurde nach der Entnahme zügig verarbeitet. Bei den Patient*innen wurde zuvor sichergestellt, dass die letzte Einnahme von Thrombozyten-Aggregationshemmer mindestens 5 Tage zurück lag. Das Blut wurde nach der Punktion einer peripheren Vene in Citrat-Röhrchen (1 IU/ml; Sigma, Germany) überführt, um eine vorzeitige Aggregation der Thrombozyten zu unterbinden. Zusätzlich wurde auf eine sanfte Stauung der peripheren Venen geachtet, um eine zusätzliche Schädigung der Thrombozyten zu vermeiden. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Kälteeinwirkungen wurden vermieden, da niedrige Temperaturen die Thrombozyten-Aggregation induzieren können. Die anschließende Zentrifugation der Blutproben bei 180 g unter Raumtemperatur für 10 Minuten erfolgte ohne Bremswirkung, um

Scherkräfte zu vermeiden. Dabei wurden die Erythrozyten von den Thrombozyten getrennt. Letztere befanden sich im Überstand, welcher vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen wurde. Auch hierbei wurde darauf geachtet, mechanische Scherkräfte zu vermeiden, die die Aggregation der Thrombozyten fördern und somit das Ergebnis verfälschen könnten. Zusätzlich ließ sich so ein ungewolltes Aufmischen der Schichten vermeiden. Die Suspension wurde anschließend in eine Küvette überführt. Die Thrombozyten-Konzentration wurde mit einem Blutanalysegerät der Firma Sysmex bestimmt. Das PRP wurde auf eine Thrombozyten-Zahl von $5,0 \times 10^4$ eingestellt.

Herstellung von *Platelet Poor Plasma* (PPP)

Als Negativkontrolle wurde das übrige Vollblut der Patient*innen unmittelbar nach Entnahme bei 1000 g bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert. Auf Scherkräfte durch Bremsenwirkungen musste dabei keine Rücksicht genommen werden. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in eine Küvette überführt.

2.3.4 Fibroblasten-Kultur

Für die Anlage einer Fibroblasten-Kultur wurden eingefrorene Cos1/Cos7 Zellen aus einem 1,5 ml Aliquot in einem Wasserbad auf Raumtemperatur schnell erhitzt. Die Zelllösung wurde unter sterilen Bedingungen in 5 ml Quantum 333 resuspendiert und anschließend in eine Kulturflasche mit 7,5 ml Quantum 333 überführt. Das insbesondere für Fibroblasten-Kulturen geeignete Medium ist mit Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, Insulin, eisenbindenden Molekülen und Serumbestandteilen supplementiert. Die Kulturflasche mit der Zellsuspension wurde nun in einem 5 % Kohlenstoffdioxid-Inkubator bei 37 °C für mindestens 96 Stunden inkubiert, bevor sie für weitere Versuche verwendet wurde. Das Zellmedium wurde alle 48 Stunden unter sterilen Bedingungen gewechselt. Mit einem Lichtmikroskop wurde auf eine adäquate Zelldichte geachtet. Bei einer geeigneten Zelldichte wurden das Medium dekantiert und vorsichtig 10 ml PBS hinzugegeben, um die Zellen nicht vom Flaschenrand zu lösen. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml Trypsin-Lösung resuspendiert. Dazu wurden die Kulturflaschen für 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit dem Lichtmikroskop wurde eine vollständige Ablösung der Zellen vom Untergrund sichergestellt. Durch Zugabe von 5 ml Quantum 333 wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Zur Anfärbung der Zellen wurden 10 µl der Zelllösung mit 10 µl Trypanblau vermischt. Anschließend wurden 10 µl dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nach der Entnahme der für die Versuche benötigten Zellzahl wurden aus einem Teil der Lösung weitere Zellkulturen angelegt.

Die restliche Zelllösung wurde in einer Dimethylsulfoxid-(DMSO)-haltigen Gefrierschutzlösung auf drei Aliquots á 1,5 ml bei -20 °C kryokonserviert. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und somit die Zerstörung der Zellorganellen und das Absterben von Fibroblasten. Die für die Versuche benötigte Suspension wurde bei 1100 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PPP resuspendiert.

2.3.5 Adenosindiphosphat (ADP) Herstellung

Die Stammlösung wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und bei -20 °C gelagert. Die Lösung wurde bei Bedarf kurz vor den Versuchen aufgetaut. Die für die Versuche notwendigen ADP-Konzentrationen wurden mit einer physiologischen Kochsalzlösung eingestellt. Die Konzentration wurden für 100 µl Ansätze berechnet. Für die Versuchsreihen wurden ADP-Konzentrationen von 2,5 µM, 5 µM und 10 µM benötigt.

2.3.6 Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born

Das LTA-Verfahren wurde nach seinem Erstbeschreiber benannt. Die Messung basiert darauf, dass Thrombozyten in Suspension nach Zugabe eines Aggregationsagonisten aktiviert werden und Aggregate bilden. Die optische Durchlässigkeit nimmt nach der Agonisten-Zugabe signifikant zu. Die Lichttransmission durch das Medium wird laufend registriert und als Kurve aufgezeichnet. Die Transmissionswerte korrelieren mit der Plättchenaktivität bzw. Thrombozyten-Aggregation (siehe Abb. 4).

Die Versuche wurden in einem Thrombozyten-Aggregometer bei Raumtemperatur durchgeführt. Das PPP entsprach einer maximalen Transmission von 100 %. Die Versuche werden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Aggregometer wurden mit Küvetten mit PRP (0 % Lichttransmission) und PPP (100 % Lichttransmission) geeicht. Die minimale Aggregationskurve wurde eingestellt und unmittelbar vor ADP-Gabe auf 0 geeicht. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Wirkung des Agonisten auf die Thrombozyten wurde ein sich konstant drehender Magnetstab eingesetzt. Die so erzielte permanenten Interaktion von Agonisten und Thrombozyten verhinderte eine Spontanaggregation.

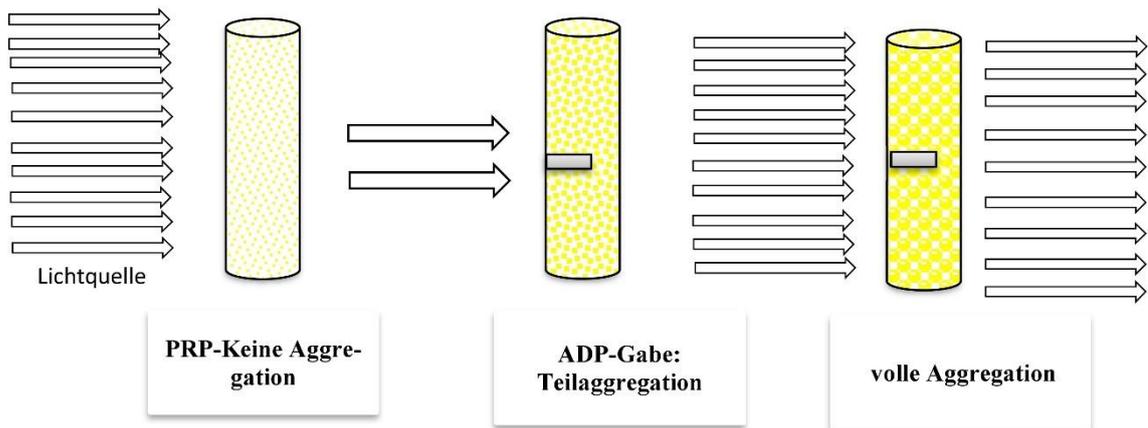


Abb. 4: Schematische Darstellung der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born. Veränderung der Thrombozyten-Form und eine zunehmende Aggregatbildung nach Agonisten-Zugabe (Adenosindiphosphat (ADP)) zum Plateled rich plasma (PRP) führen zu einer Zunahme der Lichtintensität aufgrund vermehrter Lichtdurchlässigkeit der Thrombozyten-Emulsion. Die Lichttransmission wird über eine Photozelle dokumentiert.

Die Änderungen der Lichttransmission wurden vom Aggregometer als Aggregationskurve gegen die Zeit aufgezeichnet. Für die statistische Auswertung war die Steigung der Impedanz-Veränderung von Relevanz. Diese wurde als Amplituden-Slope von der Aggrolink 1 Software ermittelt.

Für die Versuche wurden die vorgegebene Thrombozyten-Zahl von $5,0 \times 10^4/\mu\text{l}$ für das gewünschte Volumen berechnet und die Suspension in Küvetten pipettiert. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 1000 rpm/min eingestellt. Die Küvetten wurden nach Herstellerangaben vor den Versuchsreihen auf 37°C erwärmt. Die Kurve wird vor Gabe der Agonisten so lange beobachtet, bis sich eine stabile Grundlinie gebildet hatte. Auf diese Weisen wurden Spontanaggregationen registriert und ausgeschlossen. Die Messung wurde nach Zugabe von ADP gestartet und über eine Dauer von 7 Minuten bis zum Erreichen der maximalen Amplitude fortgesetzt. In Abhängigkeit von früheren Werten konnte die Zeit auch auf 5 Minuten verkürzt werden (siehe Abb. 5).

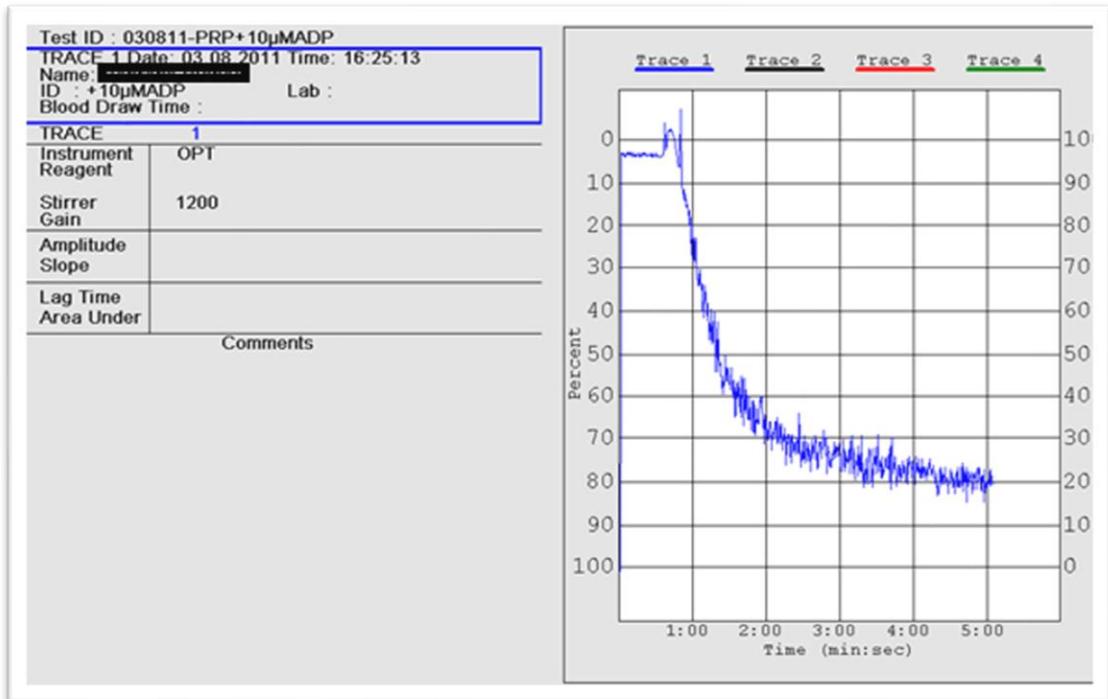


Abb. 5: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Induzierte Thrombozyten-Aggregation nach Adenosindiphosphat-(ADP)-Gabe. Dargestellt wird der Transmissionsverlauf (Zunahme der Lichttransmission in %) über 5 Minuten. Nach der ADP-Gabe bei 30 Sekunden kommt es nach einer initialen Kurvenveränderung (second wave) zu einer stetigen Zunahme der Lichttransmission.

ADP-Reihe

Die Herstellung der Agonisten-Lösung erfolgte kurz vor Versuchsbeginn. Zunächst wurden niedrige ADP-Konzentrationen verwendet. Eine Aggregation findet meistens bei einer ADP-Konzentration von 2–3 µM statt. Dabei wurde auf das „second wave“ Phänomen geachtet. Dabei handelt es sich um eine reversible Aggregation nach einer initialen Formänderung der Thrombozyten nach Eintauchen der Pipette zur Agonisten-Gabe. Die eingesetzten ADP-Konzentrationen wurden auf der Basis dieser Befunde festgelegt. Bei den Kurven wurde ständig auf visuelle Plausibilität geachtet. Folgende ADP-Konzentrationen wurden verwendet:

- 2,5 µM
- 5 µM
- 10 µM

Das Gerät wurde angeschaltet und nach Herstellerangabe kalibriert. Dazu wurde die Küvette mit dem PRP ($5 \times 10^4/\mu\text{l}$ Thrombozyten) und dem Rührmagneten auf 37 °C erwärmt. Das Gerät wurde vor der Messung jeder Probe erneut kalibriert. Die Küvette mit dem PRP wurde in den Versuchskanal eingeführt. Mit einer mehrere Minuten dauernden Durchmischung wurde ein *steady-state* erreicht. 15 Sekunden nach Erreichen des

steady-state wurde das ADP zupipettiert. Nach 5 Minuten wurden die Versuche beendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Aggrolink-Software. Dabei wurde die maximale Amplitude ermittelt. Die Amplitude entspricht der Fläche unter der Kurve (*Slope*) in Prozent. Je nach ADP-Konzentration wurden unterschiedliche Veränderungen der Kurve aufgrund unzureichender reversibler Thrombozyten-Aggregationen festgestellt. Bei einer maximalen irreversiblen Thrombozyten-Aggregation bildete sich aufgrund der Ausschöpfung des Aggregationspotentials eine typische Plateauebene (siehe Abb. 6).

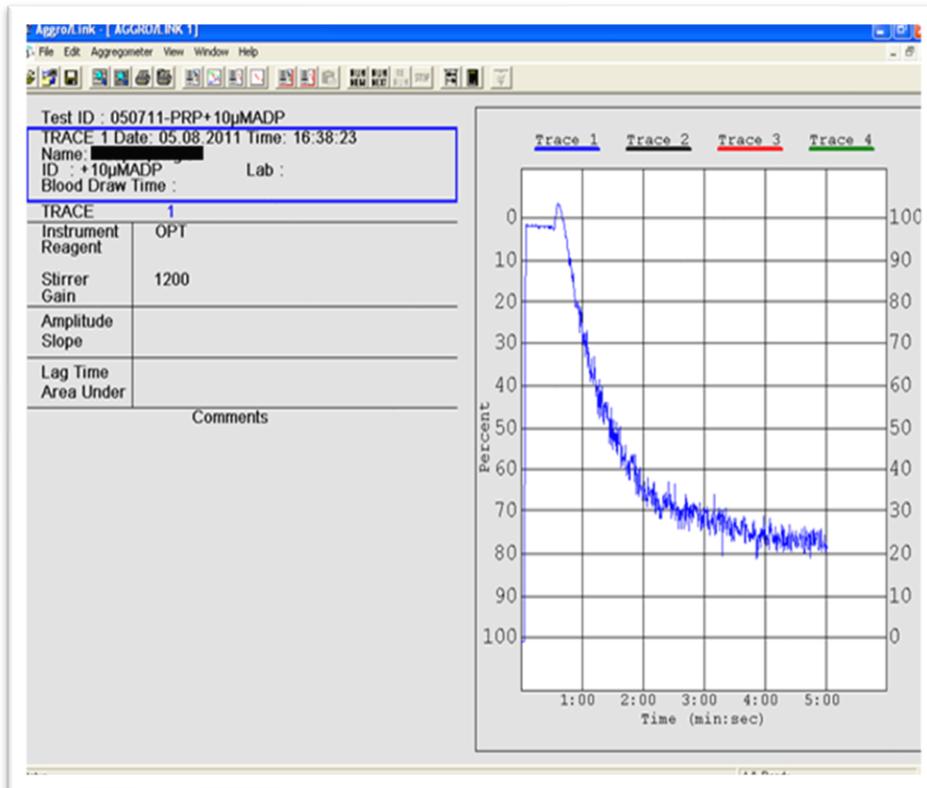


Abb. 6: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %) nach Adenosindiphosphat-(ADP)-Gabe. Die Plateauebene beruht auf einer irreversiblen Thrombozyten-Aggregation. Sie verändert sich auch bei einer weiteren ADP-Zugabe nicht mehr.

Versuchsreihe nach Co-Inkubation mit CD133⁺KMSZ

In Abhängigkeit von der Anzahl der nach der MACS®-Aufreinigung isolierten CD133⁺KMSZ wurde die Anzahl der Versuchsansätze bestimmt. Dabei ließ sich nach wiederholten Versuchsansätzen eine aussagekräftige Versuchsreihe festlegen. Es wurde angestrebt, Versuche mit allen festgelegten CD133⁺KMSZ-Zellzahlen (z. B. 50.000, 30.000, 15.000, 7.500) durchzuführen.

Die einzusetzende ADP-Konzentration wurde in einer Versuchsreihe mit verschiedenen ADP-Konzentrationen ermittelt (siehe oben). Gewählt wurde die ADP-Konzentration, bei

der es zu einer maximalen Amplituden-Veränderung gekommen war und die eine maximale irreversible Aggregation ausgelöst hatte. In den Co-Inkubationsversuchen wurde nach 15 Sekunden unter Berücksichtigung des Kurvenplateaus die entsprechende ADP-Konzentration hinzugegeben. Nach 90 Sekunden folgten die vorbereiteten CD133⁺KMSZ-Zellen. Nach 5 Minuten wurde der Versuch beendet und die Amplitude sowie der Slope-Wert ermittelt (siehe Abb. 7). Nach der Ausbildung eines Plateaus nach der initialen ADP-Gabe kam es nach Zusatz der CD133⁺KMSZ zu einer weiteren Abnahme der Amplitude und im Verlauf zu einem Equilibrium.

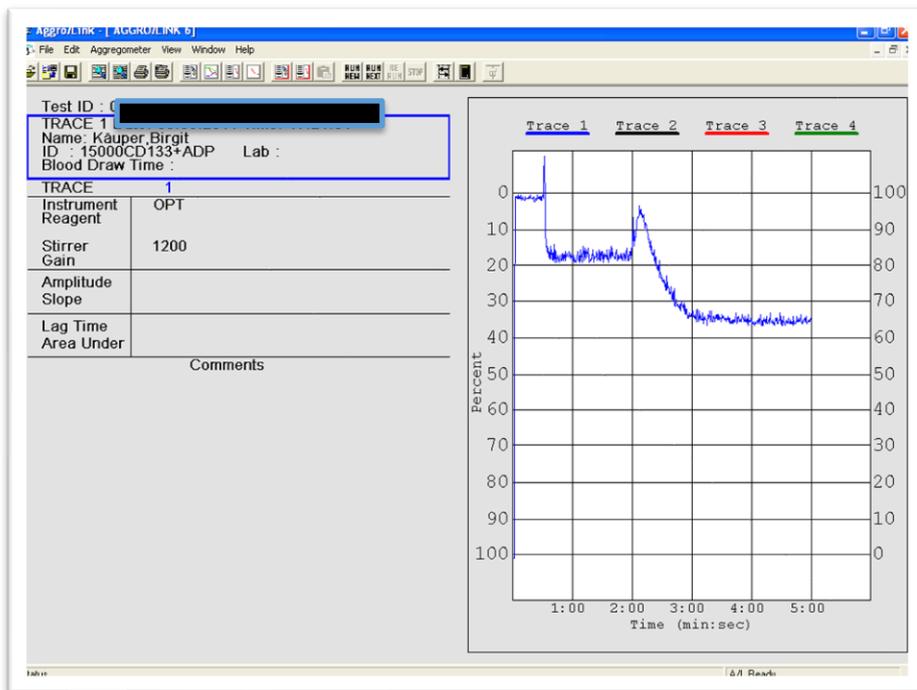


Abb. 7: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %) nach Gabe von Adenosindiphosphat (ADP) und CD133⁺-Knochenmarksstammzellen (KMSZ). Nach einer initialen ADP-Gabe (15 Sekunden) und Einstellung der Nulllinie wurden nach 90 Sekunden CD133⁺KMSZ zugegeben. Durch die Zellzugabe kam es zu einer Verschiebung der Nulllinie.

Versuchsreihe nach Co-Inkubation mit Fibroblasten

Als Kontrollzellen wurden Fibroblasten eingesetzt. Für die Versuchsreihen wurden die gleichen Zellzahlen (z. B. 50.000, 30.000, 15.000, 7.500) wie in den Versuchsreihen mit den CD133⁺KMSZ (siehe oben) verwendet.

Auch der Versuchsablauf (Dauer 5 Minuten) entsprach dem bei den Versuchen mit CD133⁺KMSZ. Nach 15 Sekunden wurde die gleiche ADP-Konzentration zugegeben und nach 90 Sekunden die Fibroblasten. Die Amplitude und der Slope-Wert wurden am Ende der Versuche dokumentiert (siehe Abb. 8).

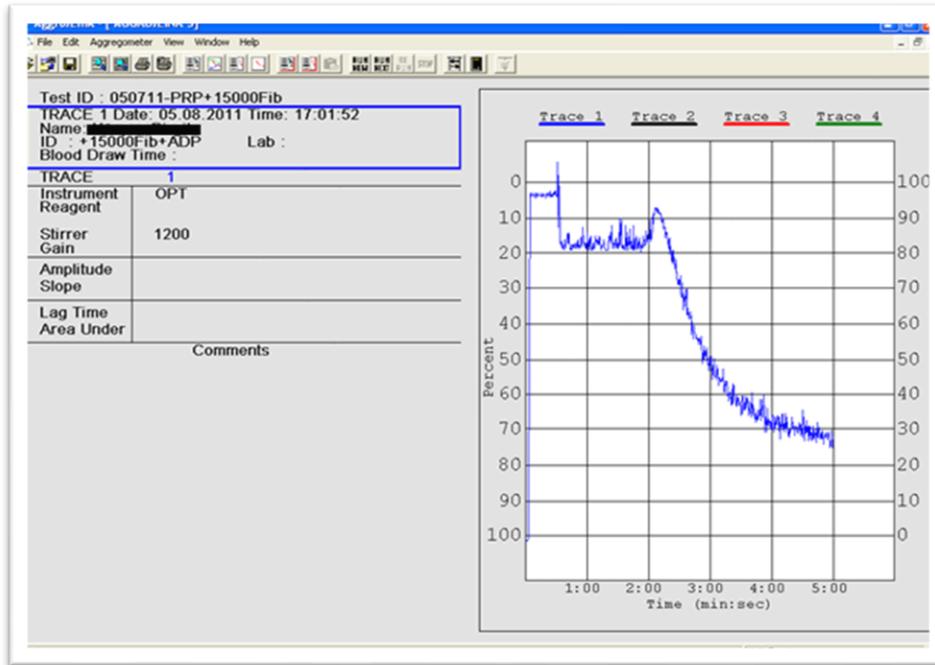


Abb. 8: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %) nach Gabe von Adenosindiphosphat (ADP) und Fibroblasten). Nach einer initialen ADP-Gabe (15 Sekunden) und Einstellung der Nulllinie wurden nach 90 Sekunden Fibroblasten zugegeben. Durch die Zellzugabe kam es zu einer Verschiebung der Nulllinie, die aber weniger deutlich ausgeprägt war als in den Versuchen mit CD133+KMSZ.

Statistische Auswertung der LTA nach Born

Aus den dargestellten Kurven ließ sich über die Aggro-Link-Software die Amplitude und der Slope ermitteln. Die Amplitude entsprach der Impedanz-Änderung vom Start der Impedanz-Zunahme bis 5 Minuten danach. Dieser Wert wurde in Prozent angegeben. Der Slope-Wert entsprach der Geschwindigkeit der Amplituden-Änderung entsprechend dem Amplituden-Gradienten.

2.3.7 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Das FACS ist eine durchflusszytometrische Methode zur Analyse von Oberflächen Zellproteinen in einer Zellpopulation. Bei dem Verfahren werden unterschiedliche Parameter der Zellen einer Suspension (z. B. Zellgröße, Granularität, und Oberflächenmarker als Antigene) aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert.

Bestimmung der Oberflächenantigene der isolierten KMSZ

Die FACS-Analyse diente in den vorliegenden Versuchsreihen der Qualitätssicherung. Mit der Methode wurde sichergestellt, dass in die Versuche tatsächlich KMSZ eingesetzt wurden. Dazu wurden die KMSZ mit in der Literatur beschriebenen KMSZ-spezifischen Antikörpern markiert. Für das FACS können Antikörper verwendet werden, die entweder

direkt mit einem Fluorophor gekoppelt sind, oder solche, die über eine Bindung an einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert werden. Die Antikörper-beladenen Zellen passieren die Kapillaren des FACS-Geräts einzeln. Durch einen fokussierten Laserstrahl werden Fluoreszenz- und Lichtstreuungen erzeugt. Die Identifikation der Zellen erfolgt aufgrund der Antikörper-gekoppelten Fluoreszenz-Charakteristika. Die Zellen können auch anhand der Lichtstreuemenge charakterisiert werden. Durch den Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich verschiedene Zellpopulationen differenzieren.

Für die vorliegenden Versuche wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert:

- Anti-CD133 als hämatopoetischer Stammzellmarker
- Anti CD-45 als hämatopoetischer Stammzellmarker mit Ausnahme reifer Erythrozyten und Thrombozyten
- Anti CD-34 als Stammzellmarker
- Anti CD-42 als Thrombozyten- und Megakaryozyten-Marker

Für die Versuche wurde das Gerät BD-FACSCanto™ mit der Software BD-FACSDiva™ des Herstellers BD Biosciences verwendet.

Nachweis der Thrombozyten-Aggregation

Auch eine Thrombozyten-Aggregation kann mit dem FACS quantitativ und qualitativ gemessen werden. Dabei werden Veränderungen an der Membranoberfläche der Thrombozyten und Veränderungen der Antigen-Expression bestimmt. Die Bildung eines Thrombozyten-Aggregats hängt von dem sich an den Thrombozyten-Oberfläche befindlichen GPIIb/GP IIIa ab. Das aktivierte GPIIb/GPIIIA-Protein fungiert als Rezeptorprotein für Fibrinogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung des aktivierten GPIIb/GPIIIA-Protein an Fluorochrom-konjugiertes Fibrinogen (Fib-FITC) untersucht.

Bereitstellung der CD133⁺-Zellen: Nach der MACS-Reinigung wurde die Zellzahl der CD133⁺KMSZ mittels Neubaur-Zählkammer bestimmt. Die Stammzellsuspension (5×10^4 Zellen/100 μ l) wurde bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremsfunktion zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend – um den pH-Wert und die osmotischen Verhältnisse konstant zu halten – in 100 μ l HBSS resuspendiert. Die 100 μ l Ansätze wurden mit jeweils 5 μ l CD133/2-PE, CD34-APC und CD42a-PerCP Antikörpern für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurde 1 mM CaCl₂ zugefügt.

Bereitstellung von Fibroblasten: Nach der Kultivierung wurde die Zellzahl der Fibroblasten mittels Neubaur-Zählkammer bestimmt. Die Fibroblasten-Suspension (5×10^4

Zellen/100 μ l) wurde bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremsfunktion zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend – um den pH-Wert und die osmotischen Verhältnisse konstant zu halten – in 100 μ l HBSS resuspendiert. Die 100 μ l Ansätze wurden mit jeweils 5 μ l CD133/2-PE, CD34-APC und CD42a-PerCP Antikörpern für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurde 1 mM CaCl_2 zugefügt.

Bereitstellung von PPP und PRP: Nach der Herstellung des PRP aus dem Vollblut wurde die Thrombozyten-Suspension auf $5,0 \times 10^4$ Zellen/ μ l eingestellt. Der Fib-FITC-Antikörper wurde in einer Konzentration von 150 μ g/ml eingesetzt. Der Plasmaanteil aus PPP und PRP betrug ein Drittel des Gesamtvolumens.

Bereitstellung von ADP: Die ADP-Konzentrationen für die Versuchsreihen wurden aus eine 1 mM Lösung verdünnt (Verdünnungsverhältnis 1 (VV1) 1:10 für 100 μ M; Verdünnungsverhältnis 2 (VV2) 1:100 für 10 μ M, siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Adenosindiphosphat-(ADP)-Konzentration und Verdünnungsverhältnisse für die *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)-Analyse

Notwendige ADP-Konzentration (μ M)	Menge (μ l)	Verdünnungsverhältnis
0	0	
0,0625	0,625	VV2
0,125	1,25	VV2
0,25	2,5	VV2
0,5	5	VV2
1,0	1	VV1
2,0	2	VV1
5,0	5	VV1

Versuchsablauf – FACS-Analyse nach Co-Inkubation mit Fibroblasten und CD133⁺KMSZ: Der quantitative und qualitative Nachweis der Thrombozyten-Aggregation mittels FACS-Analyse erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Koinkubation von CD133⁺KMSZ mit ADP. Die Kontrollversuche werden nach Koinkubation mit Fibroblasten und ADP durchgeführt. Für die Versuche wurde eine Suspension, wie in Tabelle 2 dargestellt, verwendet.

Tabelle 2: Zellsuspension für die FACS-Analyse der mit ADP aktivierten Thrombozyten und CD133⁺KMSZ und Fibroblasten als Kontrollzellen

PRP
PPP
Fib-FITC
CD133 ⁺ KMSZ/Fibroblasten
HBSS

Lösungen mit den berechneten Agonisten-Konzentrationen wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit PRP, PPP, Fit-FITC, CD133⁺KMSZ/Fibroblasten und HBSS zugefügt. Dabei wurden die zeitlichen Abstände berücksichtigt, um eine verlängerte Inkubationszeit zu vermeiden. Die Proben aus Zellsuspension und Agonisten werden für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit 100 µl einer 8 %-igen Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung fixiert. Die fixierten Proben wurden für weitere 20 Minuten inkubiert und mit 1 ml HBSS gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension bei 2200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremsfunktion zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl HBSS resuspendiert und analysiert.

2.3.8 Statistische Auswertung

Für die statische Auswertung wurden zunächst Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen mit dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 23) bestimmt. Die Korrelation zwischen der Amplituden-Änderung in der LTA und der Zellkonzentration (CD133⁺KMSZ, Fibroblasten) nach Agonisten-(ADP)-Gabe wurde untersucht. Die Signifikanz der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Ergebnisse wurde mittels t-Test für ungepaarte Messungen überprüft. Aufgrund der unterschiedlichen Fallzahlen bei den Versuchen wurde zur Überprüfung der Signifikanz zusätzlich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die grafische Darstellung erfolgte in Balkendiagrammen.

3 Ergebnisse

3.1 Lichttransmissionsaggregometrie-(LTA)-Versuche

3.1.1 Amplitude nach Co-Inkubation mit ADP/CD133⁺KMSZ vs. ADP

Die Auswertung der LTA-Versuche zeigte unabhängig von der eingesetzten Zellzahl eine signifikante Reduktion der Amplitude (%) ($t(56) = 10,66$, $p < 0,001$) nach einer CD133⁺KMSZ-Gabe (siehe Abb. 9 und Tabelle 3). Im Wilcoxon Signed Rank Test bestätigte sich die Reduktion der Amplitude (%) ($z = -6,16$, $p < 0,001$).

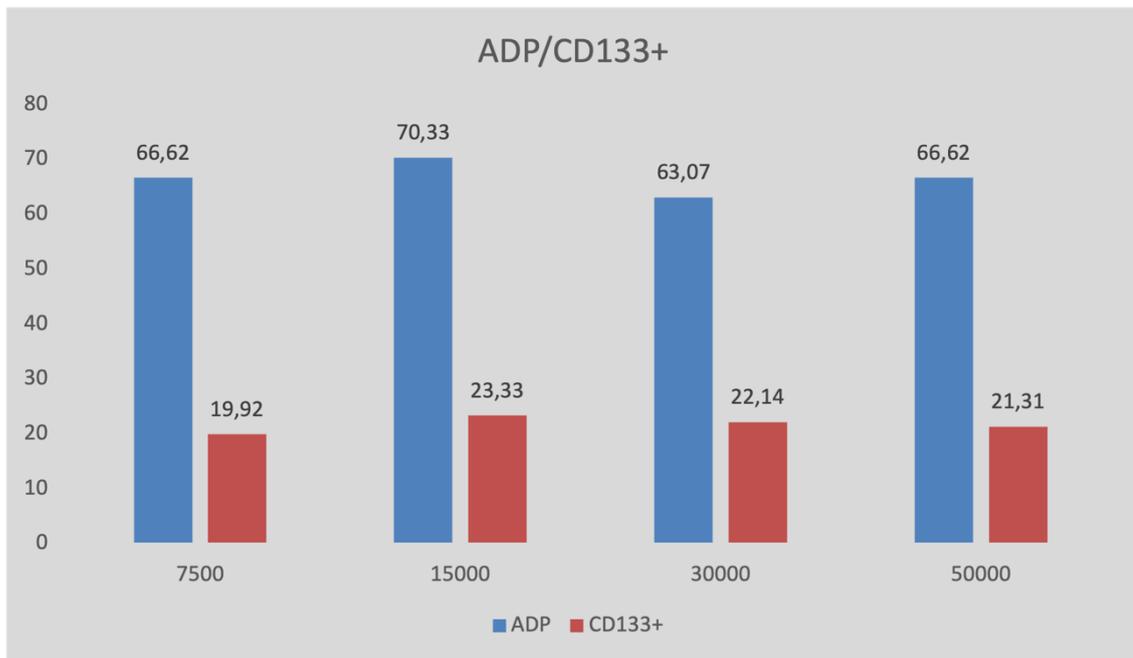


Abb. 9: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/CD133⁺KMSZ-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener CD133⁺KMSZ-Zahlen. Die Y-Achse zeigt die Amplitude (%). Die Zahlen unter den Säulen stellen die Anzahl der zugefügten CD133⁺KMSZ dar. ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

Tabelle 3: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Statistische Auswertung der Veränderung der Amplitude nach ADP-/CD133⁺KMSZ-Gabe und alleiniger ADP-Gabe

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler	
Amplitude (%): ADP	64,60	57	18,364	2,432	
Amplitude (%): ADP + CD133 ⁺ KMSZ	22,93	57	20,902	2,769	
t-Test					
Differenz Amplitude (%) ADP	Mittelwert	Standardabweichung	t	df	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)
	41,667	29,493	10,666	56	0,0001

ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

3.1.2 Amplitudenänderung nach Co-Inkubation mit ADP/Fibroblasten vs. ADP

Die Auswertung der LTA-Versuche zeigte unabhängig von der eingesetzten Zellzahl eine signifikante Reduktion der Amplitude (%) ($t(46) = 12,857$, $p < 0,001$) nach der Fibroblasten-Gabe (siehe Abb. 10 und Tabelle 4). Im Wilcoxon Signed Rank Test bestätigte sich die Reduktion der Amplitude (%) ($z = -5,94$, $p < 0,001$).

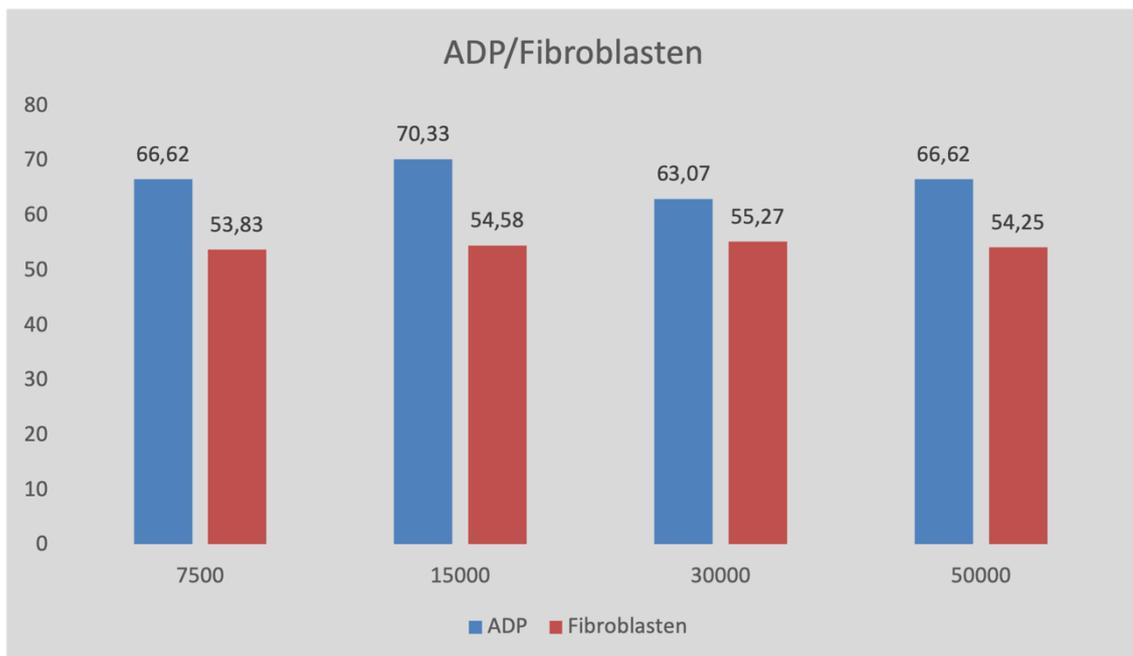


Abb. 10: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener Fibroblasten-Zahlen. Die Y-Achse zeigt die Amplitude (%). Die Zahlen unter den Säulen stellen die Anzahl der zugefügten Fibroblasten dar. ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation

Tabelle 4: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Statistische Auswertung der Veränderung der Amplitude nach ADP-/Fibroblasten-Gabe und alleiniger ADP-Gabe

	Mittelwert	N	Standard-abweichung	Standardfehler	
Amplitude (%): ADP	70,32	47	7,322	1,068	
Amplitude (%): ADP + Fibroblasten	54,47	47	7,547	1,101	
t-Test					
Differenz Amplitude (%)	Mittelwert	Standard-abweichung	t	df	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)
ADP	15,851	8,452	12,857	46	0,0001

ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation

3.1.3 Vergleich der Amplitudenänderung nach Co-Inkubation mit CD133⁺KMSZ/ADP und Fibroblasten /ADP

In den CD133⁺KMSZ-Co-Kulturen kam es im Vergleich zu den Fibroblasten-Co-Kulturen zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Amplitude (%) ($t(46) = -9,4$, $p < 0,001$) (siehe Abb. 11). Dieser Unterschied bestätigte sich im Wilcoxon Signed Rank-Test ($z = -5,25$, $p < 0,001$).

Es zeigte sich im Vergleich zur Fibroblastengabe – durch die Zugabe von CD133-positiven Stammzellen eine deutlich ausfälligere Reduktion der Amplitude (%); $t(46) = -9,4$, $p < 0,001$ im Vergleich zur Fibroblastengabe.

Im Wilcoxon Signed Rank-Test sahen wir ebenfalls eine Reduktion der Amplitude (%); $z = -5,25$, $p < 0,001$.

3.2 Vergleich Amplitude CD133+, ADP, Fibroblasten

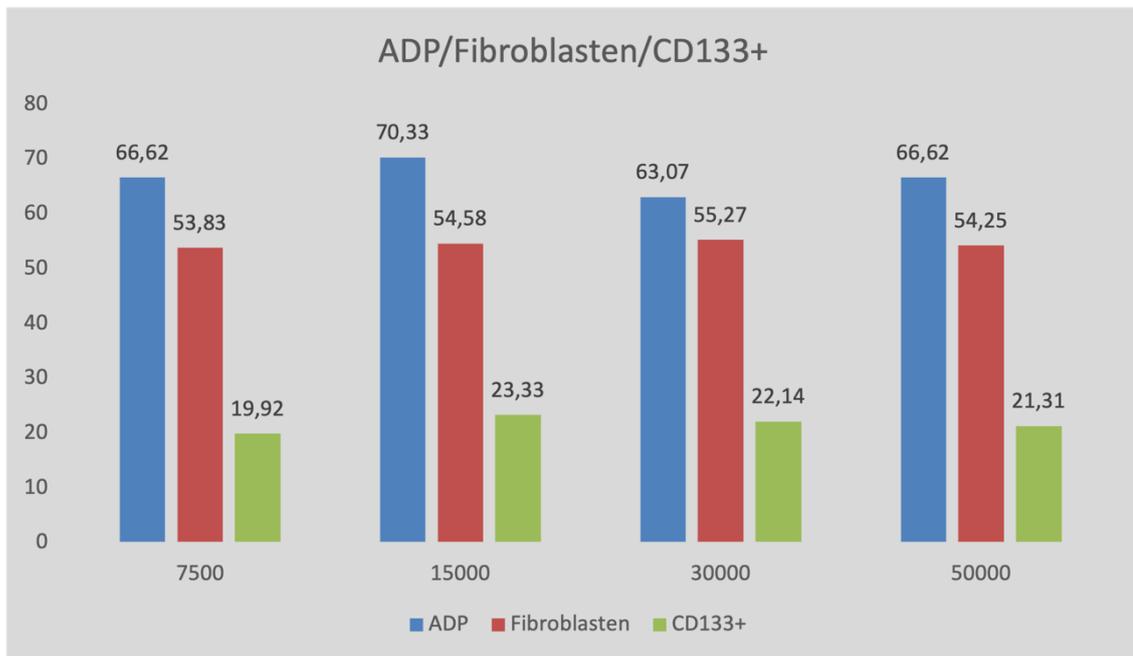


Abb. 11: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/CD133+KMSZ-Gabe (grün) bzw. ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener Zellzahlen. Die Y-Achse zeigt die Amplitude (%). Die Zahlen unter den Säulen stellen die Anzahl der zugefügten Zellen dar. ADP = Adenosin-diphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

3.2.1 Korrelation zwischen den eingesetzten CD133+KMSZ-Zahlen und dem Ausmaß der Amplitudenänderung

Für die statistische Auswertung wurden die CD133+KMSZ-Zahlen 7500, 15000, 30.000 und 50.000 berücksichtigt, da diese die meisten Fälle aufwiesen. Zusammenfassend bestanden keine signifikanten Unterschiede bei den Amplituden-Änderungen bei Verwendung unterschiedlicher CD133+KMSZ-Zahlen (siehe Tab. 5)

Tabelle 5: Statistische Auswertung der Amplituden Veränderungen Dieser Unterschied war laut t-Test nicht signifikant und muss daher als zufällig aufgefasst werden

CD133+KMSZ-Zahl	Amplituden(%) - mittelwert	Ergebnis
7500 vs 15.000	19,92 vs 23,33	(t(12) = 0,24, p ≥ 0,05).
15.000 vs 30.000	23,33 vs 22,14	(t(12) = 0,09, p ≥ 0,05).
30.000 vs 50.000	22,14 vs 21,31	(t(12) = 0,07, p ≥ 0,05).
50.000 vs 7500	21,31 vs 19,92	(t(12) = 0,10, p ≥ 0,05)

3.2.2 Korrelation zwischen den eingesetzten Fibroblasten-Zahlen und dem Ausmaß der Amplitudenänderung

Für die statistische Auswertung wurden 7500, 15000, 30.000 und 50.000 Fibroblasten eingesetzt, da diese die meisten Fällen aufwiesen. Zusammenfassend bestanden keine signifikanten Unterschiede bei den Amplituden-Änderungen bei Verwendung unterschiedlicher Fibroblasten-Zahlen (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Statistische Auswertung der Amplituden Veränderungen bei unterschiedlichen Fibroblasten-Zellzahlen. Dieser Unterschied war laut t-Test nicht signifikant und muss daher als zufällig aufgefasst werden

Fibroblastenzahl	Amplituden(%) - mittelwert	Ergebnis
7500 vs 15.000	53,83 vs. 54,58	(t(12) = -0,15, p ≥ 0,05)
15.000 vs 30.000	54,58 vs. 55,27	(t(12) = -0,16, p ≥ 0,05).
30.000 vs 50.000	55,27 vs 55,25	(t(12) = 0,24, p ≥ 0,05).
50.000 vs 7500	55,24 vs. 53,58	(t(12) = 0,10, p ≥ 0,05).

3.3 FACS-Versuche

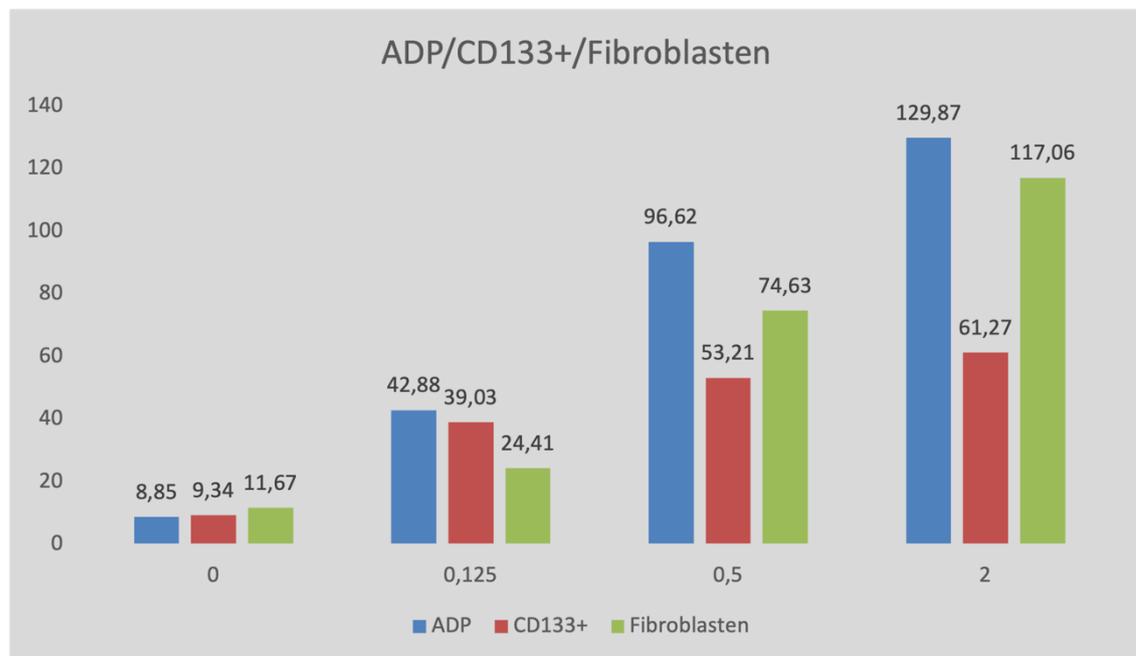


Abb. 12: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse – Inhibierung nach ADP-/CD133⁺-Gabe (rot), nach ADP-/Fibroblasten-Gabe nach ADP-/CD133⁺-Gabe (rot), e (grün), und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener ADP-Konzentrationen. Die Y-Achse zeigt die Inhibierung (%). Die Zahlen unter den Säulen stellt die ADP-Konzentration in µM dar. ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

Der Einfluss der CD133⁺KMSZ auf die Thrombozyten wurde zusätzlich zu den LTA-Versuchsreihen auch mittels FACS analysiert. Hierbei wurde die induzierte Fib-FITC-Bindung an die Thrombozyten-Oberflächen bei verschiedenen ADP-, CD133⁺KMSZ- und Fibroblasten-Konzentrationen verglichen. Bestimmt wurde die prozentuale Inhibition der Thrombozyten-Aggregation.

Co-Inkubation mit ADP und CD133⁺KMSZ: Bei der Zugabe von CD133⁺KMSZ kam es zu einer signifikanten Reduktion der Inhibition (%) der Thrombozyten-Aggregationshemmung ($t(45) = 1,93, p < 0,06$).

Co-Inkubation mit ADP und Fibroblasten: Bei der Zugabe von Fibroblasten kam es zu einer signifikante Reduktion der Inhibition (%) der Thrombozyten-Aggregationshemmung ($t(81) = 5,55, p < 0,001$).

Vergleich der Co-Inkubation mit ADP/CD133⁺KMSZ und ADP/Fibroblasten: Die Reduktion der Inhibition (%) der Thrombozyten-Aggregationshemmung war bei Zugabe von CD133⁺KMSZ signifikant größer als bei Zugabe von Fibroblasten ($t(45) = -2,1, p < 0,04$). (siehe Abb. 12)

3.3.1 Korrelation zwischen ADP-Konzentration und Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation

Die prozentuale Inhibierung der Thrombozytenaggregation wurde zunächst bei steigenden ADP-Konzentrationen ohne Zugabe weiterer Zellen untersucht. Verglichen wurden ADP-Konzentrationen von 0 μM , 0,125 μM , 0,5 μM und 2 μM (siehe Abb. 15).

Vergleich 0 μM ADP vs. 0,125 μM ADP: Ohne ADP betrug die Inhibierung im Mittel 8,85 % und mit 0,125 μM ADP 42,88 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -2,06, p \geq 0,05$).

Vergleich 0,125 μM ADP vs. 0,5 μM ADP: Mit 0,125 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 42,88 % und mit 0,5 μM ADP 96,61 %. Dieser Unterschied war laut t-Test signifikant ($t(8) = -2,36, p < 0,05$).

Vergleich 0,5 μM ADP vs. 2 μM ADP: Mit 0,5 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 96,61 % und mit 2 μM ADP 125,87 %. Dieser Unterschied war laut t-Test signifikant ($t(8) = -5,63, p < 0,05$).

Vergleich 2 μM ADP vs. 0 μM ADP: Mit 2 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 125,87 % und mit 0 μM ADP 8,95 %. Dieser Unterschied war laut t-Test signifikant ($t(8) = -35,91, p < 0,05$).

3.3.2 Inhibierung in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration bei Zugabe von 100,000 CD133⁺-Zellen

Im Folgenden wurden die Amplituden-Änderungen bei steigenden ADP-Konzentrationen (0 μ M, 0,125 μ M, 0,5 μ M und 2 μ M) unter dem Einfluss von CD133⁺-Zellen untersucht (siehe Abb. 13).

Vergleich 0 μ M ADP vs. 0,125 μ M ADP: Ohne ADP Inhibierung im Mittel 9,34 % und mit 0,125 μ M ADP 39,03 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -1,04$, $p \geq 0,05$).

Vergleich 0,125 μ M ADP vs. 0,5 μ M ADP: Mit 0,125 μ M ADP betrug die Inhibierung im Mittel 39,03 % und mit 0,5 μ M ADP 53,21 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -0,63$, $p \geq 0,05$).

Vergleich 0,5 μ M ADP vs. 2 μ M ADP: Mit 0,5 μ M ADP betrug die Inhibierung im Mittel 53,21 % und mit 2 μ M ADP 61,27 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -0,35$, $p \geq 0,05$).

Vergleich 2 μ M ADP vs. 0 μ M ADP: Mit 2 μ M ADP betrug die Inhibierung im Mittel 61,27 % und mit 0 μ M ADP 9,34 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -1,79$, $p \geq 0,05$).

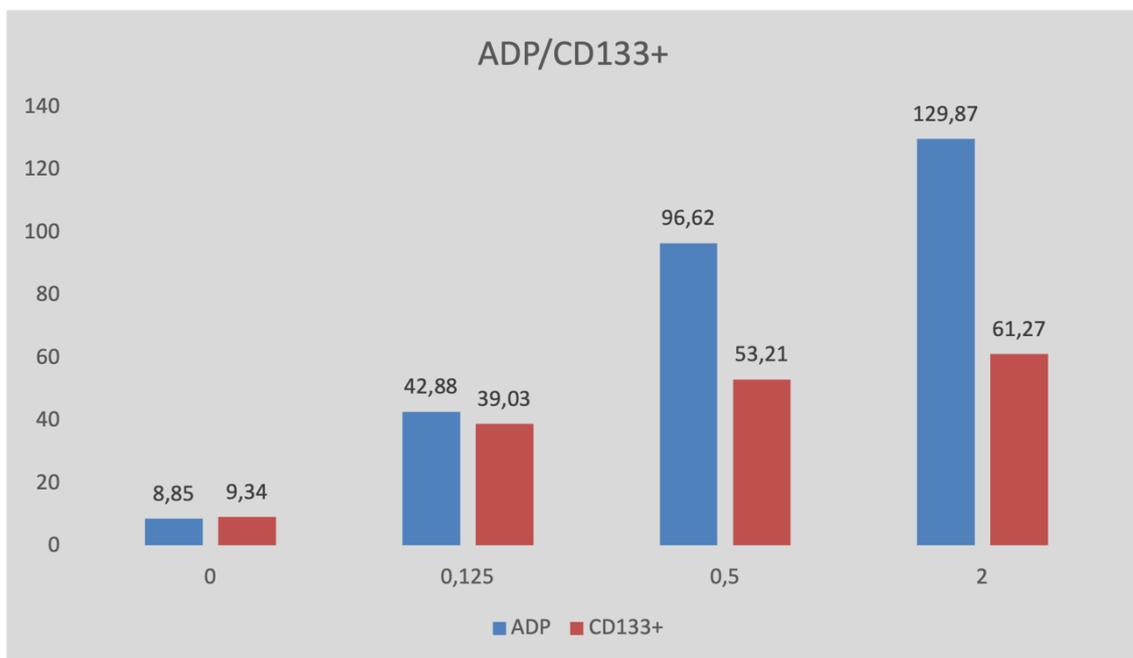


Abb. 13: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse – Inhibierung nach ADP-/CD133⁺KMSZ-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener ADP-Konzentrationen. Die Y-Achse zeigt die Inhibierung(%). Die Zahlen unter den Säulen stellt die ADP-Konzentration in μ M dar. ADP = Adenosindiphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

3.3.3 Inhibierung in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration bei Zugabe von 100,000 Fibroblasten

Die Inhibierung wurde bei steigenden ADP-Konzentrationen (0 μM , 0,125 μM , 0,5 μM und 2 μM) unter dem Einfluss von 100,000 Fibroblasten untersucht (siehe Abb. 14).

Vergleich 0 μM ADP vs. 0,125 μM ADP: Ohne ADP betrug die Inhibierung im Mittel 11,67 % und mit 0,125 μM ADP 24,4 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -1,65$, $p \geq 0,05$).

Vergleich 0,125 μM ADP vs. 0,5 μM ADP: Mit 0,125 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 24,4 % und mit 0,5 μM ADP 74,62 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -1,72$, $p \geq 0,05$).

Vergleich 0,5 μM ADP vs. 2 μM ADP: Mit 0,5 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 74,62 % und mit 2 μM ADP 117,06 %. Dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant und muss deshalb als zufällig aufgefasst werden ($t(8) = -1,02$, $p < 0,05$).

Vergleich 2 μM ADP vs. 0 μM ADP: Mit 2 μM ADP betrug die Inhibierung im Mittel 117,67 % und mit 0 μM ADP 11,67 %. Dieser Unterschied war laut t-Test signifikant ($t(8) = -5,19$, $p < 0,05$).

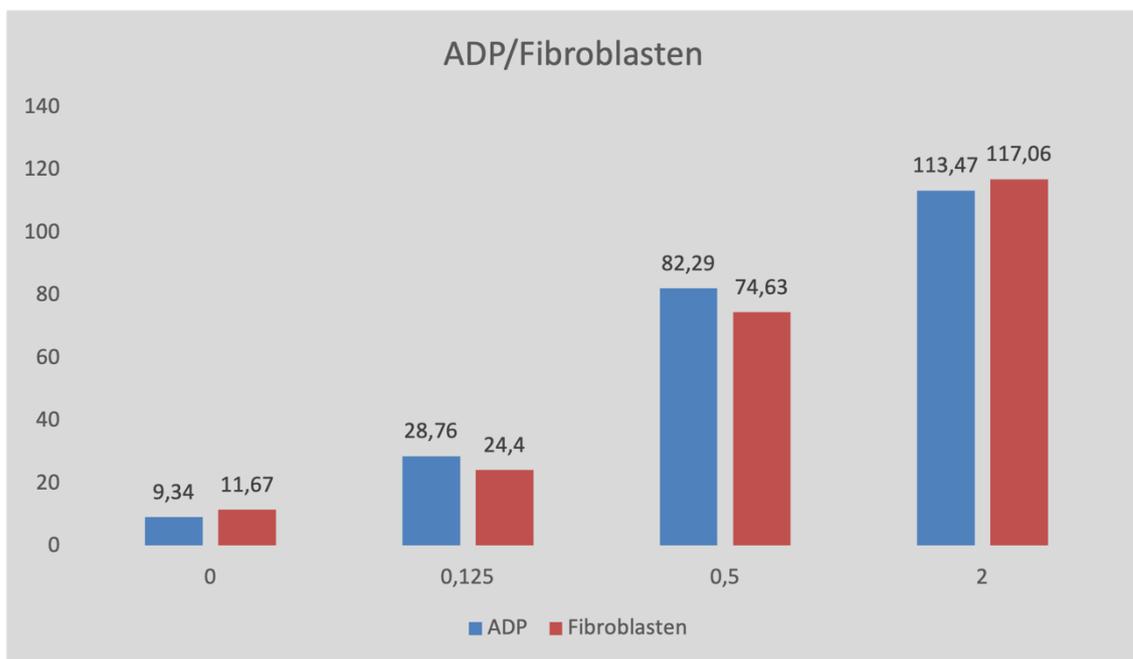


Abb. 14: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse- inhibierung nach ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse 4 verschiedener ADP-Konzentrationen in mikromolar. Die Y-Achse zeigt die Inhibierung (%). Die Zahlen unter den Säulen stellt die ADP-Konzentration in μM dar. ADP = Adenosin-diphosphat, CD = Cluster of differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzellen

4 Diskussion

Die Leber hat als größtes Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers neben diversen metabolischen Funktionen auch die Funktion einer exokrinen Drüse. Die Leber besteht aus verschiedenen Zelltypen (z. B. Hepatozyten, Kupfferzellen, Ovalzellen) und zeichnet sich durch eine enorme Regenerationsfähigkeit aus. Diese Regenerationsfähigkeit ist für die Prognose bei Leberresektionen bzw. -transplantationen von großer Bedeutung (Treska, 2016).

Basierend auf der Annahme, dass im Rahmen von Leberteilresektionen CD133⁺KMSZ vermehrt mobilisiert werden und die Leberregeneration fördern, wird ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten und CD133⁺KMSZ angenommen (Schulte am Esch et al., 2012; Schulte am Esch et al., 2005; Fürst et al., 2007). Nach einer Verletzung werden Thrombozyten zur Ausübung ihrer hämostatischen Funktion vermehrt mobilisiert. Thrombozyten spielen bei der Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in verletzte Endothelareale eine noch nicht vollständig geklärte Rolle (Lev et al., 2006). Hierbei fördern progenerative endotheliale Aktivierungsprozesse die durch hämatopoetische und vaskuläre Interaktionen vermittelte Leberregeneration (Shido et al., 2017). Der Regenerationsprozess wird durch das dynamische Zusammenspiel zwischen parenchymalen Hepatozyten, nicht parenchymalen Zellen (z. B. sinusoidale Endothelzellen der Leber) und hämatopoetische Zellen gesteuert (Ding et al., 2010). In der verletzten Leber triggern rekrutierte Thrombozyten die angiokrine Leber-Sinus-Endothelzellen Signalgebung, die die Regeneration in Gang setzt (Lesurtel et al., 2006; Zimmerman & Weyrich, 2008).

Präklinische und klinische Untersuchungen liefern Hinweise, dass eine erhöhte Anzahl an mobilisierten Thrombozyten mit einer besseren Prognose der Leberregeneration einhergeht (Kodama et al., 2010).

Einige Studien haben gezeigt, dass Thrombozyten einen starken Einfluss auf die Förderung der Leberregeneration haben. Dabei sind drei mögliche Mechanismen involviert (Takahashi et al., 2013). Dies ist zum einen die direkte Wirkung von Thrombozyten, die in den Disse-Raum wandern und durch den direkten Kontakt mit Hepatozyten Wachstumsfaktoren freisetzen. Thrombozyten fördern die Leberregeneration, indem sie die Expression von Hepatozytenwachstumsfaktoren und *insulin-like growth factor-1* stimulieren (Murata et al., 2008).

Zweitens spielt die Wechselwirkung mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber eine Rolle, bei der die hohe Konzentration von Sphingosin-1-phosphat in den Thrombozyten die Freisetzung von Interleukin-6 aus sinusoidalen Endothelzellen der Leber stimuliert

(Klinger, Jelkmann, 2002). Des Weiteren unterstützen Thrombozyten die Funktion von Kupffer Zellen.

Basierend auf der Erkenntnis, dass Thrombozyten eine ausschlaggebende Rolle in der Interaktion von Knochenmarkstammzellen mit dem Gefäßendothel erleichtern und somit das *Homing* von Knochenmarkstammzellen in die Leber beeinflussen, müssen die bisher wenig erforschten Mechanismen aufgeklärt werden. Vor dem Hintergrund, dass Thrombozyten die Adhäsion von CD133⁺KMSZ an das Gefäßendothel fördern, soll die vorliegende Dissertation die Rolle von CD133⁺KMSZ auf die Thrombozyten-Aggregation analysieren.

Die Grundlage für diese Arbeit bildet die Hypothese, dass CD133⁺KMSZ eine regulierende Funktion auf die Thrombozyten-Funktion im Rahmen der Leberregeneration besitzen. Die vorliegenden Versuche sollten zur Aufklärung der wenig erforschten Mechanismen zum *Homing* von CD133⁺KMSZ sowie zur Interaktion von CD133⁺KMSZ mit dem Endothel der Leber beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Inhibition der ADP-gesteuerten Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ.

4.1 Einfluss von ADP auf die Thrombozyten-Aggregation

Die Versuchsreihen basieren auf der Beobachtung, dass Agonisten wie ADP bei Thrombozyten zu messbaren Reaktionen wie eine Formänderung oder eine Ausschüttung von unterschiedlichen Substanzen, die das Milieu der Thrombozyten beeinflussen, führen (Jackson et al., 2007). Daraus resultiert eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (Savage et al., 1998).

Das Ausmaß der Thrombozyten-Aggregation bzw. der prozentualen Aggregation wurde anhand der maximalen Amplitude in der LTA-Methode nach Born gemessen. Basierend auf Vorversuchen zur Testung der Thrombozyten-Funktion (Dunne, 2015) wurden die ADP-Konzentrationen mit maximalem Effekt verwendet. In den vorliegenden LTA-Untersuchungen wurde 2,5–10 µM ADP und in den FACS-Versuchen 0–2 µM ADP eingesetzt.

Das Ausmaß der Thrombozyten-Aggregation wird durch multiple Faktoren beeinflusst; vor allem spielen das Alter und die Größe der Thrombozyten eine Rolle (Handtke et al. 2020). Sowohl bei den LTA- als auch bei den FACS-Untersuchungen ließ sich die bereits von Lev et al. (2006) nachgewiesene Aktivierung der Thrombozyten durch ADP bestätigen. Bei Zugabe von CD133⁺KMSZ nach Voraktivierung mit ADP kam es zu einer signifikanten Reduktion der Inhibition (%) ($t(45) = 1,93, p < 0,06$). In zukünftigen Studien wäre

es interessant den Effekt der CD133⁺KMSZ auch ohne eine vorangegangene Aktivierung mittels ADP auf die Aktivierung der Thrombozyten zu analysieren.

4.2 Effekt der ADP-Konzentration

Entscheidend für den Prozess der irreversiblen Thrombozyten-Aggregation ist die Thrombozyten-Konzentration sowie eine adäquate ADP-Konzentration. Eine zu niedrige ADP-Konzentration führt zu einer schwachen, reversiblen Thrombozyten-Aggregation (Gachet et al., 2000). Die Arbeitsgruppe Han et al. analysierte das Ausmaß der Thrombozyten-Aggregation in Abhängigkeit von der Thrombozyten-Zahl und Agonisten-Konzentration (Han et al., 2002). Eine hohe ADP-Konzentration geht mit vermehrter Thrombozyten-Aggregation einher. Dieser Effekt konnte sowohl in den Versuchsreihen mit Fibroblasten als auch mit CD133⁺KMSZ bestätigt werden. Für die Versuchsreihen wurde die ADP-Konzentration gewählt, die die Amplitude am stärksten beeinflusste, d. h. eine maximale Thrombozyten-Aggregation auslöst. Nach Zugabe von ADP kam es bei den LTA-Versuchsreihen mit CD133⁺KMSZ zu einer signifikanten Abnahme der Amplitude ($t(56) = 10,66$, $p < 0,001$). Bei den LTA-Versuchsreihen mit Fibroblasten als Kontrollzellen war ebenfalls eine signifikante Reduktion der Amplitude ($t(46)=12,86$, $p < 0,001$) nachweisbar. Im Vergleich zu den Fibroblasten war die Abnahme der Amplituden in den Versuchsreihen mit CD133⁺KMSZ deutlich signifikanter.

Die optimale Konzentration für eine Veränderung der Latenz und Stärke der Thrombozyten-Aggregation ist individuell variabel ($< 1-100 \mu\text{M}$). Eine zu niedrige ADP-Konzentration ($0,5-1 \mu\text{M}$) führt im Vergleich zu $100 \mu\text{M}$ zu einer langsamen initialen Thrombozyten-Aktivierung (O'Brien, 1962).

Aufgrund der extrem variablen und individuell unterschiedlichen adäquaten ADP-Konzentration wurde bei den FACS-Untersuchungen das Ausmaß von unterschiedlichen ADP-Konzentration auf die Thrombozyten-Aggregation näher betrachtet. Zur Aufklärung der Zusammenhänge sind in vivo Versuchsreihen mit höheren ADP-Konzentrationen notwendig. Es ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der ADP-Konzentration und der Inhibition der Thrombozyten-Aggregation in den FACS-Versuchsreihen.

4.3 Einfluss der CD133⁺KMSZ auf die Thrombozyten-Aggregation

Daten belegen die ausschlaggebende Rolle von Thrombozyten auf die Leberregeneration nach einer Leberteileresektion (Lesurtel, Clavien, 2014). Eine unzureichende Throm-

bozytenfunktion und -zahl hat große Auswirkungen auf die Leberperfusion und inflammatorische Vorgänge in Rahmen einer Leberteileresektion (Kazuhiro et al., 2013). Aufbauend auf der Erkenntnis, dass Thrombozyten eine modulierende Wirkung für das *Homing* von CD133⁺KMSZ besitzen (Schulte am Esch et al., 2012), ist es das Ziel dieser Arbeit die grundlegenden Mechanismen, die dazu führen, weiter aufzuklären. Die Steigerung der CD133⁺KMSZ Adhärenz an Endothelzellen der Lebersinusoiden ist eine Voraussetzung für die Mobilisation und die Akkumulation der CD133⁺KMSZ in das Lebergewebe (Chauhan et al., 2016).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Inhibition der Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ mittels LTA nach Born untersucht. Es kam zu einer signifikanten Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch die Ko-Inkubation mit CD133⁺KMSZ ($t(56) = 10,66$, $p < 0,001$) und Fibroblasten ($t(46) = 12,68$, $p < 0,001$). Die Fibroblasten als Kontrollzellen spielen bei der Hemmung der Thrombozyten-Aggregation keine wesentliche Rolle, da die Veränderung der Amplitude durch die Fibroblasten deutlich schwächer war. Vermutlich war dieser Effekt auf einer Abnahme der Lichttransmission durch die Zunahme der Zelldichte in den Lösungen zurückzuführen.

Die signifikante Reduktion der Amplitude in den Versuchen mit CD133⁺KMSZ im Vergleich zu Fibroblasten ($t(46) = -9,4$, $p < 0,001$) bestätigte die Hypothese einer Thrombozyten-Aggregationshemmung durch CD133⁺KMSZ. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden die Versuchsreihen mit Fibroblasten durchgeführt, da die Zelllinie (*Cos-7*) keine hydrolysierende Eigenschaft besitzt (Kaczmarek et al., 1996, Schulte am Esch et al., 1999). Die Veränderung der Amplitude durch die Fibroblasten als negative Kontrolle war erwartungsgemäß deutlich schwächer.

Parallel zu den LTA-Versuchsreihen wurde in den FACS Versuchsreihen die Bindung von FITC-markiertem Fibrinogen an GPIIb/IIIa von aktivierten Thrombozyten analysiert. Auch hier zeigte sich eine eindeutige Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation nach Zugabe von CD133⁺- KMSZ ($t(81) = 5,55$, $p < 0,001$). Analog zu den oben genannten Arbeiten konnten die Daten dieser Arbeit nahelegen, dass CD133⁺KMSZ Thrombozyten in Ihrer Aggregabilität kontrollieren. Es konnte ein Mechanismus aufgezeigt werden, der es CD133⁺KMSZ in zu regenerierenden Organen, wie der Leber ermöglicht, Thrombozyten und deren Interaktionspotential mit Endothel zum Homing zu nutzen, ohne dass eine überschießende, ADP-abhängige und kontraproduktive Thrombosierung lokal ausgelöst wird.

4.4 Effekt der CD133⁺KMSZ-Zellzahl

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss variabler Mengen von CD133⁺KMSZ auf die Thrombozyten-Aggregation, bei gleichbleibender ADP-Konzentration bestimmt. Zugefügt wurden 7500, 15000, 30000 und 50000 Zellen.

Unabhängig von der eingesetzten Menge der CD133⁺KMSZ kam es in den LTA-Versuchen zu einer signifikanten Veränderung der Amplitude. Die Amplitude zeigte sich stets signifikant reduziert. In den Versuchsreihen war das Ausmaß der Veränderungen der Amplituden bei unterschiedlichen CD133⁺KMSZ-Mengen nicht signifikant. Damit hing die Veränderung der Amplitude nicht von der CD133⁺KMSZ-Zahl ab.

4.5 Einfluss der CD39/NTPDase auf die die Thrombozyten-Aggregation

Bei biochemischen und physikalischen Verletzungen der Gefäße trägt die Interaktion von Thrombozyten mit dem Gefäßendothel und Blutkomponenten über verschiedene Mechanismen zur Erhaltung der Homöostase bei. Dazu zählen die Eicosanoid-(Prostacyclin und Thromboxan) vermittelte Zell-Interaktion, die Stickstoffmonoxid-(NO)-vermittelte Interaktion zwischen Thrombozyten sowie der Abbau von ADP durch die CD39/NTPDase (Pinsky et al., 2002). CD39 spielt eine Rolle bei der interzellulären Interaktion. Dabei könnte die Interaktion mit zellulären Integrinen ausschlaggebend sein (Maliszewski et al., 1994). Es ist anzunehmen, dass die Wechselwirkungen zwischen CD39 und Adenosinnukleotiden die Zellsignalisierung und die Integrinkonstellation beeinflussen kann. Eine mögliche Erklärung der Interaktion zwischen Thrombozyten und CD39⁺KMSZ ist die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch die CD39/ecto-ADPase (Marcus et al., 2005).

Der Wirkmechanismus von CD133⁺KMSZ unter besonderer Berücksichtigung der CD39⁺-KMSZ auf die Thrombozyten-Aggregation ist bislang aber nicht ausreichend untersucht. Auf der Grundlage molekularen und antigener Similarität zwischen CD39 und ATPDase wurden die hydrolysierenden biochemischen Eigenschaften durch CD39 nachgewiesen. Studien belegen, dass ADP eine Schlüsselrolle in der Thrombozyten-Aggregation spielt. Auf der Basis dieser Befunde postulieren die Autoren eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch die Hydrolyse des für die Hämostase kritischen ADPs durch die ecto-NTPDase (Robson et al., 2006). Um den Effekt der Thrombozytenaggregationshemmung alleine durch CD39 und nicht durch COS-7 Zellen nachweisen zu können, wurden mit pCDNA3-CD39 transfizierte Zellen durch die Arbeitsgruppe Kaczmarek et al. untersucht (Kaczmarek et al., 1996). Analog zu den Ergebnissen der Negativkontroll-Versuchsreihen dieser Arbeit mit COS-7 Zellen (Fibroblasten), konnten

ausschließlich Zellen, die mit pCDNA3-CD39 transfiziert wurden und Zellen, die CD39 exprimieren, eine Hemmung der Thrombozytenaggregation hervorbringen. Alleinige COS-7 Zellen erbrachten keine Thrombozytenaggregationshemmung.

Die Thrombozyten-Aggregation wirkt pro-inflammatorisch. CD39⁺-KMSZ sind entscheidend für die chemotaktische Rekrutierung von weiteren KMSZ. Diese Rekrutierung wirkt anti-inflammatorisch und hemmt die Ausschüttung inflammatorischer Interleukine, was zur Leberregeneration beiträgt (Schmelzle et al., 2013). Die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch die ecto-ADPase verbessert die Leberperfusion und ermöglicht so eine schnellere Regeneration der Leber (Fausto, 2000).

Die ADP-vermittelte Thrombozyten-Aggregation und die Rekrutierung weiterer pro-homeostatischer Zellen wird durch die Hydrolyse von Tri- und Diphosphonukleosiden durch CD39 unterbunden (Sevigny et al., 2002). Die vorliegende Arbeit bietet eine mögliche Erklärung, dass die Thrombozyten-Aggregation über CD39-vermittelte Signalwege und durch die Interaktion von Endothelialzellen mit angrenzenden Zellen beeinflusst wird und somit die Leberregeneration fördert. Die Analysen belegen eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch die CD133⁺KMSZ.

In Zukunft könnte der therapeutische Einsatz von CD39⁺-KMSZ von enormer Bedeutung sein. Aufgrund der Hemmung der ADP-induzierten Thrombozyten-Aggregation könnten CD39⁺-KMSZ sowohl bei okklusiven zerebrovaskulären (Jackson, 2007) als auch bei kardiovaskulären (Varga-Szabo et al., 2008) Ereignissen eingesetzt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit war eine individuell isolierte Untersuchung von CD39⁺-KMSZ in den FACS-Versuchen nicht sinnvoll umsetzbar. Hauptursächlich war dies aufgrund der geringen Fallzahl bzw. war hier kein sinnvoller statistischer Vergleich durchzuführen. Ein alternativer Ansatz um diese Frage weiter zu verfolgen, wäre eine Versuchsreihe, welche die o.g. Interaktion in vitro untersucht (z.B. Tierexperimentell), ohne von einem zuvor Rekrutierten Patientenkollektiv abzuhängen. Dieser Aspekt ist in humanen Studien immer wieder ein limitierender Faktor. Zusätzlich sind für die Beantwortung dieser Frage weiterführende Versuche wie Beispielsweise cDNA-Synthese sowie Expressionsanalysen von NTPasen mittels Q-PCR erforderlich.

4.6 Unterschied zwischen CD133⁺KMSZ und Fibroblasten

In den LTA-Versuchen kam es unabhängig von der Anzahl der zugefügten CD133⁺KMSZ zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude ($t(56) = 10,66$, $p < 0,001$). Auch in den Kontroll-Versuchsreihe mit Fibroblasten war eine Reduktion der Amplitude ($t(46) = 12,857$, $p < 0,001$) nachweisbar; dieser Effekt war jedoch deutlich schwächer als

bei den CD133⁺KMSZ. Vermutlich war die Abnahme der Lichttransmission in der Versuchsreihe mit den Fibroblasten auf eine Zunahme der Zelldichte in den Lösungen zurückzuführen. Fibroblasten (Cos-7 Zellen) sind nicht in der Lage, die Thrombozyten-Aggregation zu hemmen, da sie kaum CD39 exprimieren (Kaczmarek et al., 1996). Die Modulation der Thrombozyten-Aggregation ist somit spezifisch für die CD133⁺KMSZ. Auf Basis dieser Grunderkenntnis konnte die Hemmung der ADP-Abhängigen Thrombozyten-Aggregation durch CD133⁺KMSZ (Schulte am Esch et al., 1999) näher gelegt werden. Demnach wurden in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls Fibroblasten als Kontroll-Versuchsreihe verwendet.

4.7 Einfluss der Herkunft der Stammzellen

Bei der Etablierung einer standardisierten Methodik für diese Arbeit wurde angedacht, Knochenmarkstammzellen sowohl aus Apheresaten als auch aus Knochenmarkpunktionen zu verwenden. Knochenmarkstammzellen bestehen aus Hämatopoetischen Stammzellen und mesenchymalen Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen werden durch CD34 und CD133 gekennzeichnet (Yin et al., 1997; Krause et al., 1996). Mesenchymal Zellen hingegen weisen keine CD34 auf (Handgretinger et al., 2003).

Nach der Gabe von *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) werden mononucleäre Zellen aus dem peripheren Blut entnommen. Die aus Apheresaten gewonnenen KMSZ zeigten im Vergleich zu denen aus Knochenmarkpunktionen eine signifikant schwächere Inhibition der Thrombozyten-Aggregation (Chantzichristos et al., 2018). Laut verschiedenen Studien (Newsome et al., 2018; Korbling & Anderlini, 2001) unterscheiden sich Stammzellen aus Apheresaten und aus Knochenmarkspunktion in ihren rekonstitutiven und immunogenen Eigenschaften. CD39 wird auf Endothelzellen, Lymphozyten und Leukozyten exprimiert (Kansas et al., 1991). In Leukozyten moduliert das Enzym Zytokinexpressionen, Entzündungsreaktionen sowie Zell-zu-Zell Adhäsion (Mizumoto et al., 2002). Eine mögliche Erklärung der ADP-abhängigen Thrombozytenaggregationsausmaßes ist der verstärkte ADP-Stoffwechsel aufgrund einer höheren Konzentration von Leukozytenassoziiertem CD39 (Glenn et al., 2008). Die Erklärung unterstützt die ausschlaggebende Rolle der CD39/NTPDase auf die Thrombozytenaggregationshemmung. Inwiefern diese Unterschiede im klinischen therapeutischen Rahmen eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Grundsätzlich wäre die Überlegung eine Kombinationstherapieverfahren aus G-CSF Gabe und portalvenen Implantation von CD133⁺KMSZ zu etablieren. Die aktuelle Datenlage ist jedoch unschlüssig. Newsome et al. konnte keine Verbesserung des Schweregrads einer Lebererkrankung vorweisen (Newsome et al., 2018). Einige Studien zeigten jedoch einen Nutzen allein durch die

Mobilisierung von Stammzellen bei Leberzirrhose Patient*innen nach Verabreichung von G-CSF (Spahr et al., 2008; Garg et al., 2011).

4.8 Limitationen

Einer der wesentlichen limitierenden Faktoren in der hier vorliegenden Arbeit, ist wie bereits oben erwähnt, die Tatsache, dass es sich um eine humane Studie handelt. Daher sind alle Ergebnisse immer stark abhängig von der Anzahl des rekrutierten Patientenkollektivs. Dabei müssen insbesondere auch immer mögliche Einschluss- und Ausschlusskriterien berücksichtigt werden (siehe Methodik Patientenkollektiv 2.2). Hierbei ist insbesondere auch eine Standardisierung des Patientenkollektivs nur eingeschränkt möglich.

Beispielsweise konnte der mögliche Einfluss der Medikation der Spendenden auf die Thrombozyten-Aggregation nur unzureichend berücksichtigt werden. Nicht nur antikoagulierende Medikamente beeinflussen die Thrombozyten-Funktion. Auch andere Arzneien wie Antibiotika, Antidepressiva oder Beta-Blocker, die nicht primär als Thrombozyten-Aggregationshemmer wirken, können diese verändern.

Das Ausmaß der Thrombozyten-Aggregation hängt zudem vom Fibrinogen-Gehalt der Proben ab. Bei den vorliegenden Experimenten wurde die Rolle der Fibrinogen-Konzentration nicht gemessen.

Bei den Versuchen zur Amplituden-Änderungen in Abhängigkeit von der Anzahl der CD133⁺KMSZ bzw. Fibroblasten und der ADP-Konzentration war die Fallzahl ($N < 10$) für eine statistische Auswertung zu gering. Es waren lediglich deskriptive Betrachtungen (z. B. Mittelwert, Standardabweichung) möglich. Der für eine aussagekräftige statistische Auswertung erforderliche t-Test erfordert neben einem metrischen Datenniveau bei der abhängigen Variablen eine Normalverteilung der Daten. Der Test auf Normalverteilung war bei kleinem N aber nicht möglich. Weiterführende Messungen wie Regressionsanalysen waren aufgrund der kleinen Fallzahl ebenfalls nicht möglich.

Für eine Erhebung valider Daten ist eine Erhöhung der Anzahl an Proband*innen notwendig oder eine Erhöhung der CD133⁺KM-Gesamtzellzahl. Dies könnte beispielsweise erreicht werden, durch ein Pooling der gespendeten CD133⁺KMSZ. Dies wäre prinzipiell möglich, da nach Aufreinigung des gespendeten Knochenmarks, sich abhängig von Spender*innen eine variable Anzahl von CD133⁺KMSZ gewinnen lässt.

4.9 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch CD133⁺KMSZ die ADP-abhängige Thrombozytenaggregation gehemmt wird. Diese Arbeit bietet einen Ansatz um die, für die Leberregeneration ausschlagenden *Homing*-Prozesse besser einordnen zu können. Die Steuerung der Thrombozyten-Aggregation sowie die Thrombo- und Angiogenese, die durch verschiedene Faktoren wie inflammatorischer Stress, Immunreaktionen moduliert wird, spielen eine bedeutende Rolle für die Leberregeneration. Eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und somit eine Freistellung der verfügbaren Thrombozyten und die Steuerung einer überschießenden Thrombozytenaggregation fördert die Leberregeneration und so das klinische Outcome der Patienten zu verbessern.

Hierbei wird postuliert, dass für die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und -Aktivität eine Co-Expression der ecto-ADPase CD39 erforderlich ist. Diese Hypothese konnte durch die vorliegenden Daten jedoch nicht belegt werden. Hierfür sind, wie bereits im Abschnitt Limitationen erwähnt, noch weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv und entsprechend höherer Fallzahl notwendig.

Bibliografie

- Abulkhir, A., Limongelli, P., Healey A.J., Damrah, O., Tait, P., Jackson, J., Habib, N., Jiao, L.R. *Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis*. Ann Surg, 2008. **247**(1): 49-57.
- Aldeguer, X., Debonera, F., Shaked, A., Krasinkas, A.M., Gelman, A.E., Que, X., Zamir, G.A., Hiroyasu, S., Kovalovich, K.K., Taub, R., Olthoff, K.M. *Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration*. Hepatology, 2002. **35**(1): 40-8.
- Alessi, M. C., et al. *Strengths and Weaknesses of Light Transmission Aggregometry in Diagnosing Hereditary Platelet Function Disorders*. J Clin Med 2020 **9**(3).
- Alison, M.R., Poulson, R., Jefferey, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., Wright, N.A. *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. Nature, 2000. **406**(6793): 257.
- Almeida-Porada G, Zanjani ED, Porada CD. Bone marrow stem cells and liver regeneration. Exp Hematol. 2010 Jul;**38**(7):574-80
- Altin, J.G., Sloan, E.K. *The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation*. Immunol Cell Biol, 1997. **75**(5): 430-45.
- Andrews, R.G., Singer, J.W., Bernstein, I.D. *Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties*. J Exp Med, 1989. **169**(5): 1721-31.
- Atkinson, B., Dwyer, K., Enyoji, K., Robson, S.C. *Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): 217-22.
- Bismuth, H. *Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver*. World J Surg, 1982. **6**(1): 3-9.
- Brancatisano, R., Isla, A., Habib, N. *Is radical hepatic surgery safe?* Am J Surg, 1998. **175**(2): 161-3.
- Brass, L.F., Mannin, D.R., Cichowski, K., Abrams, C.S. *Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): 581-9.
- Broering, D.C., Hilert, C., Krupski, G., Fischer, L., Mueller, L., Achilles, E.G., Schulte am Esch, J., Rogiers, X. *Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant*. J Gastrointest Surg, 2002. **6**(6): p. 905–13; discussion 913.
- Brown, J., Greaves, M.F., Molgaard, H.V. *The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts*. Int Immunol, 1991. **3**(2): 175-84.
- Carty, D. J. and A. R. Gear (1986). *Fractionation of platelets according to size: functional and biochemical characteristics*. Am J Hematol **21**(1): 1-14.

- Carpino G, Renzi A, Franchitto A, Cardinale V, Onori P, Reid L, Alvaro D, Gaudio E. Stem/Progenitor Cell Niches Involved in Hepatic and Biliary Regeneration. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3658013
- Chauhan A, Adams DH, Watson SP, Lalor PF. Platelets: No longer bystanders in liver disease. *Hepatology.* 2016 Nov;64(5):1774-1784
- Chantzichristos VG, Gkrozou F, Stellos K, Paschopoulos ME, Tselepis AD. Comparative Anti-Platelet Profiling Reveals a Potent Anti-Aggregatory Effect of CD34+ Progenitor Cell-Derived Late-Outgrowth Endothelial Cells in vitro. *J Vasc Res.* 2018;55(1):13-25
- Couinaud, C. *Surgical anatomy of the liver revisited.* Paris: Selbstverlag, 1989.
- Dasari, B.V., Kamarajah, S.K., Hodson, J., Pawlik, T.M., Vauthey, J.N., Ma, Y.T., Punia, P., Coldham, C., Abradelo, M., Roberts, K.J., Marudanayagam, R., Sutcliffe, R.P., Muiesan, P., Mirza, D.F., Isaac, J. *Development and validation of a risk score to predict the overall survival following surgical resection of hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver.* *HPB (Oxford)*, 2020. **22**(3): 383-90.
- Ding, B.S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V, Kobayashi, H, Shido, K., Lyden, D., Sato, T.N., Rabbany, S.Y., Rafil, S. (*Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration.*" *Nature*, 2010. **468**(7321): 310-5.
- Duhme, C., Lehwald, N., Kehrel, B.E., Bauchrowitz, E., Ngepi, A., Schmelzle, M., Kolokotronis, T., Benhidjeb, T., Krüger, M., Jurk, K., Knoefel, W.T., Robson, S.C., Schulte Am Esch, J. *CD133⁺ bone marrow stem cells (BMSC) control platelet activation - Role of ectoNTPDase-1 (CD39).* *Blood Cells Mol Dis*, 2019. **77**: 142-8.
- Dunne, E., Egan Dunne, E., et al. (2016). *Platelet aggregation in response to ADP is highly variable in normal donors and patients on anti-platelet medication.* *Clin Chem Lab Med* **54**(7): 1269–1273.
- Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol.* 2003 Sep;39(3):357-64
- Fasel, J.H.D. *Human liver territories: Think beyond the 8-segments scheme.* *Clin Anat*, 2017. **30**(7): 974-7.
- Fausto, N., Laird, A.D., Webber, E.M. *Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration.* *FASEB J*, 1995. **9**(15): 1527-36.
- Fausto, N. *Liver regeneration.* *J Hepatol*, 2000. **32**(1 Suppl): 19-31.
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J. *Liver regeneration.* *Hepatology*, 2006. **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 2003 Jan;120(1):117-30.
- Franchi, E., Canepa, M.C., Peloso, A., Barbieri, L., Briani, L., Panyor, G., Dionigi, P., Maestri, M. *Two-stage hepatectomy after autologous CD133⁺ stem cells administration: a case report.* *World J Surg Oncol*, 2013. **11**(1): 192.

- Fujii, H., Hirose, T., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Fujikawa, T., Nagao, M., Yamaoka, Y. *Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice.* J Hepatol, 2002. **36**(5): 653-9.
- Fürst, G., Schulte am Esch, G., 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. *Portal vein embolization and autologous CD133⁺ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience.* Radiology, 2007. **243**(1): 171-9.
- Gachet, C. (2000). "Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists." Ann Med **32 Suppl 1**: 15-20.
- Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. Gastroenterology. 2012 Mar;142(3):505-512
- 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. *Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors.* J Hepatol, 2005. **43**(5): 845-53.
- Glenn JR, White AE, Johnson AJ, Fox SC, Myers B, Heptinstall S. Raised levels of CD39 in leucocytosis result in marked inhibition of ADP-induced platelet aggregation via rapid ADP hydrolysis. Platelets. 2008 Feb;19(1):59-69
- Gray, H. *Henry Gray's Anatomy of the Human Body.* Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1918.
- Grompe M. Bone marrow-derived hepatocytes. Novartis Found Symp. 2005;265:20-7; discussion 28-34, 92-7
- Han, S. M., et al. (2017). *Research on Relation of Platelet Aggregation Rate with Platelet Concentration in Platelet-Rich Plasma.* Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **25**(2): 582-586.
- Handgretinger, R., Gordon, P.R., Leimig, T., Chen, X., Buhring H.J., Niethammer, D., Kuci, S. *Biology and plasticity of CD133⁺ hematopoietic stem cells.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: 141-51.
- Handtke, S. and T. Thiele (2020). *Large and small platelets-(When) do they differ?*J Thromb Haemost **18**(6): 1256–1267.
- Harb, R., Xie, G., Lutzko, C., Guo, Y., Wang, X., Hill, C.K., Kanel, G.C., DeLeve, L.D. *Bone marrow progenitor cells repair rat hepatic sinusoidal endothelial cells after liver injury.* Gastroenterology, 2009. **137**(2): 704-12.
- Jackson, S.P. *The growing complexity of platelet aggregation.* Blood, 2007. **109**(12): 5087-95.
- Jahagirdar, B.N., Verfaillie, C.M. *Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity.* Stem Cell Rev, 2005. **1**(1): 53-9.

- Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J.B., Anrather, J., Beaudoin, A.R., Bach, F.H., Robson, S.C. *Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): 33116-22.
- Kahner, B.N., Shankar, H., Murugappan, S., Prasad, G.L., Kunapuli, S.P: *Nucleotide receptor signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(11): 2317-26.
- Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. J Immunol. 1991 Apr 1;146(7):2235-44
- Klein, H.M., Ghodsizad, A., Borowski, A., Saleh, A., Draganov, J., Poll, L., Stoldt, V., Feifel, N., Piecharczek, E.R., Stockschröder, M., Gams, E. *Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in combination with TMLR. A novel therapeutic option for endstage coronary heart disease: report on 2 cases*. Heart Surg Forum, 2004. **7**(5): E416-9.
- Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. J Interferon Cytokine Res. 2002 Sep;22(9):913-2
- Kodama, T., Takehara, T., Hikita, H., Shimizu, S., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Tadokoro, S., Ido, A., Tsubouchi, H., Hayashi, N. *Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice*." Gastroenterology, 2010. **138**(7): 2487-98, 2498.e1-7.
- Korbling, M., Anderlini, P. *Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?* Blood, 2001 **98**(10): 2900-8.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., May, W.S. *CD34: structure, biology, and clinical utility*. Blood, 1996. **87**(1): 1-13.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med. 2000 Nov;6(11):1229-34.
- Lesurtel M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin: translational implications for liver regeneration. Hepatology. 2014 Jul;60(1):30-3.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., Clavien, P.A. *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration*. Science, 2006. **312**(5770): 104-7.
- Lev, E.I., Estrov, Z., Aboufatova, K., Harris, D., Granada, J.F., Alviar, C., Kleiman, N.S., Dong, J.F. *Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix*. Thromb Haemost, 2006. **96**(4): 498-504.
- Lüllmann-Rauch, R., 2019. Histologie , 6. Aufl., Thieme
- Macchi F, Sadler KC. Unraveling the Epigenetic Basis of Liver Development, Regeneration and Disease. Trends Genet. 2020 Aug;36(8):587-597

- Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*. 1994 Oct 15;153(8):3574-83
- Marcus, A. J., et al. (2005). *Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection*. *Semin Thromb Hemost* **31**(2): 234-246.
- McNicol, A., Israels, S.J. *Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection*. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2008. **8**(2): 99-117.
- Michalopoulos GK, Khan Z. Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(4):876-882
- Michalopoulos, G.K. *Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control*. *FASEB J*, 1990. **4**(2): 176-87.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):2-13.
- Michalopoulos GK, Barua L, Bowen WC. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):535-44.
- Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):358-65
- Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J. *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. *Cell*, 1997. **88**(3): 287-98.
- Murata S, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Hashimoto I, Ohkohchi N. Platelets promote liver regeneration under conditions of Kupffer cell depletion after hepatectomy in mice. *World J Surg*. 2008 Jun;32(6):1088-96
- Narula, N., Aloia, T.A. *Portal vein embolization in extended liver resection*. *Langenbecks Arch Surg*, 2017. **402**(5): 727-35.
- Nejak-Bowen K. If It Looks Like a Duct and Acts Like a Duct: On the Role of Reprogrammed Hepatocytes in Cholangiopathies. *Gene Expr*. 2020 Jun 12;20(1):19-23
- Newsome, P. N., Fox, R., King, A.L., Barton, D., Than, N.N., Moore, J, Corbett, C., Townsend, S., Thomas, J., Guo, K., Hull, D., Beard, H.A., Thompson, J., Atkinson, A., Bienek, C., McGowan, N., Guha, N., Campbell, J., Hollyman, D., Stocken, D., Yap, C., Forbes, S.J. *Granulocyte colony-stimulating factor and autologous CD133-positive stem-cell therapy in liver cirrhosis (REALISTIC): an open-label, randomised, controlled phase 2 trial*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018. **3**(1): 25-36.

- Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1891-900
- O'Brien: Platelet aggregation: *Part II Some results from a new method of study*. *J Clin Pathol* **15**(5): 452-455
- Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*. 1985 Aug 15;56(4):918-28
- Omata M, Cheng AL, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, Tateishi R, Han KH, Chawla YK, Shiina S, Jafri W, Payawal DA, Ohki T, Ogasawara S, Chen PJ, Lesmana CRA, Lesmana LA, Gani RA, Obi S, Dokmeci AK, Sarin SK. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int*. 2017 Jul;11(4):317-370.
- Pagano, D., Gruttadauria, S. *Impact of future remnant liver volume on post-hepatectomy regeneration in non-cirrhotic livers*. *Front Surg*, 2014. **1**: 10.
- Patzelt, J., Langer, H.F. *Platelets in angiogenesis*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012. **10**(5): 570-7.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. *Science*, 1999. **284**(5417): 1168-70.
- Pinsky, D. J., et al. (2002). *Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain*. *J Clin Invest* **109**(8): 1031–1040.
- Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006 Jan;43(1):108-16
- Rassow, J., Netzker, R., Hauser, K. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme, 2016.
- Robson, S.C., Wu, Y., Sun, X., Knosalla, C., Dwyer, K., Enjoji K. *Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation*. *Semin Thromb Hemost*, 2005. **31**(2): 217-33.
- Robson, S.C., Sevigny, J., Zimmermann, H. *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. *Purinergic Signal*, 2006. **2**(2): 409-30.
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytiroglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004 Jun;39(6):1739-45.

- Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z.M. *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): 657-66.
- Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. Hepatology. 1999 Dec;30(6):1339-46
- Schaub JR, Malato Y, Gormond C, Willenbring H. Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury. Cell Rep. 2014 Aug 21;8(4):933-9
- Sevigny, J., et al. (2002). *Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation*. Blood **99**(8): 2801–2809.
- Schindl, M.J., Readhead, D.N., Fearon, K.C.H., Garden, o. J., Wigmore, S.J. *The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection*. Gut, 2005. **54**(2): 289-96.
- 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., Schule Am Esch, J., Robson, S.C. *CD39 modulates hematopoietic stem cell recruitment and promotes liver regeneration in mice and humans after partial hepatectomy*. Ann Surg, 2013. **257**(4): 693-701.
- Schmidt-Lang-Thews, Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie , 29.Aufl.,Springer
- Schneider, P.D. *Preoperative assessment of liver function*. Surg Clin North Am, 2004. **84**(2): 355-73.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. *Prometheus – LernAtlas der Anatomie: Innere Organe*. Stuttgart: Thieme, 2015.
- Schulte am Esch, J., 2nd, Sévigny, J., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Imai, M., Koziak, K., Beaudoin, A.R., Robson, S.C. *Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity*. Biochemistry, 1999. **38**(8): 2248-58.
- Schulte am Esch, J.S., 2nd, Knoefel, W.T., Klein, M., Ghodsizad, A., Fuerst, G., Poll, L.W., Piechaczek, C., Burchardt, E.R., Feifel, N., Stoldt, V., Stockscläder, M., Stoecklein, N., Tustas, R.Y., Eisenberger, C.F., Peiper, M., Häussinger, D., Hosch, S.B. *Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration*. Stem Cells, 2005. **23**(4): 463-70.
- Schulte 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. *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, 2012. **255**(1): 79-85.

- Shido, K., Chavez, D., Cao, Z., Ko, J., Rafii, S., Ding, B.S. *Platelets prime hematopoietic and vascular niche to drive angiocrine-mediated liver regeneration*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: 16044.
- Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, Chalandon Y, Frossard JL, Giostra E, Hadengue A. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. Hepatology. 2008 Jul;48(1):221-9.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schümichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M., Steinhoff, G. *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. Lancet, 2003. **361**(9351): 45-6.
- Takahashi K, Murata S, Ohkohchi N. Novel therapy for liver regeneration by increasing the number of platelets. Surg Today. 2013 Oct;43(10):1081-7
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):542-5
- Treska, V. *Methods to Increase Future Liver Remnant Volume in Patients with Primarily Unresectable Colorectal Liver Metastases: Current State and Future Perspectives*. Anticancer Res, 2016. **36**(5): 2065-71.
- Truant, S., Oberlin, O., Sergent, G., Lebuffe, G., Gambiez, L., Ernst, O., Pruvot, F.R. *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, 2007. **204**(1): 22-33.
- Ueno, T., Nakamura, T., Torimura, T., Sata, M. *Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis*. Med Mol Morphol, 2006. **39**(1): 16-21.
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., Nieswandt, B. *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): 403-12.
- Vassilopoulos, G., Wang, P.R., Russell, D.W. *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature, 2003. **422**(6934): 901-4.
- Vestentoft PS. Development and molecular composition of the hepatic progenitor cell niche. Dan Med J. 2013 May;60(5):B4640.
- Vyas, M., Jain, D. *A practical diagnostic approach to hepatic masses*. Indian J Pathol Microbiol, 2018. **61**(1): 2-17.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., Grompe, M. *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. Nature, 2003. **422**(6934): 897-901.
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., McCuskey, R.S. *The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse*. Hepatology, 1985. **5**(4): 683-92.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J., Fausto, N. *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): 1441-6.

- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002-12
- Yuan H, Wen B, Liu X, Gao C, Yang R, Wang L, Chen S, Chen Z, de The H, Zhou J, Zhu J. CCAAT/enhancer-binding protein α is required for hepatic outgrowth via the p53 pathway in zebrafish. *Sci Rep*. 2015 Oct 29;5:15838
- Zhao X, Monson C, Gao C, Gouon-Evans V, Matsumoto N, Sadler KC, Friedman SL. Klf6/copeb is required for hepatic outgrowth in zebrafish and for hepatocyte specification in mouse ES cells. *Dev Biol*. 2010 Aug 1;344(1):79-93
- Zimmerman, G.A., Weyrich, A.S. *Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(3): s17-24.

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Darstellung der linken und rechten Leberlappen, getrennt durch das Ligamentum falciforme	4
Abb. 2: Hämatopoetische Differenzierung	8
Abb. 3: Verwendete Methoden	17
Abb. 4: Schematische Darstellung der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born.....	22
Abb. 5: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Induzierte Thrombozyten-Aggregation nach Adenosindiphosphat-(ADP)-Gabe.....	23
Abb. 6: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %) nach Adenosindiphosphat-(ADP)-Gabe	24
Abb. 7: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %)nach Gabe von Adenosindiphosphat (ADP) und CD133 ⁺ -Knochenmarksstammzellen (KMSZ)	25
Abb. 8: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Veränderung des Transmissionsverlaufs (Zunahme der Lichttransmission in %)nach Gabe von Adenosindiphosphat (ADP) und Fibroblasten)	26
Abb. 9: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/CD133 ⁺ KMSZ-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener CD133 ⁺ KMSZ-Zahlen.....	30
Abb. 10: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau)– Analyse verschiedener Fibroblasten-Zahlen	31
Abb. 11: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Amplitude nach ADP-/CD133 ⁺ KMSZ-Gabe (grün) bzw. ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener Zellzahlen	33
Abb. 12: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse –Inhibierung nach ADP-/CD133 ⁺ -Gabe (rot), nach ADP-/Fibroblasten-Gabe nach ADP-/CD133 ⁺ -Gabe (rot), e (grün), und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener ADP-Konzentrationen.....	34
Abb. 13: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse – Inhibierung nach ADP-/CD133 ⁺ KMSZ-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse verschiedener ADP-Konzentrationen	36
Abb. 14: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse- inhibierung nach ADP-/Fibroblasten-Gabe (rot) und alleiniger ADP-Gabe (blau) – Analyse 4 verschiedener ADP-Konzentrationen in mikroMolar	37

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Adenosindiphosphat-(ADP)-Konzentration und Verdünnungsverhältnisse für die <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (FACS)-Analyse	28
Tabelle 2: Zellsuspension für die FACS-Analyse der mit ADP aktivierten Thrombozyten und CD133 ⁺ KMSZ und Fibroblasten als Kontrollzellen	29
Tabelle 3: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Statistische Auswertung der Veränderung der Amplitude nach ADP-/CD133 ⁺ KMSZ-Gabe und alleiniger ADP-Gabe	31
Tabelle 4: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) – Statistische Auswertung der Veränderung der Amplitude nach ADP-/Fibroblasten-Gabe und alleiniger ADP-Gabe	32
Tabelle 5: Statistische Auswertung der Amplituden Veränderungen Dieser Unterschied war laut t-Test nicht signifikant und muss daher als zufällig aufgefasst werden.....	33
Tabelle 6: Statistische Auswertung der Amplituden Veränderungen bei unterschiedlichen Fibroblasten-Zellzahlen. Dieser Unterschied war laut t-Test nicht signifikant und muss daher als zufällig aufgefasst werden	34

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt für Herrn Prof. Schulte am Esch für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können. An dieser Stelle möchte ich für die enorme Unterstützung, Geduld und Ermutigung bei der Durchführung der gesamten Arbeit meinen Dank aussprechen. Dr. rer. nat Constanze Duhme und Maria Wecker danke ich für die hervorragende Betreuung.

Auch meinen Eltern und meinen Brüdern möchte ich für die anhaltende Unterstützung danken. Außerdem möchte ich Martin Wagner, Tobias Schwarz, Mathias Leiter, Sven Möser, Rebekka Suwelack, Tim und Kathrin Gießelmann, Janek Becker, Christopher Brotzki, Till Breckner, die mich auf meinem Weg mit Rat und lieben Worten begleitet haben, meinen Dank aussprechen.