

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von Melatonin auf die nephroprotektive Wirkung von Endothelprogenitorzellen im Mausmodell

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Axel Hildebrandt, geb. Schmidt

aus

Marburg an der Lahn

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: PD Dr. med. D. Patschan

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. K. Schäfer

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2012

Inhalt

Liste der Abkürzungen.....	5
1. Einleitung.....	6
2. Stand der Forschung und Zielsetzung.....	9
2.1. Stand der Forschung.....	9
2.2. Zielsetzung.....	12
3. Materialien und Methode.....	13
3.1. EPC-Kulturen aus Mäusen.....	13
3.2. Markieren der Zellen vor systemischer Injektion.....	14
3.3. Inkubation der Zellen mit Melatonin / Melatonin und Luzindol.....	15
3.4. Operationstechniken.....	15
3.4.1. Injektion der Zellen / Ischämie.....	16
3.4.2. Blut- / Organentnahme.....	17
3.5. Dünnschnitte zur Durchlichtmikroskopie.....	17
3.6. Dünnschnitte zur Immunfluoreszenzhistologie.....	19
3.7. Bestimmung des Serumkreatinins.....	20
3.8. In-vitro-Versuche zur VEGF-Freisetzung aus EPCs.....	22
3.8.1. 'Mouse-Endothel-Progenitor-Cell'-Kultur.....	22
3.8.2. Inkubation der Zellen mit Melatonin und TGF- β	24
3.8.3. Ermittlung der VEGF-Freisetzung aus EPCs mittels ELISA.....	24
3.9. Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Geräte.....	29
3.10. Statistische Auswertung.....	31
4. Eigene Ergebnisse.....	32
4.1. Untersuchungsgruppen und Nierenfunktion nach Injektion von unbehandelten und in vitro vorbehandelten EPCs.....	32
4.1.1. Ergebnisse der Kreatininmessungen.....	32
4.1.2. Auswertung der Paraffinschnitte in PAS Färbung.....	35
4.1.3. Auswertung Immunfluoreszenzmikroskopie.....	38
4.2. Freisetzung von VEGF unter dem Einfluss von Melatonin in vitro...38	
5. Diskussion.....	40

6. Zusammenfassung.....	45
7. Anhang.....	47
7.1. Abbildungsverzeichnis	47
7.2. Tabellenverzeichnis	47
8. Literaturverzeichnis	48

Liste der Abkürzungen

ANV: **A**kutes **N**ierenversagen
(iANV: **i**schämisches ANV)

BSA: **B**ovine-serum-**A**lbumin

CCGM: Celprogen-**c**omplete-**g**rowth-**M**edium

CD: **C**luster of **d**ifferentiation

CFU-EC: **C**olony-**f**orming-**u**nit-**e**ndothelial-**c**ells

DAPI: 4',6-**d**iamidino-2-**p**henylindol

EBM: **E**ndothelial-**b**asal **m**edium

EDTA: **E**thylendiamintetraacetat

EHSPT: N-Ethyl-N-(2-**h**ydroxy-3-**s**ulfopropyl)-m-**t**oluidin

ELISA: **E**nzym-linked **i**mmuno sorbent **a**ssay

EPAC: **E**xchange **p**rotein directly **a**ctivated by **c**AMP

EPAC1-Ac: EPAC1 **a**ctivator
(=8-pCPT-2'-O-Me-cAMP)

EPC: **E**ndothelial **p**rogenitor **c**ells
= Endothelvorläuferzellen

FACS: **F**luorescence-**a**ctivated **c**ell-**s**orter

FITC: **F**luoresceinisothiocyanat

G-CSF: **G**ranulocyte **c**olony-**s**timulating **f**actor

GM-CSF: **G**ranulocyte **m**acrophage **c**olony-**s**timulating **f**actor

HGF: **H**epatocyte **g**rowth **f**actor

HRP: **H**orseradishperoxidase

HUVEC: **H**uman-**u**mbilical-**v**ein **e**ndothelial **c**ell

iANV: **I**schämisches **A**kutes **N**ierenversagen

IGF: **I**nsulin-like **g**rowth **f**actor

KDR: **K**inase insert **d**omain **r**eceptor (=Flk)

MAPC: **M**ultipotent **a**dult **p**rogenitor **c**ells

MSCs: **M**esenchymal **s**tem **c**ells

MT-Rezeptor: **M**elatonin-**R**ezeptor

PAS-Färbung: **P**eriodic-**a**cid-**S**chiff-Färbung

PBS: **P**hosphate-**b**uffered **s**aline

P-Wert: **W**ahrscheinlichkeitswert (**p**robability-value)

SDF: **S**tromal cell-**d**erived **f**actor

SEM: **S**tandard **e**rror of the **m**ean

SVF: **S**tromal-**v**ascular-**f**raction-**c**ells

TGf β : **T**issue **g**rowth **f**actor β

TMB: **T**etramethylbenzidin

VEGF: **V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines Forschungsprojektes, welches sich mit dem therapeutischen Einsatz von Endothelvorläuferzellen (EPCs) bei akuten mikrovaskulären renalen Funktionsstörungen als Ursache des akuten Nierenversagens beschäftigt.

Die Inzidenz des akuten Nierenversagens (ANV) liegt bei stationär behandelten Patienten bei 5%, in der intensivmedizinischen Betreuung sogar bei bis zu 30 % (KRIBBEN et al., 2003). Trotz verschiedener prophylaktischer und, bei manifestem ANV, therapeutischer Maßnahmen ist die Prognose der Erkrankung immer noch verhältnismäßig schlecht. Die Etablierung einer suffizienteren Behandlung ist Gegenstand vieler aktueller nephrologischer Forschungsprojekte.

Endothelvorläuferzellen entwickeln sich präferentiell aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Sie sind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Blut permanent vorhanden und beteiligen sich sowohl an der Neubildung als auch an der Reparatur von Gefäßen (ASAHARA et al., 1997, 1999; KHAKOO und FINKEL, 2005; URBICH und DIMMELER, 2004b). Diese Eigenschaften der Zellen sind die Grundlage des zu erforschenden Therapieansatzes.

Unter einem akuten Nierenversagen versteht man eine plötzliche Verschlechterung der Nierenfunktion, immer gekennzeichnet durch einen Anstieg der Nierenretentionsparameter um wenigstens 50% des Ausgangswertes, in den meisten Fällen (70%) begleitet von einer reduzierten Urinproduktion (Oligo-Anurie) (KRIBBEN et al., 2003). Diese kann innerhalb von Stunden bis Tagen eintreten und ist prinzipiell reversibel.

Akutes ischämisches Nierenversagen

Das akute ischämische Nierenversagen ist die insgesamt häufigste Form des ANV. Ursache ist eine inadäquat stark ausgeprägte bzw. lang anhaltende generalisierte Minderdurchblutung des Organs. Als hierfür verantwortliche Ursachen finden sich im klinischen Alltag Blutungen, eine schwere Herzinsuffizienz sowie schwere generalisierte, insbesondere bakterielle Infektionen (Sep-

sis). Neben der Schädigung der Tubulusepithelzellen, welcher beim akuten ischämischen Nierenversagen eine zentrale Bedeutung zukommt, sind auch Prozesse beteiligt, die auf strukturelle Veränderungen renaler Endothelzellen zurückzuführen sind (GOLIGORSKY, 2005). Diese strukturellen Veränderungen imponieren in Form von Schwellungen der Endothelzellen. Dadurch wird die Reperfusion der Endstrombahn inhibiert (‘no-reflow’ - Phänomen) (LEAF, 1973). Eine Erholung der Nierenfunktion findet dementsprechend nur verzögert statt (BRODSKY et al., 2002). Insgesamt erholt sich die renale Mikrozirkulation der Nieren über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden. Die Kapillaren verengen und erweitern sich dabei oszillierend (YAMAMOTO et al., 2002).

In Abschnitt 2.3. wird eingehender auf bereits durchgeführte Untersuchungen eingegangen, die zeigen, dass der Erholungsprozess durch die systemische Gabe von EPCs beschleunigt wird (PATSHAN et al., 2006a; BRODSKY et al., 2002). Das Thema der Arbeit baut auf diesen Untersuchungen auf.

Prinzipielle nephroprotektive Wirksamkeit von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen

Die nephroprotektive Wirkung von EPC wurde bereits tierexperimentell nachgewiesen (PATSHAN et al., 2006 a+b). Dabei wurden Nieren von männlichen C57Bl/6N-Mäusen über verschiedene Zeiträume von der Blutzufuhr abgeschnitten, wodurch ein ischämischer ANV induziert wurde. Unmittelbar nach Reperfusion der Nieren wurden dem venösen Kreislauf EPCs zugeführt und nach zwei Tagen die Nierenfunktion bestimmt (Bestimmung des Kreatininwertes). Zudem wurden die Organe der Tiere, ergänzt um eine fluoreszenzmikroskopische Analyse, morphologisch untersucht. Die letztere diente der Beurteilung der Verteilung der Zellen im Gewebe. Die Menge der zugeführten Zellen sowie die Dauer der Ischämie wurden dabei variiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein ANV bis zu einer Ischämiezeit von 35 Minuten erfolgreich verhindert wird, wenn die Tiere jeweils $0,5 \times 10^6$ unbehandelte syngene EPCs systemisch verabreicht bekommen. Wurde die Ischämiezeit auf 40 Minuten verlängert, zeigte die Gabe der gleichen Zellpopulation keinen therapeutischen Effekt mehr.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach einer Strategie gesucht, mit deren Hilfe das nephroprotektive Potential von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen verstärkt werden kann. Kürzlich konnten erstmals agonistische Effekte des Hormons Melatonin auf sogenannte mesenchymale Stammzellen belegt werden (MIAS et al., 2008). Dementsprechend wurde nun evaluiert, ob das Hormon vergleichbare Wirkungen auch auf murine EPCs entfalten kann. EPCs wurden mit Melatonin vorbehandelt. Die Ischämiezeiten sowie die jeweilige Menge an EPCs wurden bei den Experimenten stets konstant gehalten. Es wurden vier Gruppen untersucht. Tieren der Versuchsgruppe 1 wurde nach 40 Minuten Ischämie physiologische Kochsalzlösung injiziert. In Versuchsgruppe 2 wurden nach der Ischämie $0,5 \times 10^6$ unbehandelte Zellen appliziert. In Versuchsgruppe 3 wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen, vorbehandelt mit Melatonin in bereits etablierter Stimulationskonzentration und in Versuchsgruppe 4 die gleiche Anzahl von Zellen, vorbehandelt mit Melatonin und dem Melatoninantagonisten Luzindol verabreicht. Ergänzend erfolgten morphologische Analysen der Nieren. Schließlich wurde die Freisetzung des gefäßprotektiven Faktors VEGF aus kultivierten EPCs unter dem Einfluss von Melatonin analysiert.

2. Stand der Forschung und Zielsetzung

2.1. Stand der Forschung

Die Neubildung und Proliferation von Blutgefäßen findet sowohl während der Embryonalperiode als auch während des gesamten postnatalen Lebens statt. Nach der Geburt nimmt beispielsweise die Kapillardichte in Skelett- und Herzmuskulatur infolge körperlichen Trainings oder aufgrund des natürlichen Körperwachstums zu. Auch verschiedene Krankheitsprozesse, wie beispielsweise malignes Gefäßwachstum, sind durch Neoangiogenese gekennzeichnet. Prinzipiell werden zwei Arten der Gefäßneubildung unterschieden. Zum einen werden neue Arteriolen, Venolen und Kapillaren durch Proliferation ortständiger, reifer Endothelzellen und anderer Gefäßwandzellen gebildet, zum anderen können unreife Vorläufer- (Progenitor-) bzw. Stammzellen neue Gefäße bilden. Der erste Prozess wird als *Angiogenese* (KHAKOO und FINKEL, 2005; URBICH und DIMMELER, 2004b), der zweite Prozess als *Vaskulogenese* bezeichnet (PATSHAN et al., 2006b; BAILEY et al., 2004).

Bei der Vaskulogenese handelt es sich nicht, wie lange Zeit angenommen, um einen Vorgang, der auf die embryonale Phase, also auf die Phase, in der alle Organe bzw. Gewebe erstmalig ausgebildet werden, begrenzt ist. Vaskulogenese findet tatsächlich auch im adulten Vertebratenorganismus kontinuierlich statt. Dabei spielen endotheliale Vorläuferzellen (Endothelvorläuferzellen, endothelial progenitor cells, EPCs) eine herausragende Rolle.

EPCs wurden 1997 erstmals von ASAHARA et al. beschrieben. Dabei wurden CD³⁴⁺-Leukozyten aus humanem Blut isoliert und unter definierten Bedingungen kultiviert. Die Zellen wiesen nach einigen Tagen typische Charakteristika endothelialer Zellen auf, und zwar sowohl morphologisch als auch hinsichtlich des Oberflächenmarkerprofils.

Die Zellen wurden Versuchstieren mit Extremitäten-Ischämien injiziert. Dabei zeigte sich, dass die funktionelle Erholung im postischämischen Gewebe schneller voranging als in Kontrolltieren, denen diese Zellen nicht injiziert worden waren. Die injizierten Zellen konnten mikroskopisch in den Wänden der Kapillaren des reperfundierten Gewebes nachgewiesen werden.

Die mittlerweile sehr intensiv untersuchte Population von EPCs wird durch Zellen repräsentiert, die sich mit aller Wahrscheinlichkeit überwiegend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln (BAILEY et al., 2004; GRANT et al., 2002). Auch andere Zelltypen sind bereits als mögliche Vorläufer beschrieben worden, z.B. sogenannte multipotente adulte Vorläuferzellen (multipotent adult progenitor cells – MAPCs) im Knochenmark (URBICH und DIMMELER, 2004a; REYES et al., 2002), des Weiteren bestimmte Subtypen von Fettgewebezellen (cultured stromal-vascular fraction (SVF) cells) (PLANAT-BENARD et al., 2004) sowie schließlich kardiale Progenitorzellen (BELTRAMI et al., 2003). EPCs, die sich von den genannten Zelltypen ableiten, finden sich im Blut präferentiell innerhalb der Monozytenfraktion (ROMAGNANI et al., 2005). Sie exprimieren einerseits verschiedene „unreife“ (c-Kit, CD34, CD133 (RAFII und LYDEN, 2003)), andererseits verschiedene endotheliale Zellmarker wie KDR bzw. Flk-1 (humaner bzw. muriner Rezeptor-Typ 2 für VEGF (KHAKOO und FINKEL, 2005)), Tie-2 (Rezeptor für Angiotensin-1 (WAKUI et al., 2006)) und CD31 (PECAM-1, endotheliales Zelladhäsionsmolekül (BALDWIN et al., 1994)). In Kultur wachsen sie in EBM-2-Medium auf Fibronectin-beschichteten Platten nach ca. 5-7 Tagen an. In aktuelleren Arbeiten werden sie als 'colony forming unit endothelial cells' (CFU-ECs) definiert (CASE et al., 2007; YODER et al., 2007).

Nach systemischer Applikation von CFU-ECs im Tiermodell war eine Ischämie-protective Wirkung zu beobachten: knochenmarktransplantierte Mäuse mit iatrogenem Herzinfarkt zeigten im postischämischen Verlauf eine Inkorporation von CFU-ECs in den Randbereich des infarzierten Myokards („Grenzzone“) - die Mehrzahl der Zellen stammte dabei vom Spenderorganismus ab (ASAHARA et al., 1999; SCHUSTER et al., 2004). Klinische Untersuchungen bewiesen weiterhin, dass peripher zirkulierende CFU-ECs bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit vermindert sind (ADAMS et al., 2004; LAMBIASE et al., 2004). Die Angaben bezüglich der Frequenz der Zellen im Blut variieren stark. Üblicherweise werden Endothelvorläuferzellen prozentual zur mononukleären Zellpopulation in Beziehung gesetzt. Die niedrigsten in der Literatur publizierten Werte belaufen sich auf 0,0001% (INGRAM et al., 2005), die höchsten Werte liegen bei 12% (HIASA et al., 2004).

Die Detektion und Quantifizierung von Endothelvorläuferzellen aus dem Blut, dem Knochenmark oder der Milz kann entweder kulturell (‘colony forming unit assay’ (HEESCHEN et al., 2003)) oder durchflusszytometrisch (fluorescence activated cell sorter analysis – FACS analysis (LAMBIASE et al., 2004)) erfolgen. Im Rahmen des ersten Verfahrens werden die in Kultur wachsenden „koloniebildenden“ Zellen auf die Expression verschiedener endothelialer Marker untersucht. Im Rahmen des zweiten Verfahrens werden Zellen innerhalb der monozytären Fraktion auf die Koexpression von „unreifen“ (CD34, CD133, c-Kit) und endothelialen Markern (KDR bzw. Flk-1, Tie-2, CD31) analysiert. Durch dieses Verfahren sollen Zellen erkannt werden, die zwar einerseits noch nicht vollständig ausgereift sind (Zellen mit Stamm- bzw. Vorläuferzellpotential), die jedoch andererseits bereits Differenzierungsmerkmale von Endothelzellen aufweisen.

Die zellulären Mechanismen der EPC-vermittelten Vasoprotektion sind nicht auf eine direkte vasale Inkorporation und weitere endotheliale Differenzierung der Zellen beschränkt. Rehmann et al. konnten zeigen, dass kultivierte EPCs verschiedene angiogene Wachstumsfaktoren (VEGF, HGF, G-CSF, GM-CSF) sezernieren (REHMAN et al., 2003). Diese können in-vivo vermutlich eine Rückbildung von potentiell reversiblen Endothelveränderungen vermitteln (z.B. ischämieassoziierte Zellschwellungen mit Einengung des Gefäßlumens) (URBICH und DIMMELER, 2004a).

Erste wegweisende Untersuchungen über die Bedeutung von EPCs für das akute Nierenversagen wurden 2002 durch die Arbeitsgruppe von Prof. Goligorsky vorgestellt (YAMAMOTO et al., 2002). Immuninkompetente Ratten (‘nude rats’) mit beidseitiger renaler Ischämie erhielten systemische Injektionen von so genannten ‘human umbilical vein endothelial cells’ (HUVECs – ausgereifte humane Endothelzellen). Die Nierenfunktion behandelter Tiere verbesserte sich signifikant schneller als jene von entsprechenden Kontrollen. Histologisch waren im weiteren Verlauf injizierte Zellen sowohl in den tubulären als auch glomerulären Kapillarwänden nachweisbar. Dieser Befund deutete daraufhin, dass die infundierten Zellen die strukturelle und funktionelle Erholung der Kapillaren beschleunigt, und dadurch eine raschere Wiederherstellung der Nierenfunktion begünstigt hatten. In einer Anfang 2006 von Dr. Patschan publizierten Arbeit (PATZCHAN et al., 2006a) wurde dann erstmalig die prinzipielle thera-

apeutische Anwendbarkeit von Endothelvorläuferzellen zur Behandlung des akuten ischämischen Nierenversagens gezeigt.

Im Jahr 2009 wurde zudem eine erste Strategie erarbeitet, mit deren Hilfe das nephroprotektive Potential von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen signifikant verstärkt werden kann: durch die *in-vitro*-Vorbehandlung der Zellen mit dem Integrinrezeptoraktivator 8-O-cAMP kommt es zu einem verstärkten 'homing' syngener muriner EPCs in die Nieren von postischämischen Mäusen. Dadurch können sie am Ort der Minderperfusion verstärkt reparativ wirken (PATSHAN, 2010).

2.2. Zielsetzung

Das derzeitig prinzipielle Ziel des laufenden Projektes besteht in der Identifizierung von weiteren, potentiell EPC-agonistischen Substanzen beim akuten ischämischen Nierenversagen. Kürzlich wurden erstmals agonistische Effekte des Hormons Melatonin auf so genannte mesenchymale Stammzellen belegt (MIAS et al., 2008). Aus diesem Grund bestand das Ziel der aktuellen Arbeit darin, herauszufinden, ob Melatonin ebenfalls die nephroprotektiven Wirkungen von syngeneten murinen EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen verstärken kann.

3. Materialien und Methode

3.1. EPC-Kulturen aus Mäusen

EPCs, die im Rahmen der Arbeit in postischämische Versuchsmäuse injiziert wurden, waren zuvor aus syngenen, 8-12 Wochen alten, männlichen C57Bl/6N-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) isoliert und kultiviert worden. Die Zellen wurden jeweils aus Vollblut sowie den Milzen der Tiere isoliert. Die Zellisolation erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Die Tiere wurden vor den jeweiligen Eingriffen anästhesiert. Als Anästhetikum diente ein Gemisch aus Xylazin (Analgetikum) und Ketamin (Narkotikum mit analgetischer Wirkung). Dafür wurden 520 µl einer vorgefertigten Lösung (Firma SIGMA – ALDRICH, Katalog Nr.: K-113), die die Stoffe Ketamin und Xylazin enthält (10 ml enthalten 800 mg Ketamine HCl und 120 mg Xylazine HCl), mit jeweils 6,8 ml destilliertem Wasser gemischt. Von dieser Mischung wurden der Maus ca. 300 – 400 µl durch Injektion in die Peritonealhöhle verabreicht.

Wenn das Tier sicher anästhesiert war („Wachheitsprobe“ mit der Pinzette an der Schwanzspitze der Tieres), wurde der Bauchraum eröffnet und mit einer Spritze transdiaphragmal Blut aus dem schlagenden Herzen entnommen. In die Spritze wurde zuvor ein Tropfen Heparin aufgezogen (Heparin-Natrium 25000, Firma RATIOPHARM, Katalog Nr.: N21086.21-Z04), um die Blutgerinnung zu hemmen. Die Spritze mit dem Vollblut wurde auf Eis gelegt.

Die Milz wurde entnommen, in ein 15-ml-Greiner-Röhrchen überführt und in 2 ml EBM-2 (EBM-2, 'Endothelial Basal Medium-2', Firma LONZA, Katalog Nr.: CC-3156) mittels eines Spritzenkolbens homogenisiert.

Sowohl die Vollblutprobe als auch das Milz-Homogenat wurden gemeinsam in ein 50-ml-Greiner Röhrchen auf 'Biocoll separating solution' (Firma BIO-CHROM AG, Katalog Nr.: L6115) der Dichte 1,077 g / ml überschichtet. Zur Dichtentrennung wurden die Greiner-Röhrchen dann für 30 Minuten bei 1400 U / min (ohne „Bremse“) zentrifugiert (Zentrifuge der Firma BECKMANN Typ: G5-6R).

Die mononukleäre Zellfraktion wurde mit einer 1000 µl-Pipette in ein 50-ml-Gefäß überführt und mit EBM-2-Medium auf 40 ml aufgefüllt.

Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1400 U / min (mit „Bremse“) zentrifugiert und anschließend in 2 ml EBM-2 resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einer Neubauerkammer gezählt und so verdünnt, dass jeweils $2-4 \times 10^6$ EPCs in 2 ml EBM-2 gelöst waren.

Je 2 ml dieser Lösung wurden dann in eine Vertiefung einer 6-well-Kulturplatte pipettiert, welche zuvor mit Fibronektin beschichtet worden war (Fibronektin der Firma SIGMA – ALDRICH, F0895 – 1MG).

Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2. Markieren der Zellen vor systemischer Injektion

Um nach systemischer Injektion von kultivierten EPCs die Menge der jeweils in die postischämischen Nieren eingewanderten Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen mit einem speziellen Farbstoff markiert.

Nach Absaugen des Mediums wurden jeweils 200 µl Trypsin-Lösung zugegeben, diese wurde bei 37°C für etwa 5 Minuten auf den Zellen belassen. Im zweiten Schritt wurden die Zellen mit 500 µl EBM-2 von der Kulturplattenfläche „abgespült“ (Verwendung einer Pipette). Das Gemisch wurde in ein 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1400 U / min zentrifugiert. 50 µg eines speziellen Farbstoffes (‘cell tracker®’ - CM-Dil, Firma INVITROGEN, Katalog Nr.: C700) wurden in 50 µl Ethanol (100%) gelöst. Diese Lösung wurde mit EBM-2 in einem Verhältnis 1:1000 gemischt (z.B. 1µl Lösung in 999µl EBM-2). Die Zellen wurden in 1 ml dieser Lösung resuspendiert, für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und danach für 15 Minuten auf Eis gelegt.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen in einer Neubauerkammer erneut ausgezählt, mit EBM-2 auf 12 ml aufgefüllt und schließlich für 10 Minuten bei 1400 U / min zentrifugiert.

Die Zellen wurden danach so in EBM-2 resuspendiert, dass sich eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen je 50 µl ergab. Dann wurden sie in die Injektionspritze aufgezogen.

3.3. Inkubation der Zellen mit Melatonin / Melatonin und Luzindol

In zwei Versuchsgruppen wurden EPCs vor der Injektion mit Melatonin (Firma SIGMA – ALDRICH, Katalog Nr.: M5250-1G) in-vitro vorbehandelt. Um die Spezifität der evtl. bestehenden Melatoninwirkung zu validieren, wurde ein etablierter, unselektiver MT-1 und -2-Rezeptorantagonist (Luzindol - Firma SIGMA, Katalog Nr.: L2707) eingesetzt. Die Zellen dieser Gruppe wurden sowohl mit Melatonin als auch mit Luzindol inkubiert.

Melatonin wurde in EBM-2 auf eine Konzentration von 100 pg / ml verdünnt und die Zellen damit für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die bereits dargestellte Farbmarkierung der Zellen (s.o.). In einigen Experimenten wurde Luzindol in 30 mmolarer Konzentration zusammen mit Melatonin (wie oben beschrieben) für die Zellvorbehandlung verwendet.

3.4. Operationstechniken

Prinzipielles Vorgehen

Die Ergebnisse der Arbeit wurden auf der Grundlage von Tierexperimenten erhoben. Die korrekte und gewissenhafte Durchführung der notwendigen Operationen wurde durch den Tierschutzbeauftragten Herrn Prof. Dr. H. Jarry überprüft. Nach erfolgreicher Abnahme der Operation durch Herrn Prof. Jarry wurde eine „Ausnahmegenehmigung“ des Landes erteilt. Im Rahmen der Experimente wurden die Tiere jeweils zwei Operationen unterzogen. Bei der ersten Operation wurde die linke Niere für 40 Minuten mittels spezieller Gefäßklemmen okkludiert, wodurch eine Ischämie erzeugt wurde. Um den Gefäßstiel der rechten Niere wurde eine Nahtschlinge platziert. Nach Ablauf der 40 Minuten wurde die linke Niere durch Entfernen der Klemme reperfundiert, gleichzeitig wurden unbehandelte oder mit Melatonin (\pm Luzindol) vorbehandelte EPCs in die kontralaterale Nierenvene injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurde der Gefäßstiel der rechten Niere mit der Nahtschlinge verschlossen und die Niere komplett entfernt. Dadurch wurde ein akutes ischämisches Nierenversagen induziert. Achtundvierzig Stunden später wurde die, im Rahmen der OP für 40 Minuten abgeklemmte Niere entnommen, zudem wurde das Blut der Tiere zur Beurteilung der Nierenfunktion gewonnen.

3.4.1. Injektion der Zellen / Ischämie

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte wie bereits unter 3.1 beschrieben. Nachdem die Maus anästhesiert war, wurde der Bauchraum durch einen Schnitt eröffnet. Zunächst wurden die Hautschicht und danach die Muskelschicht median auf einer Länge von ca. 2 cm eingeschnitten. Beim Eröffnen des Bauchraumes musste eine Verletzung innerer Organe, insbesondere des Darmes vermieden werden.

Die Wundränder wurden mit sterilen Tüchern abgedeckt und durch physiologische Kochsalzlösung feucht gehalten. Mithilfe von Wattestäbchen, ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet, wurde die linke Niere aufgesucht. Dabei wurden die Darmschlingen auf das Tuch rechts der Wunde gelegt, mit einem sterilen Tuch abgedeckt und gleichfalls feucht gehalten.

Die Blutzufuhr der linken Niere wurde dann durch das Anbringen einer Klemme an den Nierengefäßstiel unterbrochen. Der Abklemmzeitpunkt wurde notiert.

Nach dem Abklemmen wurde die rechte Niere aufgesucht und mobilisiert. Um das rechte Nierengefäß wurde eine Ligatur gelegt.

Nach 40 Minuten wurde die Klemme um den linken Nierengefäßstamm entfernt. Innerhalb von 2 Minuten nach Reperfusion der linken Niere wurden 50 µl der Injektionslösung (zellhaltig oder zellfrei) in das Gefäß der rechten Niere mittels einer Insulinspritze injiziert. Die Einstichstelle musste distal der Ligatur liegen. Nach Entfernen der Spritze wurde die eventuelle Blutung durch sofortiges Zuziehen der Nahtschlinge gestoppt. Das Auftreten einer leichten Blutung, die sofort nach dem Zuziehen der Ligatur zum Erliegen kommt, war ein Hinweis darauf, dass die Injektionsnadel das Gefäß richtig getroffen hatte.

Die rechte Niere wurde entfernt und die Bauchdecke durch zwei Nähte verschlossen (Muskelschicht und Hautschicht wurden jeweils durch eine fortlaufende Naht verschlossen).

Das Ergebnis der Operation war, dass eine Niere, die einer definierten Ischämie unterzogen wurde, die komplette Nierenfunktion alleine übernimmt. Um zu untersuchen, welche Auswirkungen EPCs auf die Nierenfunktion dieser vorgeschädigten Niere haben, wurden diese nach der Wiederdurchblutung in den Blutkreislauf injiziert und konnten so in die betroffenen Gewebe gelangen.

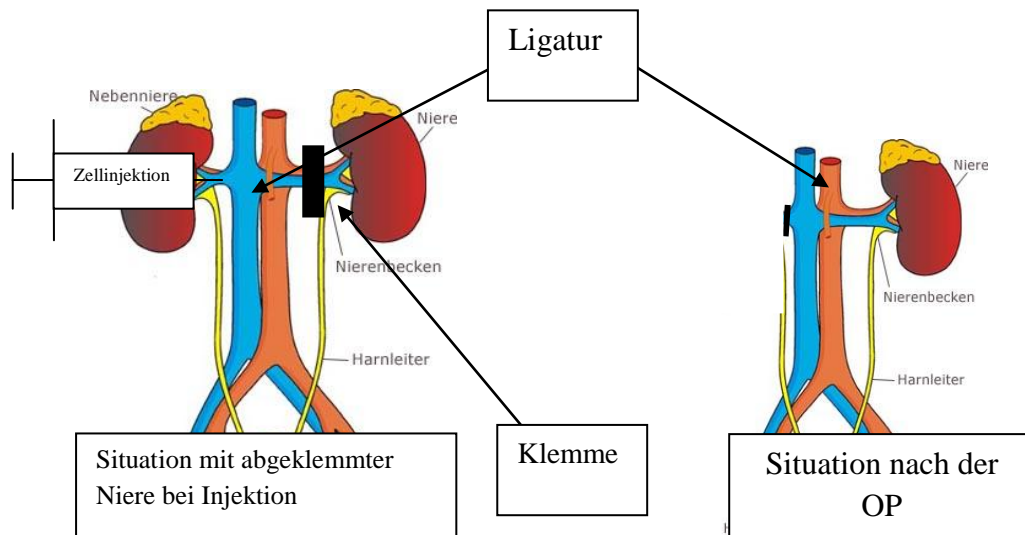


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Operationstechnik (Grundlage der Abb. nach: <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Funktion-Lage.4192.0.html>)

3.4.2. Blut- / Organentnahme

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass die Nierenfunktion von Mäusen ca. 48h nach einer Ischämie am stärksten beeinträchtigt ist (PATZCHAN et al., 2006b). Dementsprechend wurden die Tiere nach 2 Tagen getötet, um Blut und Nieren gewinnen bzw. entnehmen zu können. Die Anästhesie erfolgte wie bereits dargestellt. Der Bauchraum wurde eröffnet, wobei diesmal ein T – Schnitt durchgeführt wurde, der seine laterale Extension unterhalb des Zwerchfells hatte. Dabei war es wichtig, das Zwerchfell intakt zu lassen. Mit einer Insulinspritze wurde durch das Zwerchfell das schlagende Herz punktiert und Blut zur Kreatininbestimmung entnommen (ca. 300 µl reichten aus). Danach wurde die Maus getötet und die linke Niere entnommen.

3.5. Dünnschnitte zur Durchlichtmikroskopie

Die Nieren wurden nach der Entnahme zunächst in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für die Herstellung von Dünnschnitten zur konventionellen histologischen Analyse verwendet, die andere Hälfte zur Herstellung von Kryoschnitten für fluoreszenzhistologische Analysen (s.u.).

Die Organhälften, die zur Herstellung von Dünnschnitten verwendet wurden, mussten nach der Entnahme in Formalin (Firma MERCK, Katalog Nr.: 103 999 2500) eingelegt werden. Das Formalin wurde zuvor mit Phosphatpuffer (Firma GIBCO, Katalog Nr.: 10010-015) verdünnt.

Zur Herstellung der Schnitte wurde zunächst das Formalin ausgewaschen. Dies erfolgte automatisch mittels Gewebeeinfiltrationsautomat (LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar, Deutschland, TP1020) und dauerte ca. 10 – 12 Stunden. Nach dem Dehydrieren des Präparates durch Xylol wurde das Organ in der Ausgießstation (Tissue Block Dispenser PAG 12, MEDITE MEDIZINTECHNIK, Nunningen, Schweiz) in Paraffin eingebettet und auf 2 °C abgekühlt. Die Herstellung der Schnitte erfolgte durch ein Autocut Microtom (LEICA Reichert-Jung 2040). Die 5 – 7 µm dicken Schnitte wurden mit einem Pinsel abgehoben und bei 50 – 55°C in ein Wasserbad (NAGEL GmbH, Kiel, Deutschland, Meday Typ 24900) gelegt, wo sie sich komplett entfaltet haben. Der entfaltete Schnitt wurde mit einem Objektträger aufgenommen und auf einer Trockenplatte (AP- Thermoplatte) bei 40 °C getrocknet. Die Dünnschnitte wurden mit der PAS-Färbung angefärbt. Dazu wurden sie entparaffinisiert (mittels Xylol, absteigende Alkoholreihe), mit destilliertem Wasser abgespült und für 3min in 3%ige Essigsäure gelegt. Danach wurden sie 30 Minuten mit Alcianblau inkubiert und zunächst mit destilliertem Wasser, dann 5 Minuten mit Leitungswasser und im Anschluss wieder mit destilliertem Wasser abgespült. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 10 Minuten in frisch angesetzte 1 %ige Perjodsäure gelegt und mit Aqua dest. abgespült. Nun wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Schiff'sreagenz und im Anschluss 3x2 Minuten mit Sulfidwasser behandelt. Nach dem Spülen mit kaltem Leitungswasser für 5 – 10 Minuten und Aqua dest. wurden die Schnitte 10 Minuten mit Hämalaun-Lösung nach Mayer inkubiert, mit Aqua dest. abgespült, ca 10 Minuten mit Leitungswasser gebläut und nach erneutem Abspülen mit Aqua dest. entwässert und eingedeckt.

Durch die PAS-Färbung werden saure Mucopolysaccharide blau und neutrale Mucopolysaccharide rosarot gefärbt. Die Kerne sind dunkelblau.

Zur Herstellung der verwendeten Lösung Alcianblau wurde 1g Alcianblau 8 GS (wasserlöslich) in 1000 ml 3 %iger Essigsäure gelöst. Das verwendete Schiff'sreagenz wurde aus einer Lösung A (5g Pararosanilin in 150 ml 1-M-HCl gelöst) und Lösung B (5g Kalium- oder Natriumdisulfid in 850 ml demineralisiertem Wasser gelöst) hergestellt, die gemischt und bei Raumtemperatur abgedunkelt stehen gelassen wurden. Am darauffolgenden Tag wurden 30 g Aktivkohle hinzugegeben und das Gemisch für 15 Minuten kräftig geschüttelt

und danach filtriert. Das farblose Filtrat wurde in einer braunen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt.

3.6. Dünnschnitte zur Immunfluoreszenzhistologie

Für die Immunfluoreszenzhistologie wurden Kryoschnitte angefertigt. Die Organhälften für die Kryoschnitte wurden ebenfalls für eine Stunde in Formalin gelegt und danach in 30 %ige Saccharose-Lösung umgesetzt. In der Saccharose lagen sie für mindestens 12h, maximal jedoch für 48h (4°C). Danach wurden sie in Tissue-Tek (Firma SAKURA OCT, Katalog Nr.: 4583) eingebettet und bei -80°C tiefgefroren.

Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Firma Leica, Jung CM 3000) wurden 5 bis 7µm dünne Schnitte erstellt und auf entsprechende Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden zuvor mit Eiweißglycerin (Firma ROTH, Art. Nr.: P04.1) beschichtet. Nach Aufbringen der Schnitte wurden die Objektträger, sofern sie nicht sofort für immunhistochemische Färbungen verwendet wurden, bei -20°C aufbewahrt.

Vor der Fluoreszenzmarkierung wurden die Objektträger für 30 Minuten in PBS – BSA 1% (Bovine Serum Albumin, Firma PAA, Katalog Nr.: K41-001) gelegt. Danach wurden die Schnitte vorsichtig getrocknet und mit Nagellack umkreist. Diese Prozedur sollte sicherstellen, dass die im Rahmen der weiteren Behandlungen auf die Gewebeschnitte aufpipettierten Flüssigkeitsvolumina nicht auf dem Objektträger schwimmen.

Die Schnitte wurden anschließend mit einem speziellen Antikörper inkubiert (FITC anti-mouse CD117 (c-kit), Firma BD, Katalog Nr.: 553354). Die Antikörperverdünnung lag bei 1:1000 (in PBS, Firma GIBCO s.u.). Anschließend wurden die 'slides' in einer feuchten Kammer bei -4°C gelagert, die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht (wenigstens für 12h).

Im nächsten Schritt wurden die Zellkerne markiert. Dazu wurden die Objektträger zunächst 3-malig mit PBS gewaschen. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Schnitte für jeweils 10 Minuten mit DAPI-Lösung (Firma MiBi-Tec, Katalog Nr.: D1306) inkubiert, welches zuvor zu 1:50 in PBS verdünnt worden war.

Vor dem Eindecken der gefärbten und antikörpermarkierten Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium (Firma DAKO, Katalog Nr.: S3023) wurden die

Objektträger wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Bis zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger bei 4-8°C aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Durchlichtmikroskops (ZEISS, Axiovert S 100 TV). Bei 40-facher Vergrößerung wurden je 10 Gesichtsfelder der Nierenrinde und 5 Gesichtsfelder des Nierenmarks / der Nierenpapille auf die Präsenz von c-Kit+/cell tracker®+ Zellen analysiert. Die Markierung von c-Kit führte zu einer grünen Fluoreszenz der c-Kit-positiven Zellen. Bei gleichzeitig nachweisbarer roter Fluoreszenz (cell tracker®) musste von der Präsenz applizierter Zellen (EPCs) im Nierengewebe ausgegangen werden. Die Resultate der Zellzählung wurden als Anzahl für jedes Gesichtsfeld wiedergegeben.

3.7. Bestimmung des Serumkreatinins

Um eine Aussage über die filtrativen und sekretorischen Funktionen der Nieren treffen zu können, werden in der klinischen Praxis die Serumkonzentrationen so genannter Retentionsparameter bestimmt. Ein bewährter Analyt ist hierbei das Kreatinin. Dieses wird aus, in der Skelettmuskulatur für die Energiegewinnung abgebautem, Kreatinphosphat gebildet. Die Serumkonzentration des Kreatinins steigt üblicherweise erst ab einer ca. 60%igen renalen Funktionsminderung an. In der Niere wird Kreatinin weder tubulär reabsorbiert noch sezerniert, sodass sich die glomeruläre Filtrationsrate anhand der Kreatininkonzentrationen im Blut beurteilen lässt.

Die Bestimmung der Kreatininwerte erfolgte mittels des Kreatinin-Testverfahrens Kreatinin-PAP der Firma „Labor und Technik Eberhard Lehmann“ (Creatinin PAP, enzymatisch, flüssig, Bestellnummer: LT-CR 0101) und einem Photometer (Schimadzu Spectrophotometer UV-120-01). Die Reagenzien (Reagenz 1: EHSPT 0,4 mmol/l, Creatinase \geq 10 kU/l, Sarcosinoxidase \geq 3,5 kU/l, Ascorbinatoxidase \geq 1 kU/l; Reagenz 2: 4-Aminoantipyrin 2,95 mmol/l, Peroxidase \geq 4 kU/l, Creatininase \geq 150 kU/l) wurden gebrauchsfertig geliefert. Für jede Probe sowie für Standard- und Leerprobe wurden 600 μ l Reagenz 1 benötigt.

Die Serumproben wurden in einem 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt. Das Zielvolumen betrug 50 μ l. Es wurden also je 10 μ l Serum mit je 40 μ l destilliertem Wasser verdünnt bzw. 5 μ l Serum mit 45 μ l destilliertem Wasser gemischt. Außerdem wurden 50 μ l der

Kreatinin Standardlösung (Kreatinin 2,00 mg/dl) in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die Komponenten wurden dann im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Photometer-Küvetten wurden mit den Serumproben und der Standardprobe sowie mit jeweils 600 µl Reagenz 1 gefüllt. Zusätzlich wurden 600 µl Reagenz 1 als Leerprobe in eine Küvette eingebracht. Die Komponenten wurden gut gemischt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden zu jeder Küvette 200 µl Reagenz 2 gegeben, gemischt und weiter temperiert.

Die erste Absorptionsmessung wurde ca. 90 Sekunden nach der Zugabe von Reagenz 2 bei 550 nm durchgeführt. Der Extinktionswert E1 wurde ermittelt.

Die zweite Absorptionsmessung wurde 120 Sekunden nach der ersten Absorptionsmessung ebenfalls bei 550 nm durchgeführt und ergab E2.

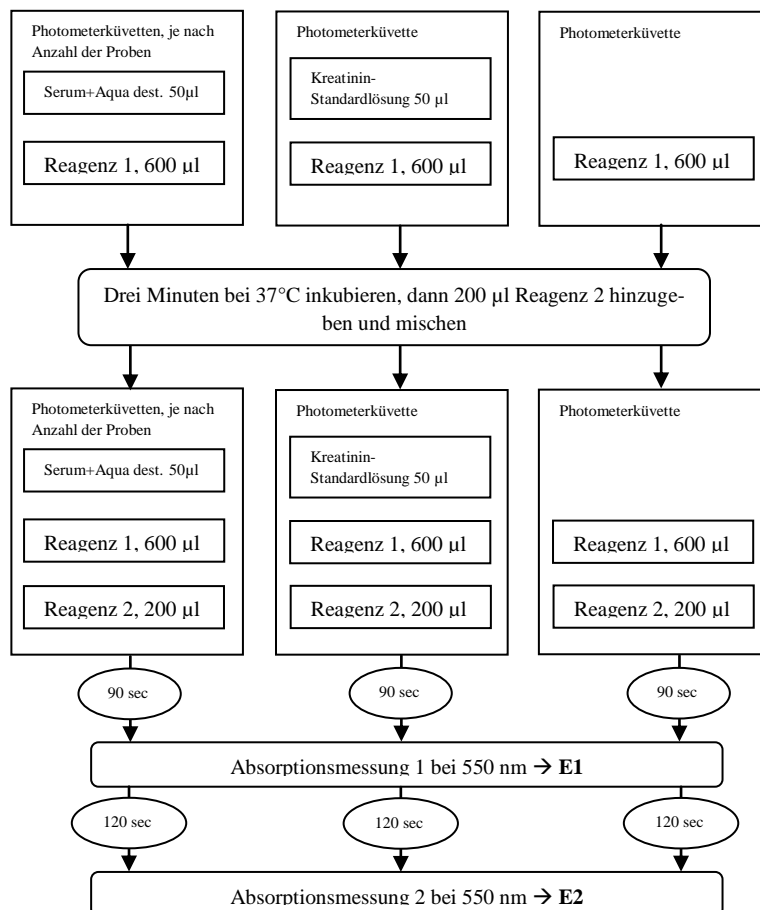


Abb. 2: Schematische Darstellung der Kreatininmessungen

Der Serumkreatininwert ergab sich aus dem Sollwert des Standards, multipliziert mit dem Quotienten aus Delta E der Analyse und Delta E des Standards. Delta E ergibt sich aus der Differenz von E2 und E1.

$$\text{Serumkreatinin} = \text{Sollwert des Standards} \times ((dE_{\text{Analyse}}) / (dE_{\text{Standard}}))$$

$$dE = E2 - E1$$

Der enzymatische Farbtest PAP nach der Trinder-Methode basiert auf der Reaktion von Kreatinin und Kreatininase, die in wässriger Lösung zu Kreatin reagieren. Kreatin reagiert mit Wasser unter Zugabe von Kreatininase zu Sarcosin und Harnstoff. Sarcosin reagiert mit Wasser und Sauerstoff unter Katalyse der Sarcosinoxidase zu Glycin, HCHO und Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid, EHSPT (N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin) und 4-Aminoantipyrin reagieren zu Chinonimin (roter Farbstoff) und Wasser. Die letzte Reaktion wird durch die Peroxidase katalysiert.

Der Test ist im Serum bis 30 mg/dl bzw. 2.650 $\mu\text{mol/l}$ linear. Die untere Nachweisgrenze im Serum liegt bei 0,025 mg/dl.

3.8. In-vitro-Versuche zur VEGF-Freisetzung aus EPCs

Wie bereits erwähnt, setzen EPCs verschiedene angiogene Wachstumsfaktoren frei. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist beispielsweise VEGF. Durch die folgenden Versuche sollte ermittelt werden, ob durch die Vorbehandlung mit Melatonin und TGF- β vermehrt VEGF aus EPCs freigesetzt wird.

Um diese Frage zu beantworten, wurden EPC-Kulturen der Firma CELPROGEN (Mouse-Endothelial-Progenitor-Cell-Culture – E66110-37) verwendet. Dieser Vorgang wird im Folgenden beschrieben.

3.8.1. Mouse-Endothel-Progenitor-Cell-Kultur

Die Zellen wurden tiefgefroren in flüssigem Stickstoff geliefert. Die Ampulle wurde bei 37°C 1-2 Minuten aufgetaut, dabei nur teilweise in das Wasser eingetaucht, vorsichtig hin und her bewegt und anschließend mit 70%igem Ethanol außen abgewischt. Unter der Sterilbank wurden die Zellen in ein 15-ml-Falcon-Tube überführt und die Ampulle hinterher mit 500 μl Celprogen-Complete-Growth-Medium I (CCGMI, Firma CELPROGEN, Katalognummer: M66110-37S) ausgespült sowie dann mit CCGMI auf 10 ml aufgefüllt.

Die Zellen wurden anschließend 5 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert (Zentrifuge der Firma HETTICH, Fabrikat: Rotixa / a). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml CCGMI resuspendiert und in eine T75-Flasche (Firma CELPROGEN, Katalognummer: E66110-37T75) zum Anlegen der

Zellkultur ausplattiert. Die Flasche ist vom Hersteller speziell vorbeschichtet, die Beschaffenheit der Beschichtung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

Die Zellen wurden 24 Stunden in einem Wärmeschrank (Firma W.KRANNICH GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland, Fabrikat: IR Sensor) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubationszeit sollen nach Herstellerangaben ca. 75% der Zellen adhärent und 25% noch in Suspension befindlich sein. Das alte Medium wurde vorsichtig entfernt und mit 5 ml frischem CCGMI aufgefüllt. Der abgenommene Überstand, in dem sich die noch suspendierten Zellen befinden, wurde in einem 15-ml-Falcon-Tube für 8 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 2 ml CCGMI aufgenommen. Die daraus erstellte Kultur wurde täglich mit Medium versorgt und die Zelldichte mit dem Mikroskop abgeschätzt. Wenn die Mauszellen 65 – 75 %ige Zellkontakte aufwiesen, wurde die Kultur mit Trypsin abgelöst und eine Subkultur angelegt.

Dazu wurde die Zellschicht mit 5 bis 10 ml PBS (Firma GIBCO, Katalognummer 10010-015) gewaschen, um das Serum zu entfernen. In die 75T-Flasche wurden daraufhin 5 ml 0,05 %ige Trypsin-EDTA (Firma GIBCO, Katalog Nr.: 25300-054) gefüllt. Die Flasche wurde für 2-3 Minuten vorsichtig bei 37°C geschüttelt. Der Vorgang wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Wenn zu erkennen war, dass sich die Zellen von der Plastikoberfläche zu lösen begannen, wurde dieser Prozess durch vorsichtiges Klopfen unterstützt.

Mit 5 ml CCGMI wurde der Vorgang gestoppt. Die in Suspension befindlichen Zellen wurden in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 8 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Ein kleiner Teil der Zellen wurde zuvor entnommen und mit Trypanblau (Firma GIBCO, Katalognummer 15250-061) in der Zählkammer gezählt. Durch das Trypanblau wurden abgestorbene Zellen markiert, sodass sichergestellt war, dass nur lebende Zellen gezählt wurden.

Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in CCGMI-Medium so resuspendiert, dass die Konzentration 10⁵ betrug und bis auf einen Teil, der mit Melatonin inkubiert wurde, in weitere 75T-Flaschen ausplattiert. Der Teil der Zellen, der im Versuch verwendet werden sollte, wurde in 24-well-Platten ausplattiert. Die Platten wurden vorher mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde 2%ige Gelatine (Firma SIGMA, Katalognummer G1393) auf 0,1% mit PBS verdünnt. Die

mit der Lösung bedeckten Platten wurden zur Inkubation 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in den Wärmeschrank gelegt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Flüssigkeit unter der Sterilbank abpipettiert und getrocknet.

3.8.2. Inkubation der Zellen mit Melatonin und TGF-β

Nachdem die Zellen ca. 48 bis 72 Stunden in den Vertiefungen belassen worden waren, zeigte sich die Ausbildung eines Zellrasens. Für den Versuch wurde Melatonin (Firma SIGMA, Katalognummer M5250-1G) und TGF-β (R&D SYSTEMS, Katalognummer 240B, recombinant human TGF-β1) inkubiert. Melatonin wurde so in CCGMI Medium gelöst, dass die Konzentration der Stammlösung 20 nmol/l betrug. TGF-β wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Die Inkubation erfolgte nacheinander. Dabei betrug die Inkubationszeit mit Melatonin eine Stunde, danach wurde der Überstand abpipettiert. Die Inkubationszeit mit TGF-β betrug 3 Stunden. In der Versuchsreihe wurden 12 24-well-Platten verwendet, je sechs wurden ausschließlich 3 Stunden mit TGF-β inkubiert und sechs zunächst eine Stunde mit Melatonin und danach drei Stunden mit TGF-β. Die Überstände wurden abgenommen und anhand des ELISA-Tests die VEGF-Freisetzung bestimmt.

3.8.3. Ermittlung der VEGF-Freisetzung aus EPCs mittels ELISA

Um die VEGF-Freisetzung zu ermitteln, wurde das ELISA-Verfahren angewandt. ELISA bedeutet 'enzyme linked immuno sorbent assay' und wird klassischerweise angewendet, um definierte Antigene zu detektieren. Im Rahmen des Verfahrens wird eine kleine Mikrotiterplatte mit dem zu bestimmenden Antigen beschichtet. Im nächsten Schritt wird die Platte mit einer Blutprobe inkubiert. Gleiches wird mit einer Kontrollprobe durchgeführt. Der Antikörper soll an das Antigen binden und einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden. Danach muss noch bestimmt werden, ob und wie viele Antikörper an Antigene gebunden haben. Zu diesem Zweck wird der Probe ein Marker zugegeben. Ein solcher Marker ist ein Enzym, das ebenfalls an den Antikörper bindet und eine Farbreaktion hervorruft, durch die die Menge der gebundenen Antikörper, also Antigen-Antikörper-Enzym-Komplexe, ermittelt wird. Die Bestimmung der Menge erfolgt, nachdem die Reaktion gestoppt ist, durch eine Vergleichsmes-

sung mit dem Kontrollversuch. Dabei werden mehrere Standardmessungen durchgeführt und die Ergebnisse als Gerade (auf der x-Achse wird der Extinktionswert, auf der y-Achse die bekannte Konzentration eingetragen) dargestellt. Anhand dieser Standardgeraden können die Konzentrationen der unbekannt Proben ermittelt werden.

Das ELISA-Verfahren kann auch für viele andere Fragestellungen angewendet werden, indem die Enzyme und Bindungspartner, entsprechend den zu ermittelnden Stoffen, modifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration des Mediators VEGF im Kulturmedium von EPCs ermittelt. Hierfür wurde ein 'Mouse VEGF-ELISA-Kit' (Firma RayBiotech, Inc., Katalognummer ELM- VEGF-001) verwendet. Dabei wurden Wells mit einem Antikörper beschichtet, welcher spezifisch an VEGF von Mäusen bindet. Dieser Antikörper sitzt fest an der Platte (wird vom Hersteller bereits so geliefert, Item A). Die Proben und Standards (je Probenreihe wurde eine eigene Standardreihe mit gemessen) wurden in die Wells pipettiert. Das VEGF aus den Proben und Standards (Item C) bindet an den Antikörper und ist somit ebenfalls an die Platte gebunden. Die Wells wurden gewaschen (Puffer Konzentrat, Item B) und der zweite, biotinylierte Antikörper (Item F) hinzugegeben. Nachdem die ungebundenen zweiten Antikörper durch Waschen (Puffer Konzentrat, Item B) der Probe entfernt worden waren, wurde HRP-konjugiertes Streptavidin in die Vertiefungen pipetteiert (Item G). Die Vertiefungen wurden daraufhin erneut gewaschen und TMB-Substrat-Lösung (Item H) wurde hinzugegeben. Durch den letzten Schritt (Item H) wird eine Farbreaktion in Gang gesetzt, die proportional zur Konzentration des VEGF ist. Durch die Zugabe von Schwefelsäure (Konzentration 2mol/Liter) (Item I) wird die Farbreaktion gestoppt und die Farbe ändert sich von Blau nach Gelb. Daraufhin wird die Farbintensität bei 450nm gemessen. Die Farbintensität wurde mit dem ELISA-Photometerreader (Firma TECAN) gemessen.

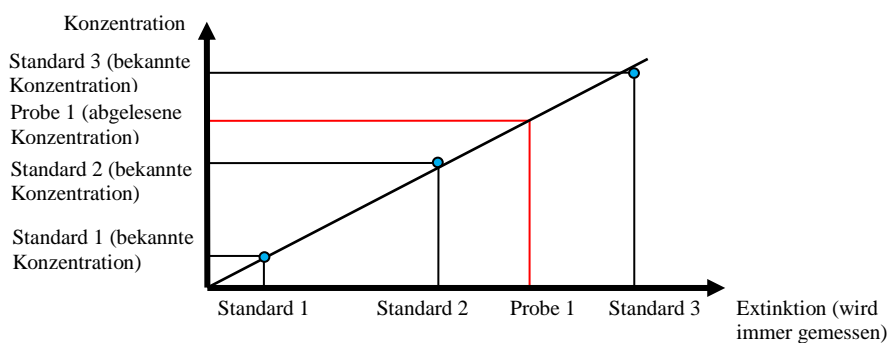
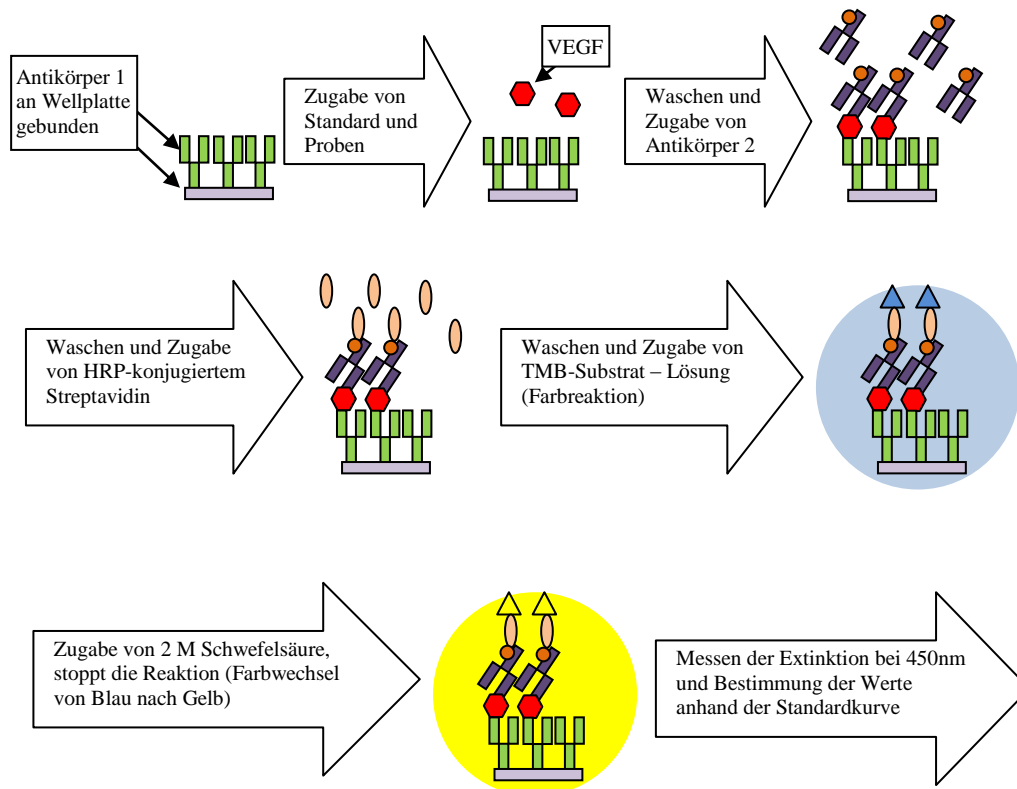


Abb.: 3 Schematische Darstellung des ELISA-Versuchs

Im Folgenden wird die Vorgehensweise des Versuchs detailliert geschildert:

Vorbereitung

- Alle Materialien wurden bei Raumtemperatur verwendet.
- Die Proben und Standards wurden, da es sich um Zellkulturen handelte, in dem dafür vorgesehenen Mittel (Medium B, Item E) gelöst. Medium B, vom Hersteller als Konzentrat geliefert, wurde vorher fünffach mit deionisiertem Wasser verdünnt.
- Die Standards wurden in mehreren Schritten verdünnt. Dazu wurden zunächst 400µl Medium B in den Behälter mit dem VEGF-Standard (liegt in dem Behälter in fester Form vor) gegeben und vorsichtig gemischt. Es ergab sich eine Konzentration von 25 ng/ml.

Aus diesem Behälter wurden 40 µl der Standardlösung in einen weiteren Behälter mit 960 µl Medium B gegeben. Es ergab sich eine Ausgangslösung mit einer Konzentration von 1000 pg/ml. Ausgehend von dieser Ausgangslösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden 7 Behälter mit jeweils 300 µl Medium B gefüllt. Aus der Ausgangslösung wurden 200 µl abpipettiert und in Behälter eins gegeben. Beide Lösungen wurden sorgfältig gemischt. Die Konzentration in Behälter 1 liegt bei 400 pg/ml. Anschließend wurden 200 µl aus Behälter 1 in Behälter 2 pipettiert und sorgfältig gemischt. Dies wurde bis zu Behälter sechs fortgesetzt, aus dem nichts in Behälter 7 pipettiert wurde, da dieser als Leerprobe diente. Die Konzentrationen der 8 Standards sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Ausgangslösung	1000 pg/ml	
Behälter 1	400 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 2	160 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 3	64 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 4	25,6 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 5	10,2 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 6	4,1 pg/ml	↪ 200 µl
Behälter 7 (Leerprobe)	0 pg /ml	

Tabelle 1: Verdünnungsreihe für ELISA-Test

- 20 ml der Puffer-Lösung (Item B) wurden mit deionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 400 ml verdünnt.
- Im nächsten Schritt wurde der Antikörper vorbereitet. In die Flasche mit dem Antikörper (Item F) wurden 100 µl Medium B gegeben. Dieser Schritt kann bis zu 5 Tage vor dem Versuch vorbereitet werden, da die Substanz bei -4°C bis zu 5 Tage lagerungsfähig ist. Für die Versuchsdurchführung wurde die Lösung 80 fach mit Medium B verdünnt.
- Das HRP-Streptavidin-Konzentrat wird vor dem Gebrauch mit Medium B 8000 fach verdünnt.

Durchführung des Assays

- Bei der Durchführung des Versuchs wurden als erstes 100 µl der Proben sowie jeweils 2 x 100 µl der Standards (die Standards wurden doppelt gemessen) in die mitgelieferten Wells gegeben, in denen der erste Antikörper bereits fest am Boden haftet. Die Wells wurden abgedeckt und zur Inkubation 2,5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- Als nächstes wurde die Lösung aus dem Well entfernt und jeder Well mit 300µl Wasch-Puffer viermal gereinigt. Dabei war es wichtig, die Wells nach jedem Schritt gut zu trocknen.
- Auf die Proben und Standards wurden nun 100 µl der vorbereiteten Lösung (s.o.) mit dem zweiten Antikörper gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.
- Die Lösung wurde nach der Stunde verworfen und die Wells wie oben beschrieben viermal mit Waschpufferlösung gereinigt.
- 100 µl der vorbereiteten Streptavidin Lösung (s.o.) wurden in jedes Well gegeben und bei Raumtemperatur 45 Minuten unter leichter Bewegung inkubiert.
- Vor dem nächsten Schritt wurde erneut viermal mit Waschpufferlösung gewaschen.
- Um zum Abschluss des Assays die Farbreaktion auszulösen, wurden 100 µl TMB-Substrat-Lösung (Item H) in jedes Well gegeben. Die Lösungen wurden daraufhin 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert.
- Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden 50µl Stop-Lösung in jedes Well pipettiert.
- Die Extinktionsmessungen erfolgten unmittelbar nach dem letzten Schritt.

3.9. Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Geräte

Stoff	Herstellerfirma	Katalognummer	Verwendung
Ketamine / Xylazine	SIGMA – ALDRICH, St. Louis, USA	K-113	Anästhesie
Heparin	RATIOPHARM, Ulm, Deutschland	N21086.21-Z04	Hemmung der Blutgerinnung bei Zellisolation
EBM2 Medium	LONZA, Basel, Schweiz	CC-3156	Verschiedenes
Biocoll	BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland	L-6115	Dichtentrennung der EPCs aus Vollblut und Milz
Fibronectin	SIGMA – ALDRICH,	F0895 – 1MG	Züchten der Zellen
CM Dil Zelltracker	INVITROGEN, Carlsbad, Kalifornien, USA	C7000	Markieren der Zellen
Melatonin	SIGMA – ALDRICH	M5250-1G	Stimulieren der Zellen
Luzindol	SIGMA – ALDRICH	L 2707	Antagonist von Melatonin
Formalin	MERCK, Darmstadt, Deutschland	103 999 2500	Fixierung der Organe
Phosphatpuffer	GIBCO, Darmstadt, Deutschland	10010-015	Verdünnen des Formalins, Antikörper und DAPI
Tissue Tek	GENTAUR, Kampenhout, Belgien	4583	Fixieren der Organe für Kryoschnitte
Eiweißglycerin	ROTH, Karlsruhe, Deutschland	P049.1	Vorbehandlung der Objektträger für Kryoschnitte
Bovine Serum Albumin	PAA, Pasching, Österreich	K41-001	Vorbehandlung der Kryoschnitte
FITC anti-mouse CD117 / c-kit	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	553354	Antikörper zum Markieren der EPCs in Kryoschnitten
Fluoreszent Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Dänemark	S3023	Eindecken der Kryoschnitte
Creatinin PAP	TECHNIK EBERHARD LEHMANN, Berlin, Deutschland	LT-CR 0101	Kreatininbestimmung im Serum
VEGF ELISA Kit	RAYBIOTECH, Norcross, Georgia, USA	ELM-VEGF-001	ELISA zur Bestimmung der VEGF-Freisetzung aus EPCs
Mouse Endothelial Progenitor Cell Culture	CELPROGEN, San Pedro, Kalifornien, USA		Zellen für die in-vitro-Versuche
CCGM I Medium	CELPROGEN	M66110-37S	Zellkulturen und in-vitro-Versuche
Trypsin - EDTA	GIBCO	25300-054	Lösen der Zellen von der T75-Flasche
Trypanblau	GIBCO	15250-061	Färben abgestorbener Zellen
Gelatine 2%	SIGMA – ALDRICH	G1393	Beschichten der 24-Well-Platten

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien mit Angabe von Firma und Katalognummer

Gerät	Firma	Verwendung
Pinzette (Nr. 11608-15)	FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, Deutschland	Operation
Schere (Nr. 14058-11)	FINE SCIENCE TOOLS	Operation
Chirurgische Pinzette (Nr. 18057-14)	FINE SCIENCE TOOLS	Operation (Applikation der Klemme)
Klemme (Nr. 18055-03)	FINE SCIENCE TOOLS	Operation (Abklemmen der Niere)
Nadelhalter (Nr. 13004-14)	FINE SCIENCE TOOLS	Operation (Nähen der Wunde)
Faden (Nr. 100 6830)	HENRY SCHEIN, Melville, New York, USA	Operation (Nähen der Wunde)
Insulinspritze, Safety Glide (Nr. 305930)	BD	Operation (Injektion der Zellen bzw. Kochsalzlö- sung)
Spectrophotometer (UV-120-01)	SHIMADZU, Kyoto, Japan	Creatininbestimmung
Pipette (0,5 – 10µl)	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland	Laborarbeiten
Pipettierspitzen für 0,5 – 10-µl- Pipette	EPPENDORF	Laborarbeiten
Pipette (10 – 100 µl)	EPPENDORF	Laborarbeiten
Pipettierspitzen für 10 – 100-µl- Pipette	EPPENDORF	Laborarbeiten
Pipette (100 – 1000µl)	EPPENDORF	Laborarbeiten
Pipettierspitzen für 100 – 1000- µl-Pipette	EPPENDORF	Laborarbeiten
Zentrifuge (G5-6R)	BECKMANN, Krefeld, Deutschland	Zellisolation
Zentrifuge (Rotixa/a)	HETTICH LAB TECHNO- LOGY, Tutlingen, Deutsch- land	In-vitro-Versuche
75T Flasche (E66110-37-T75)	CELPROGEN	Zellkulturen
Photometerreader	TECAN, Männedorf, Schweiz	ELISA-Auswertung
Gewebeinfiltrationsautomat	LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar, Deutschland	Herstellung der Paraffin- schnitte
Ausgießstation (Tissue Block Dispenser,)	MEDITE MEDIZINTECH- NIK AG, Nunningen, Schweiz	Herstellung der Paraffin- schnitte
Autocut Microtom	LEICA MICROSYSTEMS	Herstellung der Paraffin- schnitte
Wasserbad, Meday Typ 24900	MACHERY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland	Herstellung der Paraffin- schnitte
Durchlichtmikroskop	CARL-ZEISS AG, Oberko- chen, Deutschland	Immunfluoreszenzhistolo- gie

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

3.10. Statistische Auswertung

Der Beurteilung von evtl. statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Tieren der verschiedenen Gruppen diente der Mann-Whitney-Test. Unterschiede in der Freisetzung von VEGF wurden mittels T-Test analysiert. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert von unter 0,05 postuliert.

4. Eigene Ergebnisse

4.1. Untersuchungsgruppen und Nierenfunktion nach Injektion von unbehandelten und in vitro vorbehandelten EPCs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die nephroprotektive Wirkung von EPCs durch die Stimulation der Zellen mit dem Hormon Melatonin steigern lässt. Voraussetzung hierfür war ein Modell des akuten ischämischen Nierenversagens. Dies konnte in Mäusen erzeugt werden, indem bei den Tieren ein 40-minütiges Abklemmen des linken Nierengefäßstammes mit gleichzeitiger kontralateraler Nephrektomie erfolgte (entspricht funktionell einer bds. renalen Ischämie). Um die Effekte der Zelltherapie beurteilen zu können, wurden zeitgleich zum Entfernen der Klemme um den linken Nierengefäßstamm entweder unbehandelte oder in vitro vorbehandelte EPCs in die kontralaterale Nierenvene injiziert. Die Nierenfunktion bzw. das Ausmaß der Nierenschädigung wurde anhand der Kreatininwerte im Blut beurteilt. Die entnommenen Organe wurden histologisch anhand von Paraffinschnitten mit PAS-Färbung und Immunfluoreszenzschnitten untersucht.

4.1.1. Ergebnisse der Kreatininmessungen

Im Folgenden werden die 5 Gruppen kurz vorgestellt sowie die Ergebnisse der Kreatininmessungen tabellarisch aufgeführt.

4.1.1.1. Kontrollgruppe (Controls)

Den Tieren der Kontrollgruppe (5 Tiere) wurde lediglich Blut abgenommen, um Ausgangswerte der Kreatininkonzentration im Blut zu bestimmen. Der Mittelwert betrug 0,09 mg/dl, der SEM-Wert (standard error of the mean) 0,02 mg/dl.

4.1.1.2. Versuchsgruppe 1 (NaCl)

Den insgesamt 6 Tieren der 2. Versuchsgruppe wurden je 50 µl physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Anhand dieser Gruppe sollte ermittelt werden, wie sich die Gabe eines zellfreien Flüssigkeitsvolumens auf die Nierenfunktion auswirkt. Die gemessenen Kreatininwerte lagen mit durchschnittlich 0,42 mg/dl vergleichsweise hoch (höchster Wert 0,43 in den Gruppen 4 und 5). Der SEM-Wert betrug 0,1 mg/dl.

4.1.1.3. Versuchsgruppe 2 (EPC)

In Versuchsgruppe 2 (6 Tiere) wurden je $0,5 \times 10^6$ unbehandelte Zellen (suspendiert in 50 μ l) EBM-2 injiziert. Diese Gruppe sollte zeigen, ob durch die Gabe von unbehandelten Zellen eine Nephroprotektion nach einer 40-minütigen renalen Ischämie erzielt werden kann. Der Mittelwert der Kreatininkonzentration im Blut lag bei 0,43 mg/dl. Ein signifikanter Unterschied zum Kreatininwert der Tiere, welche lediglich Kochsalzlösung erhalten hatten, bestand jedoch nicht. Der SEM-Wert lag bei 0,07 mg/dl.

4.1.1.4. Versuchsgruppe 3 (EPC + mel)

In Versuchsgruppe 3 (6 Tiere) wurde die gleiche Menge an Zellen injiziert, jedoch wurden diese vorher mit Melatonin für 15 Minuten inkubiert. Die Kreatininwerte waren mit 0,23 mg/dl im Mittel die niedrigsten von allen Versuchsgruppen. Lediglich die Kontrollgruppe wies mit durchschnittlich 0,09 mg/dl niedrigere Werte auf. Der SEM-Wert lag bei 0,03 mg/dl.

4.1.1.5. Versuchsgruppe 4 (EPC + mel + luz)

In Versuchsgruppe 4 (5 Tiere) wurden wiederum $0,5 \times 10^6$ Zellen appliziert, diesmal erfolgte jedoch eine kombinierte Vorbehandlung mit Melatonin und dem unspezifischen MT-1-/MT-2-Rezeptorblocker Luzindol. Dieses Vorgehen sollte die zuvor erhobenen Daten bestätigen: sollte es nach Gabe von kombiniert vorbehandelten Zellen zu einer Abschwächung der zuvor beobachteten Effekte kommen, wäre dies ein Hinweis auf die Spezifität der Wirkungen des Hormons.

Der Kreatininmittelwert lag mit 0,43 mg/dl so hoch wie die Werte aus Gruppe 1 und 2. Der SEM-Wert betrug 0,05 mg/dl.

4.1.1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 3 werden die Einzelmessungen aller Versuche aufgeführt sowie die Mittelwerte und SEM-Werte.

In Abbildung 4 werden die Mittelwerte und jeweiligen SEM(standard error of the mean)-Werte aus den Einzelmessungen jeder Gruppe graphisch dargestellt.

Maus	Kreatininwerte [mg / dl]				
	ohne Ischämie (Kontrolle)	NaCl (Gruppe 1)	5 x 10 ⁶ EPCs (Gruppe 2)	5 x 10 ⁶ EPCs + Melatonin (Gruppe 3)	5 x 10 ⁶ EPCs + Mel. + Luz. (Gruppe 4)
1	0,09	0,32	0,66	0,31	0,58
2	0,11	0,18	0,2	0,34	0,35
3	0,06	0,5	0,54	0,23	0,329
4	0,03	0,35	0,35	0,16	0,384
5	0,17	0,29	0,47	0,21	0,507
6		0,85	0,38	0,13	
Mittelwert	0,09	0,42	0,43	0,23	0,43
SEM	0,02	0,10	0,07	0,03	0,05

Tabelle 4: Einzelmessungen der Kreatininwerte der untersuchten Gruppen

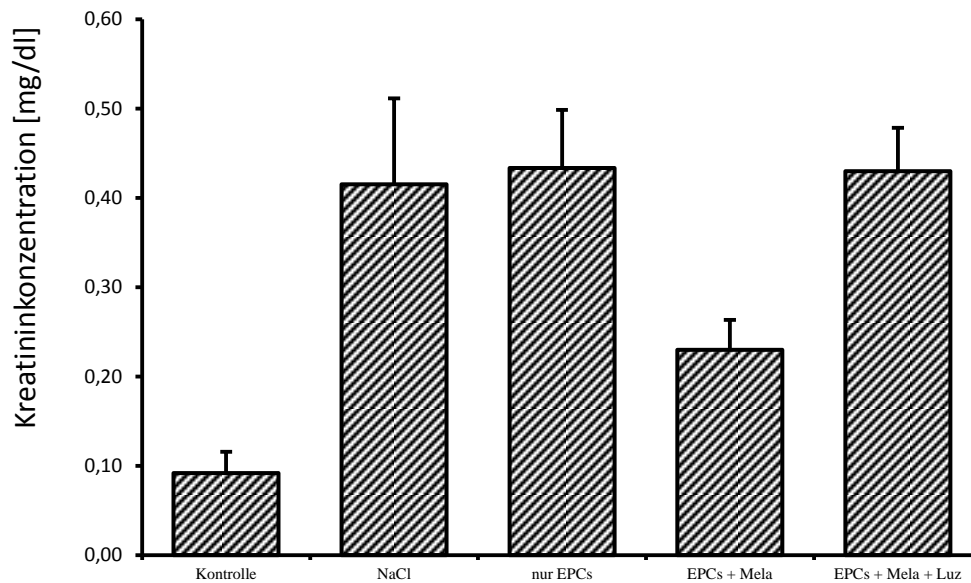


Abb. 4: Darstellung der Mittelwerte der Kreatininmessungen der 5 untersuchten Gruppen $p < 0,05$

4.1.2. Auswertung der Paraffinschnitte in PAS Färbung

Die Dünnschnitte wurden ausgewertet, indem nach der PAS-Färbung die Schädigung der Nierentubuli semiquantitativ beurteilt wurde. Dabei wurden folgende Parameter beurteilt:

- Die Abflachung des Tubulusepithels
- Detritus
- Kernverlust/Nekrose
- Vakuolisierung
- Bürstensaumdefekte.

Die Beurteilung erfolgte indem der begutachtete Schaden in vier Grade eingeteilt wurde:

- Grad 0 : nicht vorhanden
- Grad 1 : geringfügig ausgebildet
- Grad 2 : mäßig ausgebildet
- Grad 3 : stark ausgebildet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden die Gruppen 2, 3 und 4 untersucht, wobei die Ergebnisse der Gruppe 4 nicht aussagekräftig waren. In Abb.16 werden die Ergebnisse der Parameter „Abflachung des Tubulusepithels“ und „Bürstensaumdefekte“ der Gruppen 2 (nur EPCs) und 3 (EPCs + Melatonin) zusammengefasst.

Gruppe	Niere	Epithel- abflachung	Detritus	Kernverlust/ Nekrose	Vakuo- lisierung	Bürstensaum- defekte
Gruppe 2 EPCs ohne Mela- tonin	1	1	0	0	0	1
	2	2	0	0	0	1
	3	2	0	0	2	2
	4	2	1	1	1	2
	5	1	2	2	1	2
	6	1	2	2	1	2
	7	1	1	1	1	2
Mittelwert Gruppe 2		1,43	0,86	0,86	0,86	1,71
SEM		0,20	0,34	0,34	0,26	0,19
Gruppe 3 EPCs mit Melato- nin	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1
	3	Fehlt				
	4	1	1	1	1	1
	5	0	0	0	1	1
	6	0	0	0	1	1
	7	1	0	1	1	1
Mittelwert Gruppe 3		0,67	0,50	0,67	1,00	1,00
SEM		0,21	0,22	0,21	0,00	0,00
Gruppe 4 EPCs mit Me- latonin und Luzindol	1	1	2	2	1	1
	2	2	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	1
	4	0	0	0	0	1
	5	1	0	0	1	1
Mittelwert Gruppe 4		0,80	0,60	0,60	0,60	1,00
SEM		0,38	0,40	0,40	0,25	0,00

Tabelle 5: Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der entnommenen Nieren der Gruppen 2, 3 und 4

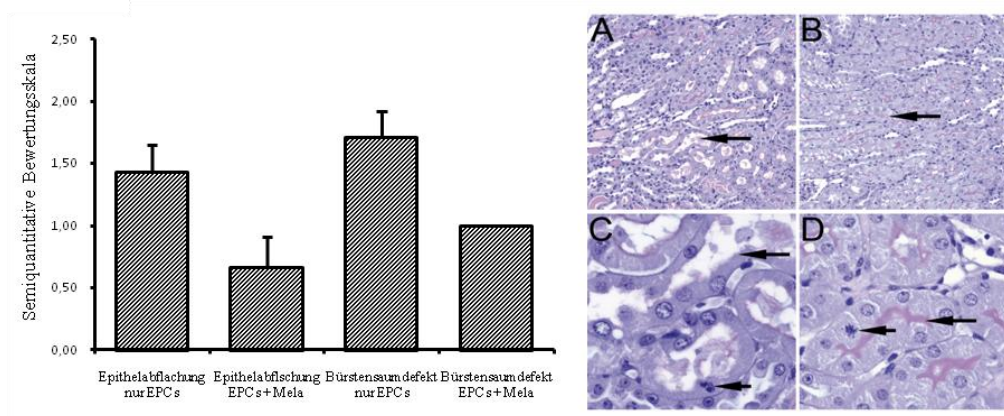


Abb.: 5 : Semiquantitative Auswertung der Paraffinschnitte nach PAS-Färbung.
 $p < 0,05$

Die Bilder in Abb. 5 zeigen Bereiche aus dem Nierenparenchym. Die Bilder A und B sind Übersichtsaufnahmen, C und D zeigen Details der Nierentubuli. Die Bilder A und C entstammen der Niere eines Tieres, welches nach 40-minütiger Ischämie 50 µl unvorbehandelte EPCs injiziert bekam. Die Bilder B und D zeigen Nierentubuli eines Tieres nach 40-minütiger Ischämie und anschließender Injektion von EPCs die vorab mit Melatonin inkubiert wurden. Der Mikrovillisaum ist in Bild D aufgrund der PAS-Färbung deutlich als rosa gefärbtes Band auf den Zellen zu erkennen (in der semiquantitativen Auswertung wird der Wert 0, bezogen auf den Parameter „Bürstensaumdefekte“, gegeben). Die Zellen sind nicht abgeflacht, auch diesbezüglich wird dem Bild der Wert 0 zugeordnet.

In Bild C ist ein deutlicher Verlust des Mikrovillisaums zu erkennen, lediglich vereinzelt sind noch Fragmente vorhanden. Daher wird der Bürstensaumdefekt in diesem Bild als mäßig ausgebildet (Wert 2) beurteilt. Das Tubulusepithel ist in diesem Bild mäßig abgeflacht (Wert 2).

Die Ergebnisse der Auswertung der Paraffinschnitte ergänzen die Ergebnisse der Kreatinin-Messungen und zeigen deutlich, dass durch die Vorbehandlung der EPCs mit Melatonin ein akutes Nierenversagen nach 40-minütiger Ischämie verhindert werden kann. Im Gegensatz zu nicht vorbehandelten Zellen, nach deren Injektion die Nierentubuli deutliche Schäden, aufgrund der Ischämie, aufweisen.

Dies gilt sowohl für den Parameter „Bürstensaumdefekt“, der in Versuchsgruppe 2 (Injektion von unvorbehandelten EPCs) im Mittel bei 1,7 liegt und in Versuchsgruppe 3 (Injektion von Zellen die mit Melatonin vorbehandelt wur-

den) bei 1 (1= gering ausgeprägt, 2= mäßig ausgeprägt), als auch für den Parameter „Abflachung des Tubulusepithels“, der für Versuchsgruppe 2 bei 1,45 liegt und für Versuchsgruppe 3 bei 0,6.

4.1.3. Auswertung Immunfluoreszenzmikroskopie

Es war geplant in den Immunfluoreszenzschnitten die angefärbten EPCs in 40 Gesichtsfeldern auszuzählen. In den Nieren der zellinjizierten Tiere ließen sich nur vereinzelt EPCs nachweisen, signifikante Unterschiede fanden sich dabei zwischen den verschiedenen Gruppen nicht (Abb. 6).

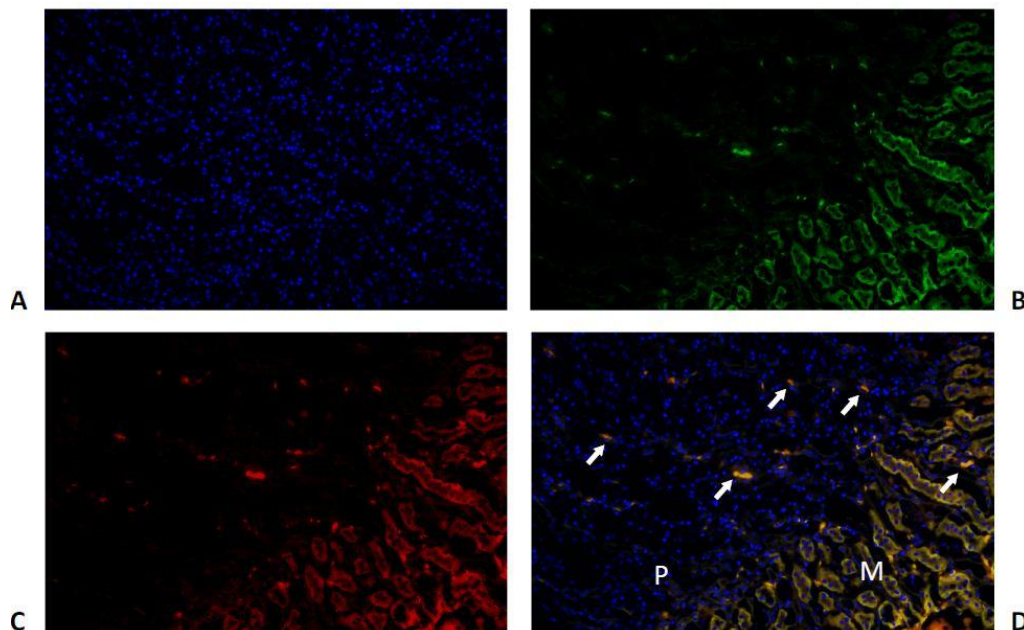


Abb. 6: Immunfluoreszenzaufnahmen einer Niere an der Grenze Nierenpapille (P) und Nierenmark. A: Darstellung der Zellkerne, B: c-kit Darstellung, C: Celltrackerdarstellung, D: EPCs sind gelb dargestellt (Überlagerung von c-kit und Celltracker)

4.2. Freisetzung von VEGF unter dem Einfluss von Melatonin in vitro

Der in-vitro-Versuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, welcher Mechanismus der Verbesserung des nephroprotektiven Effekts, der durch die Behandlung der Zellen mit Melatonin im Tierversuch nachgewiesen wurde, zugrunde liegen könnte.

Wie bereits erwähnt sezernieren EPCs verschiedene angiogene Wachstumsfaktoren. Um zu erforschen, ob die Freisetzung von VEGF durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Melatonin gesteigert werden kann, wurden Zellen mit Me-

latonin und TGF- β inkubiert. TGF- β wird in ischämischem Nierengewebe erhöht nachgewiesen. Die Zellen wurden alle mit TGF- β inkubiert um in-vitro realitätsnähere Bedingungen zu schaffen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt und in Abbildung 7 zusammengefasst.

	TGF β (10ng / ml)	TGF β + Melatonin 20nM
VEGF Freisetzung [pg / ml]	1250	2750
	1500	1900
	1950	2300
	1950	2300
	1600	1950
	1700	1900
Mittelwert	1658,33	2183,33
SEM	110,62	137,03

Tabelle 6: Ergebnisse der ELISA-Versuche zur VEGF-Freisetzung

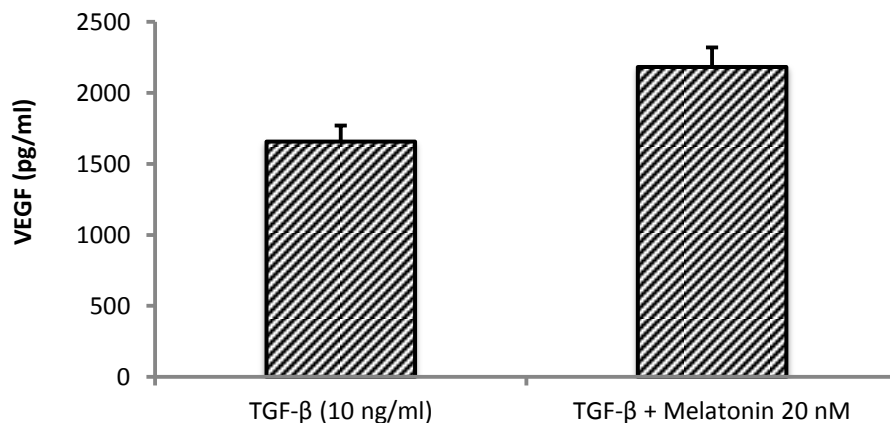


Abb. 7: VEGF Freisetzung nach der Inkubation der Zellen mit TGF- β und mit TGF- β und Melatonin.

Abb 7 zeigt, dass die Freisetzung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF nach der Inkubation mit Melatonin deutlich erhöht ist. Ohne Inkubation mit Melatonin setzten die Zellen ca. 1658 pg/ml VEGF frei, nach der Inkubation mit Melatonin liegt die VEGF-Freisetzung bei 2183 pg/ml.

Melatonin bewirkt also in vitro eine Erhöhung der Freisetzung von VEGF aus EPCs.

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der nephroprotektive Effekt von EPCs durch eine Vorbehandlung der EPCs mit Melatonin verbessert werden kann. Dies wurde im Mausmodell erforscht. Dabei wurde stets der linke Nierengefäßstamm der Tiere für 40 Minuten abgeklemmt, gleichzeitig erfolgte eine kontralaterale Nephrektomie. Unmittelbar nach Reperfusion der linken Nieren wurden entweder 50µl physiologischer Kochsalzlösung, oder unvorbehandelte EPCs im gleichen Volumen (50µl), oder Melatonin vorbehandelte EPCs im gleichen Volumen sowie schließlich kombiniert vorbehandelte EPCs (Melatonin + Melatoninantagonist Luzindol) systemisch injiziert. Die Funktionsfähigkeit der Nieren wurde jeweils anhand der Kreatininwerte aus dem Blut der Mäuse, bestimmt ca. 48 Stunden nach der Ischämie, ermittelt. Die Ergebnisse der Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nach einer 40-minütigen renalen Ischämie hat die Gabe von unbehandelten EPCs im Vergleich zur Injektion von lediglich Kochsalzlösung keine zusätzlichen nephroprotektiven Effekte.
- Die Gabe von Zellen, welche mit Melatonin vorbehandelt wurden, führt zu einer signifikanten Verbesserung der Nierenfunktion nach 40-minütiger Ischämie.
- Dieser Effekt lässt sich durch den Melatoninantagonisten Luzindol wieder aufheben.
- Da der Melatoninantagonist Luzindol an den MT-1-Rezeptor bindet, kann daraus geschlossen werden, dass die Verbesserung des nephroprotektiven Effekts von EPCs durch die Stimulation mit Melatonin auf der Bindung des Melatonins an diesen Rezeptor beruht.

Die laborchemisch festgestellten Unterschiede der Nierenfunktion spiegeln sich in den morphologischen Analysen wider:

- Nieren von Mäusen, denen nach der Ischämie unbehandelte EPCs oder physiologische Kochsalzlösung injiziert wurden, weisen einen deutlich erkennbaren Verlust des Mikrovillisaums sowie eine Abflachung der Tubulusepithelzellen auf.

- In Nieren von Mäusen, denen mit Melatonin vorbehandelte Zellen injiziert wurden, ist ein deutlich geringerer Schwund des Mikrovillisaums zu erkennen. Die Tubulusepithelzellen sind nicht oder nur geringfügig abgeflacht.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass durch die Vorbehandlung von EPCs mit Melatonin eine deutliche Steigerung des nephroprotektiven Potentials der Zellen erzielt werden kann.

In vitro wurde gezeigt, dass die Inkubation von EPCs mit Melatonin zu einer Steigerung der VEGF-Freisetzung aus den Zellen führt.

Ein akutes ischämisches Nierenversagen ist auf morphologischer Ebene durch graduell unterschiedlich starke Alterationen der Tubulusepithelzellen gekennzeichnet. Die die Nierentubuli umgebenden Blutgefäße stehen in direktem Kontakt mit den Tubuluszellen und werden bei einem ANV signifikant mitgeschädigt. Dabei kommt es zunächst zu einem Anschwellen der Endothelzellen mit entsprechender Einengung des Gefäßlumens und nachfolgend einer anhaltenden Minderperfusion des Organs. Sowohl die Tubuluszellen als auch die Endothelzellen zeichnen sich durch ein hohes Regenerationspotential aus. Die Regeneration der Endothelzellen kann mit Hilfe von EPCs signifikant verbessert werden. Über dieses Phänomen wurde bereits vor einigen Jahren erstmals berichtet. In den damaligen, von Patschan et al. (PATSCHAN et al., 2006 a + b) veröffentlichten Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass EPCs bereits drei Stunden nach einer einseitigen Ischämie in den Milzen von Versuchsmäusen akkumulieren. In einem zweiten Schritt wurden die Nieren zweimalig, im Abstand von je sieben Tagen, einer 25-minütigen Ischämiebehandlung unterzogen. Dieses Prozedere führte zur deutlichen Anreicherung von EPCs in der postischämischen Niere. Wurden diese Zellen nun isoliert und in Empfängermäuse nach beidseitiger, renaler Ischämie appliziert, entwickelten die Tiere kein akutes Nierenversagen. (PATSCHAN et al., 2006b).

Weiterführende, Ende 2009 veröffentlichte, Studien belegten, dass EPCs aus Mäusen reproduzierbar isoliert und in Kultur vermehrt werden können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch die systemische Anwendung der Zellen ein ischämisches ANV verschiedenen Schweregrades sicher verhindert werden kann (PATSCHAN et al., 2010). Tatsächlich kam es jedoch mit zunehmender Ischämiedauer zur Abnahme der nephroprotektiven Wirkungen einer definier-

ten (konstanten) EPC-Population. Da das übergeordnete Ziel des Forschungsprojektes die Etablierung von „Therapiebedingungen“ ist, welche zur Optimierung eines EPC-basierten Behandlungsansatzes des ischämischen ANV führen, wurde nun nach einer Strategie gesucht, welche den Zellen eine verstärkte nephroprotektive Potenz verleiht. Ungeachtet der Mechanismen, über welche EPCs nephroprotektiv wirken, war zu vermuten, dass mit einem Anstieg der Zellzahl im Organ auch deren nephroprotektive Effekte deutlich zum Tragen kommen.

Bezüglich dieses Punktes konnte gezeigt werden, dass durch eine Vorbehandlung von EPCs mit der Substanz 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (EPAC1 Ac) der nephroprotektive Effekt der EPCs steigerbar ist. Die Zellvorbehandlung mit EPAC-1-Ac führte zu einer vermehrten Expression von beta1-Integrinen auf den EPCs. Beta1-Integrine sind Zelladhäsionsrezeptoren, die von entscheidender Bedeutung für das 'homing' von Leukozyten im Rahmen von entzündlichen Prozessen sind.

Es wurde geschlussfolgert, dass EPAC-1-Ac über eine Aktivierung von beta-1-Integrinen die Einwanderung der Zellen ins postischämische Organ verstärkt, wodurch letztlich die nephroprotektiven Wirkungen des EPC-basierten Therapieansatzes intensiviert werden. Passend dazu ließen sich auch vermehrt EPCs in den Organen nachweisen, wenn die Zellen mit EPAC-1-Ac vorbehandelt worden waren.

Neben der Möglichkeit, den nephroprotektiven Effekt von EPCs durch die Behandlung mit EPAC-1 zu verbessern, wurde durch die vorliegende Arbeit eine weitere Methode zur Verbesserung etabliert.

In der Literatur wurde im Jahre 2008 die Möglichkeit einer Steigerung der nephroprotektiven Effekte von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) durch eine Zellbehandlung mit dem Hormon Melatonin beschrieben (MIAS et al., 2008). Dabei wurden MSCs, welche mit Melatonin inkubiert worden waren, in ischämisch vorbehandelte Nieren von Mäusen injiziert. Die Nierenfunktion von MSC-behandelten Tieren war im Verlauf signifikant gebessert. In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass Melatonin eine signifikante Verstärkung der parakrinen Eigenschaften von MSCs sowie ein längeres Zellüberleben induzieren kann (MIAS et al., 2008).

Während die Steigerung der nephroprotektiven Wirkung, die durch die Behandlung mit EPAC-1-Ac erzielt wurde, auf einer Aktivierung von Integrinen und somit einem verbesserten Einwandern in die ischämischen Gebiete beruhte, liegen den Effekten, welche durch Melatonin erzielt wurden, andere Mechanismen zugrunde.

Im Rahmen der Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass durch die Vorbehandlung der EPCs mit Melatonin die Freisetzung von VEGF gesteigert wird. Der vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) ist einer der, soweit bekannt, potentesten Gefäßwachstumsfaktoren (GOLIGORSKY et al., 2005).

Unter Berücksichtigung der Arbeiten von Rehman et al. (REHMAN et al., 2003) ist zu vermuten, dass die unter dem Einfluss von Melatonin vermehrte Bildung von VEGF für die verstärkten nephroprotektiven Effekte der EPCs zumindest mitverantwortlich ist. Weitere, bislang unveröffentlichte und nicht als Bestandteil der vorliegenden Arbeit erfolgte Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass Melatonin die Apoptoserate von EPCs verringert und deren Migrationsfähigkeit steigert. Auch diese Mechanismen erklären die verstärkte nephroprotektive Wirkung der Zellen. Letztlich ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren anzunehmen.

Die Wirkungsweise von VEGF, welches vermutlich ein Anschwellen der geschädigten Endothelzellen vermittelt, ist, bezüglich der EPCs, in der Literatur mehrfach beschrieben worden (LEAF, 1973, FLORES et al., 1972).

Beim Auftreten einer Ischämie werden EPCs aus dem Knochenmark mobilisiert. Diese Mobilisierung wird durch das Freisetzen von beispielsweise VEGF, Erythropoetin und SDF-1 induziert.

Sie wandern im weiteren Verlauf ins wiederdurchblutete (postschämische) Gewebe ein und wirken dort vasoreparativ. Dabei können sie sich einerseits in die Wände von kleinen Blutgefäßen inkorporieren, andererseits setzen sie vor Ort verschiedene proangiogene Faktoren frei (VEGF, HGF – hepatocyte-growth-factor und IGF-1 – insulin-like-growth-factor-1 (URBICH & DIMMELER, 2004 a und b)). Diese Substanzen vermitteln eine raschere Rückbildung von endothelialen Zellschwellungen, dadurch wird die Wiederdurchblutung des Gewebes gefördert. Dieser Mechanismus kommt vermutlich auch nach einer EPC-Vorbehandlung mit Melatonin verstärkt zum Tragen. Durch die vorliegende Arbeit wurde insgesamt ein wesentlicher Beitrag zur Grundlagenfor-

schung im Bereich „Therapeutische Anwendung von Endothelvorläuferzellen (EPCs) bei akuten mikrovaskulären renalen Funktionsstörungen als Ursache des akuten Nierenversagens“ geleistet. Auf der Suche nach EPC-agonistischen Substanzen beim iANV konnte das Hormon Melatonin als potenter Zellaktivator identifiziert werden. Inwieweit die Untersuchungen von Relevanz für spätere Behandlungsstrategien des iANV sein werden, bleibt abzuwarten.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob der nephroprotektive Effekt von endothelialen Vorläuferzellen, der 2006 von PATSCHAN et al. (2006 a+b) nachgewiesen wurde, durch die Vorbehandlung der Zellen mit Melatonin verbessert werden kann. Eine Verbesserung des nephroprotektiven Effekts kann durch die Vorbehandlung der Zellen mit EPAC-1 erreicht werden, wie von PATSCHAN et al. 2010 gezeigt. Eine Steigerung des nephroprotektiven Effekts von mesenchymalen Stammzellen wurde 2008 von MIAS et al. beschrieben.

Im Tierexperiment wurde die linke Niere von Versuchsmäusen 40 Minuten abgeklemmt. Nach der Ischämiezeit wurde die entsprechende Lösung (entsprechend der jeweiligen Gruppe) in das Gefäß der kontralateralen Niere injiziert und diese danach ektomiert, sodass die komplette Nierenfunktion von der ischämisch vorgeschädigten Niere übernommen wurde.

Eine Aussage über die Nierenfunktion wurde anhand der Kreatininwerte im Vollblut nach zwei Tagen getroffen. Die Schädigung der Nieren wurde mikroskopisch in Paraffinschnitten beurteilt und semiquantitativ ausgewertet.

Es wurden vier Gruppen untersucht und die Kreatininwerte mit einer Kontrollgruppe, der lediglich Blut abgenommen wurde, verglichen. Den Tieren der ersten Gruppe wurde nach der Ischämie 50µl physiologische Kochsalzlösung injiziert, den Tieren der zweiten Gruppe 50µl $0,5 \cdot 10^6$ EPCs, den Tieren der dritten Gruppe $0,5 \cdot 10^6$ EPCs, die vorher mit Melatonin inkubiert wurden, und den Tieren der vierten Gruppe $0,5 \cdot 10^6$ EPCs, die mit Melatonin und dem Melatoninantagonisten Luzindol vorbehandelt wurden.

Es hat sich gezeigt, dass die Kreatininwerte derjenigen Gruppe, die Zellen erhalten hat die mit Melatonin inkubiert wurden, gegenüber den anderen Gruppen stark erniedrigt waren. Ein akutes Nierenversagen kann also auch bei längerer Ischämiedauer durch die Vorbehandlung von EPCs mit Melatonin erfolgreich verhindert werden. Dies zeigte sich auch in den Paraffinschnitten. Die

Nieren, die nur mit EPCs behandelt wurden, zeigten wesentlich abgeflachtere Tubulusepithelzellen sowie eine deutliche Schädigung des Bürstensaums.

Um den Mechanismus, der zur Verbesserung des nephroprotektiven Effekts von EPCs durch Melatonin führt, zu ergründen, wurde *in vitro* gezeigt, dass EPCs, die mit Melatonin vorbehandelt wurden, mehr VEGF freisetzen als Zellen, die nicht vorbehandelt wurden.

Mit der Arbeit wurde eine weitere Strategie, neben der Vorbehandlung von EPCs mit EPAC-1, etabliert, den nephroprotektiven Effekt von EPCs zu steigern.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Operationstechnik.....	17
Abb. 2: Schematische Darstellung der Kreatininmessungen.....	21
Abb. 3: Schematische Darstellung des ELISA-Versuchs.....	26
Abb. 4: Darstellung der Mittelwerte der Kreatininmessungen.....	34
Abb. 5: Semiquantitative Auswertung der Paraffinschnitte.....	37
Abb. 6: Immunfluoreszenzaufnahmen.....	38
Abb. 7: VEGF-Freisetzung.....	39

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verdünnungsreihe für ELISA-Test.....	27
Tab. 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	29
Tab. 3: Liste der verwendeten Geräte.....	30
Tab. 4: Einzelmessungen der Kreatininwerte der untersuchten Gruppen.....	34
Tab. 5: Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung.....	36
Tab. 6: Ergebnisse der ELISA-Versuche zur VEGF-Freisetzung.....	39

8. Literaturverzeichnis

- Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G und Hambrecht R (2004): "Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 684-90
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988094>.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J M (1997): "Isolation of putative-progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, 275, 964-7
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020076>
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner J M (1999): "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization," *Circulation*, 85, 221-8
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436164>.
- Bailey A, Jiang S, Afentoulis M, Baumann C I, Schroeder D A, Olson S B, Wong M H und Fleming W H (2004): "Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells," *Blood*, 103, 13-9
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958072>.
- Baldwin H S, Shen H M, Yan H C, DeLisser H M, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum N E, Newman P J und Albelda S M (1994): "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development," *Development*, 120, 2539-53
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7956830>.
- Beltrami A P, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B und Anversa P (2003): "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration," *Cell*, 114, 763-76
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505575>.
- Brodsky S V, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F und Goligorsky M S (2002): "Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells," *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, 1140-9
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997331>.
- Case J, Mead L E, Bessler W K, Prater D, White H A, Saadatzaheh M R, Bhavsar J R, Yoder M C, Haneline L S und Ingram D A (2007): "Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors," *Exp Hematol*, 35, 1109-18
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588480>.

- Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A (1972): "The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute", *J Clin Invest*, 51, 118-26
- Goligorsky M S (2005): "Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it," *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, 871-80
- Goligorsky M S, Yasuda K und Ratliff B (2010): "Dysfunctional Endothelial Progenitor Cells in Chronic Kidney Disease" *J Am Soc Nephrol*, 21, 911-919, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395371>
- Grant M B, May W S, Caballero S, Brown G A J, Guthrie S M, Mames R N, Byrne B J, Vaught T, Spoerri P E, Peck A B und Scott E W (2002): "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization," *Nat Med*, 8, 607-12
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042812>.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher A M und Dimmeler S (2003): "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization," *Blood*, 102, 1340-6
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702503>, 2003.
- Hiasa K-I, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A und Egashira K (2004): "Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization," *Circulation*, 109, 2454-61
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148275>.
- Ingram D A, Caplice N M und Yoder M C (2005): "Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells," *Blood*, 106, 1525-31
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905185>.
- Khakoo Y und Finkel T (2005): "Endothelial progenitor cells," *Annu Rev Med*, 56, 79-101 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660503>
- Kribben A, Herget-Rosenthal S, Pietruck P, Philipp T (2003): "Acute renal failure--an review", *Dtsch Med Wochenschr*, 128, 1231-6
- Lambiase P D, Edwards R J, Anthopoulos P, Rahman S, Meng Y G, Bucknall C A, Redwood S R, Pearson J D und Marber M S (2004): "Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support," *Circulation*, 109, 2986-92
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184289>.
- Leaf A (1973): "Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury," *Circulation*, 48, 455-8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4726229>.

- Mias C, Trouche E, Seguelas M H, Calcagno F, Dignat-George F, Sabatier F, Piercecchi-Marti M D, Daniel L, Bianchi P, Calise D, Bourin P, Parini A und Cussac D (2008): "Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney," *Stem Cells*, 26, 1749-57.
- Patschan D, Plotkin M, Goligorsky M S (2006a): "Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury," *Curr Opin Pharmacol*, 6, 176-83.
- Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C und Goligorsky M S (2006b): "Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning," *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, 176-85
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478972>.
- Patschan D, Patschan S, Gobe G G, Chintala S und Goligorsky M S (2007): "Uric acid heralds ischemic tissue injury to mobilize endothelial progenitor cells," *J Am Soc Nephrol*, 18, 1516-24
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409313>
- Patschan D, Patschan S, Wessels JT, Becker JU, David S, Henze E, Goligorsky M S und Müller G A (2010): „Epac-1 activator 8-O-cAMP augments renoprotective effects of allogeneic murine EPCs in acute ischemic kidney injury,” *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, 78-85
- Planat-Benard V, Silvestre S J, Cousin B, Andr M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pnicaud L und Casteilla L (2004): "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives," *Circulation*, 109, 656-63 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734516>.
- Rafii S und Lyden D (2003): "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration," *Nat Med*, 9, 702-12
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778169>.
- Rehman J, Li J, Orschell C M und March K L (2003): "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors," *Circulation*, 107, 1164-9
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615796>.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker P H und Verfaillie C M (2002): "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow," *J Clin Invest*, 109, 337-46
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827993>.

- Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, Cosmi L, Maggi L, Lasagni L, Scheffold A, Kruger M, Dimmeler S, Marra F, Gensini G, Maggi E und Romagnani S (2005): "CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors," *Circulation*, 97, 314-22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020753>.
- Schuster M D, Kocher A A, Seki T, Martens T P, Xiang G, Homma S, und Itescu S (2004): "Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration," *Am J Physiol. Heart Circ Physiol*, 287, 525-32 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277196>.
- Urbich C und Dimmeler S (2004a): "Endothelial progenitor cells functional-characterization," *Trends Cardiovasc Med*, 14, 318-22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596109>.
- Urbich C und Dimmeler S (2004b): "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology," *Circulation*, 95, 343-53 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321944>.
- Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, Hano H, Endou H und Kanai Y (2006): "Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis," *Lab Invest*, 86, 1172-84 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969369>.
- Yamamoto T, Tada T, Brodsky S V, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F und Goligorsky M S (2002): "Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia," *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, 1150-5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997332>.
- Yoder M C, Mead L E, Prater D, Krier T R, Mroueh K N, Li F, Krasich R, Temm C J, Prchal J T und Ingram D A (2007): "Redefining endothelial cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals," *Blood*, 109, 1801-9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053059>.

Danksagung

Für die Vergabe dieser reizvollen Arbeit sowie für die hervorragende und ausdauernde Betreuung bedanke ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater PD Dr. Daniel Patschan, Oberarzt der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der UMG. Trotz seines eng gesteckten Terminkalenders nahm er sich stets die Zeit, Fragen zu beantworten und Hilfestellungen zu geben.

Weiterhin danke ich herzlichst Frau Elvira Henze für viel Geduld und Hilfsbereitschaft im Labor sowie Frau Anika Krüger für Unterstützung beim Isolieren der Zellen. Bei allen Labormitarbeitern bedanke ich mich für die freundliche Gesellschaft, Unterstützung und das tolle Arbeitsklima.

Für die Betreuung der Mäuse bedanke ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern des Tierstalls.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Mit – Doktoranden Jörg Rinneburger für die gute und konstruktive Zusammenarbeit.