

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und

Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Einfluss von humanen mesenchymalen Stammzellen und deren extrazellulärer
Vesikel auf die Leberzellschädigung und -regeneration nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Ellinger

aus München

Würzburg, Mai 2021

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Ingo Klein
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet

I. EINLEITUNG	1
1.1 ISCHÄMIE UND REPERFUSION BEI DER LEBERTRANSPLANTATION	1
1.1.1 BEDEUTUNG UND PATHOMECHANISMUS DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS IN DER LEBER	1
1.1.2 CHANCEN UND RISIKEN VON TRANSPLANTATORGANEN MIT ERWEITERTEN SPENDERKRITERIEN („EXPANDED CRITERIA DONORS“) DEFINITION UND PROBLEME DER „EXPANDED CRITERIA DONOR“-ORGANE	3
1.1.3 VORGÄNGE DER LEBERZELLREGENERATION	6
1.2 STAMMZELLBEHANDLUNG: MÖGLICHKEITEN UND PROBLEME	7
1.3 CHARAKTERISIERUNG VON FIBROBLASTEN UND DEREN EIGENSCHAFTEN IN DER GEWEBEUMSTRUKTURIERUNG UND - REPARATUR	9
1.4 HERLEITUNG DER FRAGESTELLUNG	10
II. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 TIERMODELL	11
2.1.1 VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSAUFBAU	11
2.1.2 GENERIERUNG EINES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS IN DER MAUSLEBER	12
2.1.3 ORGANENTNAHME	13
2.2 ZELLKULTUR	14
2.2.1 STAMMZELLEN (HMSC) UND FIBROBLASTEN (NHDF)	14
2.2.2 ISOLATION DER EXTRAZELLULÄRVESIKEL	14
2.3 GEWINNUNG VON SERUMPROBEN: BLUTENTNAHME UND TRANSAMINASENBESTIMMUNG	14
2.4 ANALYSE DER HISTOLOGISCHEN PROBEN	15
2.4.1 HERSTELLUNG DER GEWEBESCHNITTE	15
2.4.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	15
2.4.3 IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNG	16
2.5 DIGITAL HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	16
2.5.1 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DES NEKROSEAREALS	16
2.5.2 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER MICRODROPLETS	18
2.5.3 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	19
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	21
III. ERGEBNISSE	22
3.1 EINFLUSS VON HMSC UND NHDF UND DEREN EXTRAZELLULÄRER VESIKEL AUF DEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	22
3.1.1 VERGLEICH DER LEBERTRANSAMINASEN (AST UND ALT)	22
3.1.2 VERGLEICH DER DIREKTEN LEBERZELLSCHÄDIGUNG ANHAND DES NEKROSEAREALS	26
3.1.3 FAZIT AUS DEN PARAMETERN DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	30
3.2 EINFLUSS VON HMSC UND NHDF UND DEREN EXTRAZELLULÄRER VESIKEL AUF DIE LEBERZELLREGENERATION	30
3.2.1 AUSBILDUNG LIPIDHALTIGER MICRODROPLETS ALS AUSDRUCK HEPATIZELLULÄRER REGENERATION	31
3.2.2 LEBERZELLPROLIFERATION ANHAND DER ZAHL Ki67 – POSITIVER ZELLEN	35
3.2.3 FAZIT AUS DEN PARAMETERN DER LEBERZELLREGENERATION	40

IV. DISKUSSION	41
4.1 AUSWAHL DES OPERATIVEN ISCHÄMIE-VERFAHRENS	41
4.2 REDUKTION DES HEPATISCHEN IRI DURCH HMSC UND HMSC-EZV	42
4.3 STEIGERUNG DER LEBERZELLREGENERATION DURCH HMSC UND HMSC-EZV NACH IRI	44
4.4 VERGLEICH DER EFFEKTE VON HMSC UND NHDF UND DEREN EZV	46
4.5 MÖGLICHKEITEN DER THERAPEUTISCHEN FUNKTION VON NHDF UND DEREN EZV	48
4.6 MÖGLICHKEITEN IN DER KLINISCHEN ANWENDUNG FÜR HMSC UND HMSC-EZV	49
4.7 AUSBLICK	51
V. ZUSAMMENFASSUNG	52
VI. PUBLIKATIONEN	54
VII. LITERATURVERZEICHNIS	55
VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
X. DANKSAGUNG	
XI. LEBENSLAUF	

I. Einleitung

1.1 Ischämie und Reperfusion bei der Lebertransplantation

1.1.1 Bedeutung und Pathomechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Leber

Die Lebertransplantation ist seit der ersten erfolgreichen Transplantation im Jahr 1967 in Denver, Colorado durch Thomas Starzl die einzige kurative Therapiemöglichkeit bei akutem oder chronischem terminalem Leberversagen [1,2]. Die bisher zugelassenen Leberunterstützungsverfahren, wie die Leberdialyse anhand des „Molecular Adsorbent Recirculation Systems“ (MARS) und der „Singel Pass Albumin Dialysis“ (SPAD) oder der Plasmapherese, bewirken in den zur Verfügung stehenden Studien keinen prognostischen Vorteil und stellen somit keinen alternativen Therapieansatz dar. Eine Senkung der Mortalität konnte nicht nachgewiesen werden, weshalb das Verfahren nur bei Akkumulation toxischer Substanzen wie Harnstoff und Ammoniak, zur Symptomlinderung wie zum Beispiel Bilirubin-induziertem Juckreiz oder als „Bridging-Verfahren“ bis zur Transplantation mit geringer Erfolgsrate eingesetzt wurde [3–5].

Trotz großer Fortschritte sowohl in den Bereichen der Transplantations- als auch der Intensivmedizin gilt die primäre Transplantatdysfunktion, die nach wie vor bei etwa 8% der Patienten nach einer Lebertransplantation im postoperativen Verlauf vorkommt [1], als gefürchtete Komplikation. Das Auftreten ist mit erhöhter postoperativer Morbidität und Mortalität assoziiert. Zu dem Begriff der primären Transplantatdysfunktion werden zwei Entitäten gezählt: die frühe Transplantatdysfunktion, welche durch das verzögerte Einsetzen der Leberfunktion charakterisiert ist, oder das primäre Transplantatversagen, mit der Notwendigkeit einer frühen Re-Transplantation [3,6,7].

Als Hauptursache für eine primäre Transplantatdysfunktion gilt der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden [7,8]. Dieser beschreibt eine Schädigung von Organen im Rahmen von Minderperfusionszuständen, wie sie unvermeidlich im Transplantationsvorgang (kalte Lagerung im Rahmen des Transports zum Transplantationszentrum) und einer Unterbindung der portalvenösen und arteriellen Blutzufuhr im Rahmen ausge-

dehnter Leberresektionen oder einer traumatischen Leberzerreißung vorkommen können. Pathophysiologisch zu unterscheiden sind hier Schäden, die durch die Unterbindung der Blutzufuhr – der Ischämie – und solche, die durch die Reperfusion des Organs entstehen [8,9].

Während der Ischämie kommt es zu einem raschen Abfall des Sauerstoffangebots im Gewebe, die resultierende Hypoxie hat eine Verschiebung des Zellstoffwechsels in ein anaerobes Milieu zur Folge [10]. Die dadurch bedingte verminderte Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant führt zu einem vermehrten Anfallen saurer Valenzen mit Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Durch ein gestörtes Gleichgewicht der transmembranösen Ionenverteilung schwellen die betroffenen Zellen an, rupturieren und bilden Gewebsnekrosen aus. Das Ausmaß und die Dauer der Ischämie bestimmen dabei wesentlich die Größe der entstehenden Nekrose [11,12].

Die Phase der Reperfusion führt primär zur Wiederherstellung der zellulären Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und dem Abtransport schädlicher Stoffwechselprodukte. Allerdings kommt es durch verschiedene Prozesse zu einer Verstärkung des bereits bestehenden Gewebeschadens im Verlauf von bis zu drei Tagen, weshalb dieser Verlauf als Reperfusionssparadoxon bezeichnet wird [12,13]. Im Zentrum dieser Vorgänge stehen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), eine Mitochondrien-dysfunktion und die unspezifische Aktivierung des Immunsystems [14]. Zu Beginn der Reperusionsphase steigt die ROS-Produktion durch ein relatives Sauerstoffüberangebot in Kupfferzellen (leberspezifischen Makrophagen), sinusoidalen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und den Mitochondrien der Hepatozyten explosionsartig an. Die ROS sind hochreaktive Sauerstoffradikale, die zu ubiquitären Oxidationsvorgänge führen. Es kommt zu Störungen in der Funktion von Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Zellbestandteilen, was sich in DNA-Strangbrüchen, veränderter Membranpermeabilität, Lipidperoxidation mit Entstehung hochtoxischer Lipidverbindungen und der erhöhten Aggregationsrate von Endothelzellen und Thrombozyten äußert. Ein zweiter zentraler Vorgang der Zellschädigung während der Reperusionsphase, ist die Aggravation des bereits bestehenden ATP-Mangels. Eine mitochondriale Dysfunktion, ausgelöst durch Veränderungen der Mitochondrienmembranpermeabilität mit negativem Einfluss

auf die Atmungskette verstärkt den ATP-Mangel [14]. Als Folge tritt ein massiver Energiemangel innerhalb der Zellen auf [12,15,16]. Der dritte entscheidende Mechanismus ist die unspezifische Aktivierung des Immunsystems. Im Zentrum steht hier die mediatorengetriggerte Invasion unterschiedlicher Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in geschädigte Organareale. Ursprung dieser Mediatoren sind vor allem Kupfferzellen (von Kupffersche Sternzellen), Endothelzellen und Sinusendothelzellen, Makrophagen und Mastzellen. Durch den nekrotischen Zelluntergang und weiterer Bildung von ROS, kommt es zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 oder auch TNF- α und Chemokinen wie Histamin oder Serotonin. Dadurch werden zum einen neutrophile Granulozyten und Lymphozyten rekrutiert, zum anderen vermehrt direkt zellschädigende Enzyme wie Proteasen oder Kollagenasen freigesetzt [11,13,15]. Dieses komplexe Zusammenspiel aus der Freisetzung zytotoxischer Stoffwechselprodukte, direkte immunzellvermittelte Hepatozytenschädigung und Veränderungen im zelleigenen Stoffwechsel führen zu einer Verstärkung der Leberschädigung, die während der Minderperfusion in der ischämischen Phase bereits entstanden sind [13,15].

1.1.2 Chancen und Risiken von Transplantatorganen mit erweiterten Spenderkriterien („expanded criteria donors“) Definition und Probleme der „Expanded Criteria Donor“-Organe

Eine besonders bedeutend Rolle für die weitere Funktion und damit eine erfolgreiche Transplantation spielt der Ischämie-Reperfusionsschaden bei Organen von Spendern mit bestimmten Risikofaktoren [17]. Anhand retrospektiver Studien wurden für die Lebertransplantation folgende spezifische erweiterte Spenderkriterien (expanded criteria donor – ECD) ermittelt: Ein Spenderalter über 65 Jahre, ein Intensivaufenthalt länger 7 Tage, ein Body-Mass-Index (BMI) größer 30 kg/m², eine histologisch gesicherte Leberverfettung größer 40%, ein Serum-Natrium > 165 mmol/l, eine Transaminasenerhöhung größer 3fach der Norm oder ein Serum-Bilirubinwert >3mg/dl [18]. Die Bundesärztekammer ergänzt zudem in ihren „Richtlinien zur Organtransplantation“ von 2019 folgende organunabhängige erweiterte Spenderkriterien: maligne Tumore in der Voranamnese, Drogenabhängigkeit, Virushepatitis (HCV), Sepsis mit positiver Blutkultur

oder Meningitis [18]. Aufgrund des persistierenden Organspendemangels einerseits, und der stetigen Zunahme der Neulistungen für eine Lebertransplantation im Eurotransplantraum andererseits entsteht eine immer größer werdende Lücke zwischen dem Organangebot und dem Bedarf. Ende 2019 warteten allein in 1.865 Patienten auf eine Lebertransplantation, 317 Patienten sind im selben Jahr an ihrer Lebererkrankung vor einer Transplantation auf der Warteliste verstorben [19]. Bedingt durch den enormen Bedarf und den drohenden fatalen Verlauf auf der Warteliste, nahm die Bereitschaft von Ärzten und Patienten in den vergangenen Jahren zu, Organe mit erweiterten Spenderkriterien trotz der beschriebenen Risiken für eine Lebertransplantation zu akzeptieren. Dies führte zu einer relativen Zunahme des Anteils von Organen mit erweiterten Spenderkriterien, insbesondere von Organspender mit einem Alter über 65 [17,20,21].

Durch vermehrte Transplantationen von Organen, die eins oder mehrere oben genannter ECD – Kriterien erfüllen, kann dem Organmangel zwar entgegengewirkt werden, allerdings zeigen ebendiese Lebern eine erhöhte Empfindlichkeit für den Ischämie-Reperfusionsschaden [20,21]. Eine hohe Assoziation mit schlechteren 1-Jahres-Überlebensraten und erhöhtem Risiko für primäre Transplantatdysfunktion zeigen vor allem organspezifische Parameter, wie hohes Spenderalter und Leberzellverfettung. Weitere von der Bundesärztekammer nicht erwähnte Parameter, wie eine lange kalte Ischämiezeit oder auch einer in Deutschland bisher nicht zulässigen Spende nach Herzstillstand führen auch zu erhöhten Mortalitätsraten innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation [17,21]. Diese Organe zeigen eine geringere Ischämietoleranz, eine erhöhte Empfindlichkeit für ROS und durch Immunzellen freigesetzte Proteasen aufgrund schon bereits bestehende Parenchymveränderungen [12,16].

Von besonderer Bedeutung ist neben dem Spenderalter auch die die Leberzellverfettung, die auch als hepatische Steatose bezeichnet wird. Histopathologisch lassen sich zwei Unterformen feststellen, die mikrovesikuläre und makrovesikuläre Steatose. Die Grenze zwischen diesen beiden Entitäten stellt die Größe der intrazellulären Fettdepots von kleiner oder größer ein Millimeter im Durchmesser dar [17,22]. Diese Differenzierung ist in Bezug auf den Ischämie-Reperfusionsschaden von großer Bedeutung, da nur eine makrovesikuläre Steatose signifikante Unterschiede der Transplantatfunktion und

des Patientenüberlebens im Vergleich zu nicht verfetteten Transplantaten zeigt [23,24]. Der zugrundeliegende Pathomechanismus lässt sich einerseits durch den erhöhten ROS-Spiegel erklären. Die Triglyceriddepots dienen als Basis für eine gesteigerte Lipidperoxidation, bei der viele Sauerstoffradikale entstehen. Transplantate mit starker Verfettung weisen zudem eine erhöhte Kupferzellaktivität auf, die wiederum mit erhöhter ROS-Produktion und der Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren wie TNF α oder IL-1 oder IL6 einhergeht. Als Folge werden vermehrt Endothelschäden mit Veränderungen in der Gefäßarchitektur und dadurch verminderten sinusoidalen Blutfluss, eine zusätzliche Verschlechterung der Membranintegrität und eine stärkere Aktivierung des Immunsystems beobachtet [12,23]. Das Überangebot an freien Fettsäuren führt zudem zu einer schon vor Induktion der Ischämie bestehenden mitochondrialen Dysfunktion durch oxidative Schäden auf dem Boden erhöhter β -Oxidationsaktivität in den Mitochondrien und Cholesteroleinlagerungen in die mitochondriale Membran mit der Folge einer erhöhten Permeabilität [23,24]. Durch diese vorbestehenden Fehlregulationen und Zellschäden kommt es in steatotischen Organen zu einer Exazerbation des Ischämie-Reperfusionsschadens [17,23].

Neben der Unterscheidung einer mikro- und makrovesikulären Hepatosteatoze ist das Gesamtausmaß der Verfettung ausschlaggebend. Eine makrovesikuläre Steatoze zeigt erst mit mehr als 30% Parenchymverfettung signifikant höhere postoperative Transaminasenwerte und erhöhte Raten an primärer Dysfunktion [23,25]. So konnte in einer großen retrospektiven Studie aus dem Jahr 2010 mit einem Patientenkollektiv von 21 777 transplantierten adulten Lebern verstorbener Spender eine makrovesikuläre Steatoze von über 30% des Leberparenchyms als unabhängiger Risikofaktor für ein Transplantatversagen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation identifiziert werden. Im Vergleich zu Patienten mit unter 30% Leberparenchymverfettung war das Risiko ein Transplantatversagen zu entwickeln um 71% erhöht [25]. Ein Organ mit makrovesikulärer Steatoze über 60% gilt allgemein als nicht transplantabel, neuere Studien zeigen allerdings in Abwesenheit weiterer Risikofaktoren und sorgfältiger Empfänger-auswahl durchaus akzeptable Werte für das Transplantat- und Patientenüberleben [17,21,25].

1.1.3 Vorgänge der Leberzellregeneration

Die Leber besitzt als einziges Organ die Fähigkeit, selbst nach Verlust von mehr als zwei Drittel des Leberparenchyms durch gezielte Regenerationsvorgänge ihre Ursprungsmasse innerhalb von Tagen wiederherzustellen, während sie gleichzeitig weiterhin ihre diversen lebenswichtigen Synthese- und Entgiftungsfunktionen aufrechterhalten kann [26].

Eine weitere Besonderheit der Leberregeneration ist im Vergleich zu vielen anderen Organsystemen wie dem blutbildenden Knochenmark oder der Haut das Fehlen von Stammzellen oder anderweitigen Progenitorzellen, die sich bei Bedarf in die unterschiedlichen organspezifischen Zellen umwandeln können. Die Regeneration wird hier nur durch Zellproliferation und Zellteilung der bestehenden nicht beschädigten lebereigenen Zellen angetrieben, die von einem ruhenden Status (G_0 -Phase) durch mediatorvermittelte Aktivierung wieder in den Zellzyklus (G_1 -Phase) eintreten [27]. Allerdings ist eine Umwandlung zwischen den einzelnen in der Leber vorkommenden Zelltypen möglich, so können bei Bedarf biliäre Epithelzellen zu Hepatozyten und auch Hepatozyten zu biliären Epithelzellen differenzieren [28].

Bereits Minuten nach der initialen Leberzellschädigung wird durch ein komplexes Zusammenspiel an verschiedensten Mediatoren der Regenerationsvorgang initiiert, der im Wesentlichen aus Zellaktivierung mit Zellproliferation und Hyperplasie, sowie metabolischen Veränderungen im Fettstoffwechsel besteht [26,27]. Die ersten Zellen, die in den Regenerationsprozess eintreten sind die Hepatozyten. Treibende Faktoren sind hier die Wachstumshormone „hepatocyte growth factor“ HGF aus den Ito-Sternzellen (leber-eigene Myofibroblasten), „endothelial growth factor“ (EGF) aus dem Duodenum sowie durch Kupfferzellen sezernierte Zytokine wie $TNF\alpha$ oder IL-6, die zu einer Expression und Transkription von über 100 normalerweise ruhenden Genen führen [28–30]. Die betroffenen Hepatozyten treten aus der G_0 -Phase des Zellzyklus aus und beginnen mit der DNA-Neusynthese und Aktivierung der Proteinbiosynthese (S-Phase). Als zusätzliche Verstärker dieser Vorgänge fungieren durch die Blutbahn eingeschwemmte Katechola-

mine, Insulin oder auch Östrogene [26,28]. Im Verlauf kommt es durch parakrine Botenstoffe interzellulärer Kommunikation zur Aktivierung und Proliferation von Zellen des Gallengangsepithels, des Endothels, sowie Kupffer- und Ito-Sternzellen, wodurch die Wiederherstellung der ursprünglichen Lebermasse in der Regel innerhalb von 10 Tagen erfolgt [28,29].

Im Rahmen der Hepatozytenproliferation kommt es zu einer Veränderung des Zellmetabolismus. Bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Regenerationsstimulus in Form einer Leberzellschädigung beginnen die Hepatozyten vermehrt Triglyzeride und Cholesterin in Form von intrazellulären Fettdepots einzulagern [27,28,31]. Ausgelöst wird dies durch Expression von Genen während der Hepatozytenproliferation, die physiologisch der Differenzierung von Adipozyten und Fettsäuresynthese zugeordnet werden können [31]. Dabei sind diese intrazellulären Fetteinlagerungen, welche sonst Ausdruck einer pathologischen Leberveränderung sind, nur von kurzer Dauer. Nach Abschluss der regenerativen Vorgänge kommt es zum Verbrauch der lipidhaltigen Substanzen und Remodulierung der intrazellulären Hepatozytenstruktur [27,28]. Die intrazellulären Fettdepots sind ein wichtiger Energiespeicher für die Zellproliferation und dienen zusätzlich als Lipidquelle für die Synthese von Zellmembranbestandteilen, Lipoproteinen und Gallensäuren, sind also für eine erfolgreich ablaufende Zellregeneration unerlässlich [27,32].

1.2 Stammzellbehandlung: Möglichkeiten und Probleme

Um das Transplantat- und damit auch das Patientenüberleben sicherstellen zu können und somit eine sichere Transplantation von ECD – Lebern zu ermöglichen, ist eine Reduktion des IR – Schadens sowie die Förderung der Leberzellregeneration erforderlich. Ein vielversprechender Ansatz ist eine um die Transplantation stattfindende Konditionierung mit mesenchymalen Stammzellen [33,34].

Zum ersten Mal wurden mesenchymale Stammzellen, in der Literatur „mesenchymal stroma cell“ oder „mesenchymal stem cells“ kurz „MSC“ genannt, durch Friedenstein

vor 40 Jahren isoliert und untersucht [35]. Ihm gelang es fibroblastenähnliche Zellen mit der Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Chondrozyten, Myeloblasten und Adipozyten aus dem Knochenmark zu isolieren [36]. MSCs gelten heute als adulte Stammzellen, also Zellen aus vollständig differenziertem Gewebe mit multipotenter Plastizität, die sich zu allen Zelltypen des Mesenchyms, dazu gehören Zellen des Bindegewebes, der Knorpel- und Knochensubstanz, Muskelzellen, Zellen des blutbildenden Systems sowie Zellen einiger Organe wie Leber, Milz oder sogar auch Darm, ausdifferenzieren können [37]. Die Hauptquelle im Körper bildet das Knochenmark, eine Isolation ist aber auch aus dem Fettgewebe, dem peripheren Blut, und intestinaler Organe möglich. Durch die einfache und wenig invasive Gewinnung dieser Zellen durch eine Knochenmarkspunktion oder auch durch Liposuktion, sowie einer einfachen Überführung in Zellkultursysteme sind MSCs für die klinische und experimentelle Forschung gut geeignet [38].

Eine Hauptaufgabe dieser Stammzellen ist die Unterstützung der Zellproliferation und die Reparatur von beschädigtem Gewebe. Seit Entdeckung dieser Stammzellpopulation sind MSCs deshalb ein zentrales Forschungsthema der „Regenerativen Medizin“ [39]. In den letzten Jahren konnten in Tierversuchsmodellen und ersten klinischen Studien bereits positive therapeutische Effekte durch Stammzellbehandlung nachgewiesen werden. Verbesserte Gewebsreparaturfunktionen, Abschwächung der Entzündungsreaktion, sowie niedrigere Fibrose- und auch Zelltodraten konnten vor allem nach Myokardinfarkten [40,41] oder in der Behandlung einer akuten Nierenschädigung [42,43] nachgewiesen werden. Deshalb rückt der Einsatz von Stammzellen in der Leberchirurgie insbesondere der Transplantationschirurgie immer mehr in das Interesse der Forschungsgemeinde.

Doch die Therapie mit kultivierten Stammzellen gilt aber auch nach intensiver Forschung der letzten Jahre nicht als völlig unbedenklich. Durch oft extensive Expansion in den Zellkulturen kann es zu Chromosomeninstabilitäten kommen [44], die Zellen entwickeln ein karzinogenes Eigenpotential und können zu Tumorentwicklung an Mäusen nach systemischer Injektion der Zellen führen [45]. Zudem werden unphysiologisch hohe Gewebskonzentrationen der MSC erreicht, es kann zu einer lokalen Aggregatbildung mit eigenem umgebenden Mikromilieu und Ausbildung organfremder Gewebeformationen

kommen. So wurde nach Stammzellbehandlungen in der Niere die Ausbildung von intraglomerulären Adipozyteninseln [46] oder am Herzen die Bildung von Knochenmatrix beobachtet [47].

Neuere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass durch mesenchymale Stammzellen vermittelte Effekte auf die Geweberegeneration hauptsächlich parakriner Natur zu sein scheinen [36,39]. Nach intravenöser Injektion verbleibt der Hauptteil der Zellen in den mikropillären Netzwerken der Lunge [48], weniger als 1 % erreicht das Zielgewebe [49]. Im Zentrum dieses Mechanismus stehen extrazelluläre Vesikel als Signaltransduktoren. Der Inhalt dieser Vesikel unterscheidet sich je nach Zellfunktion, setzt sich aber aus Proteinen, Lipidverbindungen und RNA-Anteilen zusammen [50,51]. Durch externe Stimuli wie Hypoxie, Entzündungsreaktionen oder oxidativem Stress kommt es zur Fusion der intrazellulären multivesikulären Körperchen aus dem Endosom mit der Plasmamembran und so zur Freisetzung dieser Exosomen in Form von Extrazellulärvesikeln in den Extrazellulärraum [39].

In bereits durchgeführten Mausmodellen zur Leberzellregeneration nach Ischämie-Reperfusionsschaden mit therapeutischer Injektion von mesenchymaler Stammzellen und deren Vesikeln konnte eine Abminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens durch Steigerung der Aktivität antioxidativer Enzyme und vermindertem oxidativem Stress während der Reperfusion beobachtet werden. Durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF und Sekretion von TNF α und IL-6 kommt es zudem zu einer gesteigerten Hepatozytenproliferation und abgeschwächter Entzündungsreaktion [49,52,53].

1.3 Charakterisierung von Fibroblasten und deren Eigenschaften in der Gewebeumstrukturierung und -reparatur

Fibroblasten sind ähnlich den MSCs Zellen mesenchymalen Ursprungs und werden als Stromazellen mit spindelförmiger Morphologie und fehlenden epithelialen, vaskulären und leukozytären Oberflächenmarkern beschrieben. Als ihre Hauptaufgabe gilt die Synthese und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) in vielen unterschiedlichen Gewebearten, wie zum Beispiel in der Haut aber auch im Herzen, in der Lunge, der

Niere oder der Leber [54,55]. Zusätzlich zu ihrer gut erforschten Rolle in der primären Wundheilung durch Narbenbildung aus ECM [56], rücken parakrine Effekte der Fibroblasten immer mehr in den Fokus klinisch-experimenteller Studien. Fibroblasten produzieren neben Wachstumsfaktoren wie EGF oder VEGF auch Zytokine und Chemokine wie TNF α oder Interleukine. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden führen zu Zelldifferenzierung und Morphogenese zum Beispiel von Endothel- oder Epithelzellen und scheinen auch eine essentielle Rolle in den Vorgängen der Gewebeentwicklung und -reparatur zu spielen [54,56]. Sie ähneln dadurch den MSCs nicht nur im mesenchymalen Ursprung und der Morphologie, sondern scheinen auch ein regeneratives Potenzial zu haben. Allerdings beschreiben mehrere Studien eine geringere Differenzierungspotenz im Vergleich zu den Stammzellen [55,57].

1.4 Herleitung der Fragestellung

Die bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse zur Behandlung des Ischämie-Reperfusionsschadens durch therapeutische oder präemptive Injektion mesenchymaler Stammzellen in Nagetieren behandelten fast ausschließlich die Auswirkungen auf diverse Parameter der Leberzellschädigung und Regeneration innerhalb der ersten 24 Stunden [48,49,58–62].

Ziel dieser Arbeit war es, Auswirkungen einer präemptiven Behandlung mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und den ihnen morphologisch eng verwandten Fibroblasten („Normal human Dermal Fibroblasts“ NHDF) bis zu 72 Stunden nach Beginn der hepatischen Reperfusion zu untersuchen. Dabei wurden die Effekte nach intravenöser Injektion von Zellsuspensionen mit denen der Extrazellulärvesikel verglichen. Im Zentrum stand dabei die histologische Auswertung der hepatozytären Schädigung und eine Analyse der Leberzellregeneration.

II. Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde, der Regierung von Unterfranken, genehmigt (Projektnummer: DMS-2532-2-111) und in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie dem europäischen Tierschutzrecht durchgeführt. Als Versuchstiere wurden weibliche, zum Lieferzeitpunkt 10 Wochen alte BL/6 Mäuse aus dem Zuchtlabor Janvier in Frankreich bezogen. Sie unterlagen einem circadianen Rhythmus und hatten freien Zugriff auf Wasser und Nahrung. Nach frühestens 7 Tagen und bei einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g wurden die Mäuse in den Versuch genommen.

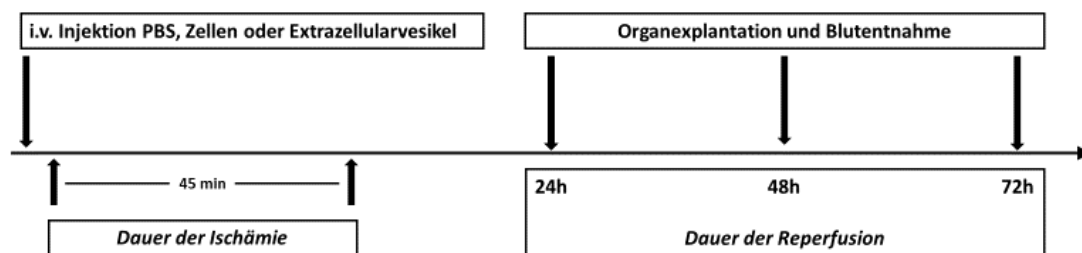


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die Versuchstiere wurden in 5 Gruppen mit je 5 Versuchstieren eingeteilt, je nach injiziertem Material: mit Phosphat angereicherte 0,9 %-ige Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline= PBS), humane dermale Fibroblasten (normal human dermal fibroblasts = NHDF), NHDF-EZV, humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sowie hMSC-EZV. Die PBS- sowie Fibroblasten-Gruppen dienten als Kontrollgruppe für die mit Stammzellen behandelten Tiere. Die intravenösen Injektionen erfolgte fünf Minuten vor Ischämiebeginn, es wurden 1×10^6 NHDF und hMSC sowie 70 μg NHDV-MV beziehungsweise hMSC-MV oder 200 μl PBS verabreicht. Die Explantation und Serumentnahme erfolgte nach 24, 48 und 72 h (Abbildung 1).

2.1.2 Generierung eines Ischämie-Reperfusionsschadens in der Mausleber

Der operative Eingriff wurde in tiefer Narkose mit Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) sowie begleitender Analgesie durch Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht) i.p. durchgeführt. Um normotherme Verhältnisse zu schaffen befanden sich die Tiere während der gesamten Operationszeit auf einer Wärmematte, die Körperkerntemperatur wurde zudem alle drei Minuten über eine rektale Sonde dokumentiert. Nach Medianlaparotomie und Präparation der Strukturen des Leberhilus wurde die arterielle und portalvenöse Blutzufuhr des medianen und linken Leberlappens (entsprechend einer 70 % Ischämie des gesamten Lebergewebes) mittels einer Gefäßklemme (Yasargil, Mikroklemme) für 45 Minuten unterbunden. Die Blutzufuhr des rechten Leberlappens wurde nicht beeinträchtigt und ein portalvenöser Rückstau so verhindert. Während der 45-minütigen Ischämie wurde die Bauchdecke mit Klemmen verschlossen, um Temperaturschwankungen oder Feuchtigkeitsverluste zu minimieren. Nach 45 Minuten wurde das Abdomen durch Entfernen der Klemmen erneut eröffnet, die Blutzufuhr durch Entfernen der Gefäßklemme wiederhergestellt und die Bauchdecke zweischichtig mit je einer fortlaufenden Naht verschlossen (Abbildung 2). Die postoperative Analgesie erfolgte mit Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht, s.c.) alle 12 Stunden an jedem weiteren Analysetag.

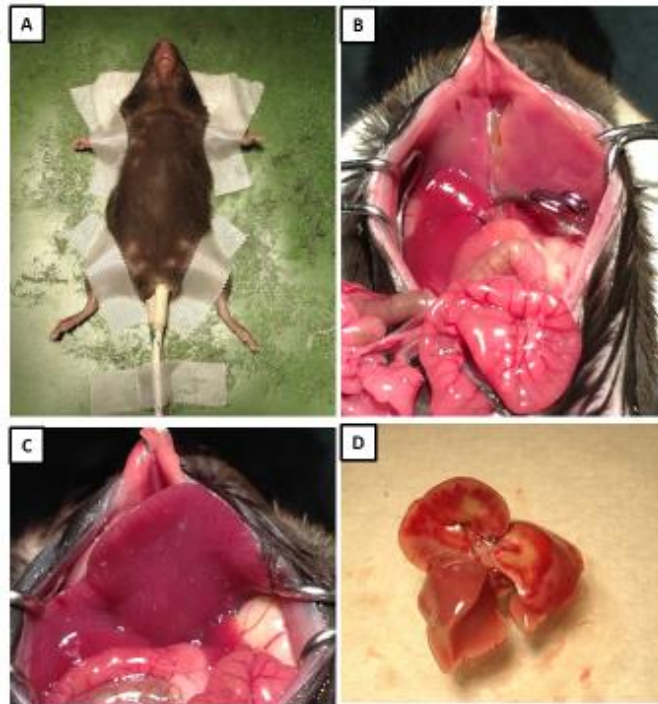


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Operationsschritte: A: Fixierte anästhesierte Maus auf der Wärmematte mit rektal eingeführter Temperatursonde. B: Zustand nach Längslaparotomie, atraumatischer Gefäßclip auf den Ästen der V. porta und A. hepatica mit resultierender Ischämie der beiden kranialen Leberlappen (blass entfärbt). C: Reperfusionssituation direkt nach Entfernung der Gefäßklammer (betroffene Leberlappen livide verfärbt). D: Zustand nach Organentnahme, Nekrose der kranialen Leberlappen.

2.1.3 Organentnahme

Die Probeentnahme für weitere Analysen erfolgte 24, 48 bzw. 72 h nach Reperfusion, in erneuter i.p. Narkose. Zur Bestimmung der Lebertransaminasen wurde Vollblut aus der Vena cava inferior entnommen, zentrifugiert und die Serumüberstände zur Analyse in das hausinterne Zentrallabor versandt. Die Tötung der Tiere erfolgte nach der Entnahme der Leber und Durchtrennung des Myocards. Die entnommene Leber wurde standardisiert aufgearbeitet. Dazu wurde stets der mittlere Abschnitt aus den entsprechenden Lappen geschnitten in Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Stammzellen (hMSC) und Fibroblasten (NHDF)

Die hMSC (humane mesenchymal stem cells) und NHDF (normal human dermal fibroblasts) wurden von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die Kultivierung der hMSC erfolgte mit Stammzellmedium von PromoCell (C-28009 plus 1% Penicillin/Streptomycin). Die Fibroblasten wurden in einem ebenfalls von PromoCell kommerziell erworbenen „Fibroblast-Growth-Medium-2“ (C-23020 plus 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert.

2.2.2 Isolation der Extrazellulärvesikel

Die Vesikel wurden aus dem Zellkulturüberstand der hMSC- und NHDF-Kultur gewonnen. Dafür wurden die Zellen nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers einem 48-stündigen Serumentzug ausgesetzt. Der Überstand aus diesen Zellkulturen wurde dann bei 1600 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Filtrierung durch einen 45 µm-Filter (Hartenstein, Würzburg, Deutschland) erfolgte eine erneute Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4 °C (Sorvall Discovery 90SE) für eine Stunde. Nach einer Waschung mit PBS wurden die EZV mittels dynamischer Lichtstreuung (NanoSight, Malvern Analytical GmbH, Kassel, Deutschland) gezählt und vermessen. Die Vesikel wurden anschließend bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet.

2.3 Gewinnung von Serumproben: Blutentnahme und Transaminasenbestimmung

Das aus der Vena cava inferior entnommene Vollblut des Versuchstiers wurde sofort bei 4 °C zentrifugiert und anschließend in das hausinterne Zentrallabor der Universität Würzburg eingeschickt.

Die Enzymaktivität im Serum der ALT und AST wurden nach klinikinternem Standard und Anweisungen des Herstellers an dem Gerät Cobas Integra 800 der Firma Roche (Basel, Schweiz) gemessen und in internationalen Einheiten pro Liter dargestellt (U/l).

2.4 Analyse der histologischen Proben

Von jedem Versuchstier erfolgte je eine HE - und eine immunhistochemische Färbung mit Ki67. Zur besseren Beurteilbarkeit eines jeden Färbevorganges wurde bei jedem Durchlauf ein Kontrollschnitt eines unbehandelten Tieres mitgefärbt und ausgewertet.

2.4.1 Herstellung der Gewebeschnitte

An einem Schlittenmikrotom der Firma Leica (Jung Histoslides 2000, Wetzlar, Deutschland) wurden von dem linken Leberlappen jedes Versuchstieres mehrere 1 µm dicke Schnitte durch den gesamten Längsverlauf des Präparates erstellt. Je zwei zuvor im Wasserbad geglättete Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen. Im Anschluss trockneten die Präparate in einer Trockenkammer bei 45 °C für mindestens 48 h.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Deparaffinieren der Präparate in Xylol-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte eine Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96% und zuletzt 80% Alkohollösung. Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurde für 15 Minuten eine Kernfärbung in Hämalaun (wässrig) nach Meyer durchgeführt unter fließendem Leitungswasser sowie am Ende mit destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung in 1 %-igem Eosin (wässrig) für fünf Minuten und erneutes Spülen in Leitungs- und destilliertem Wasser. Vor dem Einbetten der Schnitte mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 95 %, 100 % Alkohol sowie in Xylol erneut dehydriert. Am Ende wurden die Präparate für 12 h unter dem Abzug getrocknet.

2.4.3 Immunhistologische Färbung

Die Deparaffinierung und Dehydrierung erfolgten analog zur HE-Färbung. Im Anschluss wurden die Präparate mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) auf einer Rollmischer Wipp-Plattform gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidase wurde mit einer 3 % H₂O₂/PBS-Lösung für zehn Minuten durchgeführt. Für die Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte für 40 Minuten in einem 90 °C heißem Wasserbad in Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert und unter Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden 200 µl Antibody-Diluent (Dako, Carpinteria, USA) mit einem monoklonalem Hasenantikörper gegen Ki67 (Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:500 auf jeden Objektträger aufgetragen. Die Einwirkzeit in einer feuchten Kammer bei 4 °C betrug mindestens 12 h. Als 2. Antikörper wurde 200 µl goat-anti-rabbit/HRP-AK (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gemischt mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,6) in einer Verdünnung von 1:100 auf die Objektträger aufgetragen. Die Einwirkzeit in einer trockenen Kammer bei Raumtemperatur betrug 60 Minuten. Im Anschluss konnten die Präparate mit flüssigem DAB (Diaminobenzidine, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit einer Einwirkzeit zwischen 3-4 Minuten unter Mikroskopkontrolle entwickelt werden. Am Ende erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun für 15 Sekunden. Die abschließende Dehydrierung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol genau wie die Einbettung mit Entellan analog zur HE-Färbung.

2.5 Digital histologische Auswertung

2.5.1 Quantitative Auswertung des Nekroseareals

Zur Berechnung des prozentualen Nekroseanteils im Verhältnis zur Gesamtfläche eines jeden Gewebeschnittes wurde ein digitales Mikroskop (KEYENCE Fluoreszenzmikroskop BZ-9000, Neu-Isenburg, Deutschland) und einem entsprechenden Bildanalyseprogramm (BZ-Analyzer, BZ-H1AE, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) eine Gesamtaufnahme eines jeden Schnittes in 20-facher Vergrößerung erstellt. Zur Auswertung wurden dabei

immer Schnitte des links lateralen Leberlappens verwendet. Dabei wurden die Aufnahme­fläche und die Schichtanzahl (2 Schichten mit kleinstmöglicher Schichtdicke) am elektronischen Mikroskop manuell festgelegt. Mit Hilfe der automatischen Merge-Funktion des B-Zell-Analyzers konnten die Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

Das Nekroseareal wurde unter Verwendung der Hybrid-Cell-Count-Funktion des BZ-Analyzers im Single-Extraction-Modus unter Aussparung großer Gefäße bestimmt und mittels Farbkodierung durch das Programm selbst und manueller Korrektur festgelegt (Abbildung 3). Die später angegebenen Prozentwerte in Bezug auf die Nekrosefläche einzelner Präparate geben immer das Verhältnis von nekrotischen Arealen zur Gesamt­schnittfläche wieder.

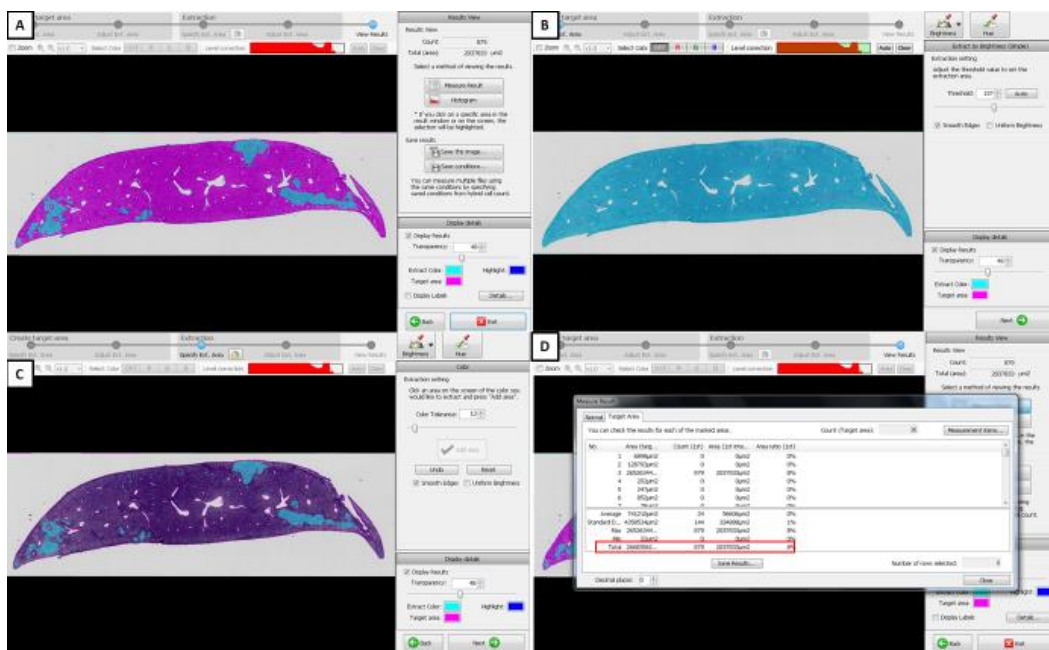


Abbildung 3: Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung des Nekroseareals. (A) nach Bestimmung der Gesamtzellfläche (B) und des Nekroseareals (C) mit automatischer Berechnung durch den B-Zell-Analyser (D).

2.5.2 Quantitative Auswertung der Microdroplets

Die Auswertung der Microdroplets erfolgte als prozentualer Anteil der mit fett gefüllten Vakuolen an der Gesamtschnittfläche mit Aussparung von Gefäßen oder Artefakten in 40-facher Vergrößerung. Im Rahmen des Färbeprozesses kommt es durch Inkubation in Alkohollösungen unterschiedlicher Konzentrationen zum Herauslösen von Fettbestandteilen aus dem Gewebe. Die Microdroplets stellen sich dadurch als leere Tropfen in der Mikroskopie dar und sind gut gegenüber dem restlichen Gewebe abgrenzbar. Pro Leberlappen wurden 10 Aufnahmen mit dem KEYENCE-Mikroskop gemacht. Mit Hilfe einer wie bei der Auswertung des Nekroseareals erstellten Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung erfolgten die 10 Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung nach einem festgelegten Schema (Abbildung 4).

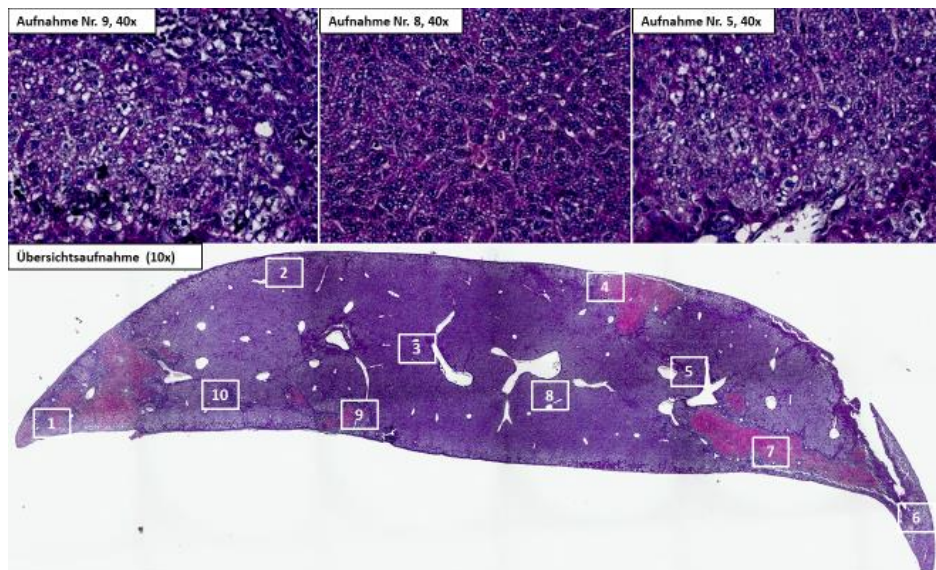


Abbildung 4: Repräsentative Darstellung der Mikroskopaufnahmen der Microdroplet-Auswertung. Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung mit Aufnahmeschema der 10 ausgewerteten Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

Die quantitative Auswertung erfolgte ähnlich wie die Bestimmung des Nekroseareals mit dem Single-Extraction-Modus des B-Zell-Analyzers. Auch hier wurde mittels farbkodier-

ter Markierung der Microdroplets und manueller Korrektur mit Aussparung von Gefäßen, Sinusoiden und Artefakten die Fläche der Microdroplets als prozentualer Anteil zur Gesamtzellfläche einer jedem Mikroskopaufnahme bestimmt (Abbildung 5).

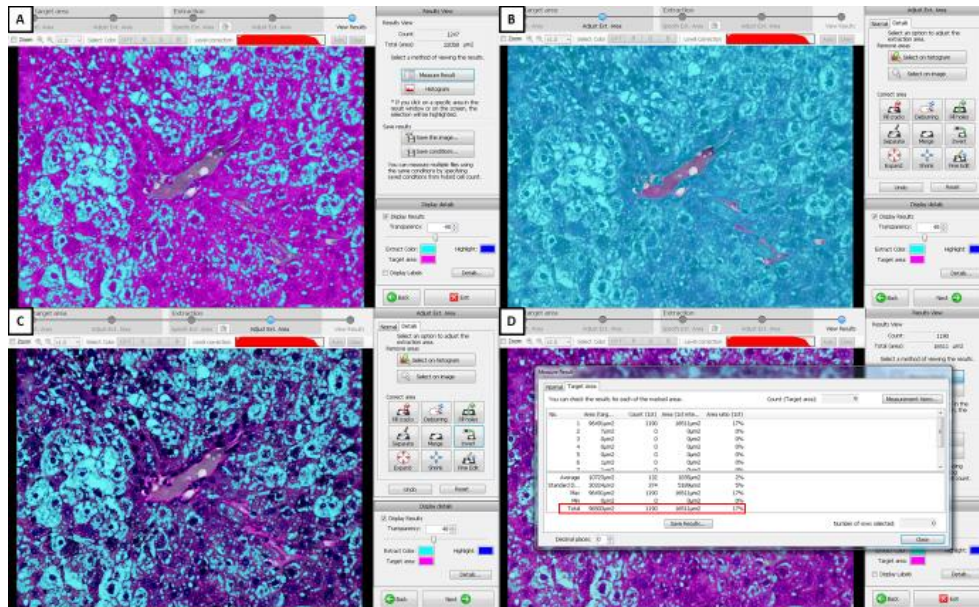


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung des Microdropletanteils. (A) nach Bestimmung der Gesamtzellfläche unter Aussparung von Gefäßen und Artefakten (B) und der Fläche der Microdroplets (C) mit automatischer Berechnung durch den B-Zell-Analyzer (D).

2.5.3 Quantitative Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Ki67-Färbung erfolgte als quantitative Angabe der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro Mikroskopaufnahme. Ähnlich der Microdroplets-Auswertung wurden 10 Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung mit dem KEYENCE-Aufnahmemikroskop nach Erstellung einer Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung und festem Aufnahmeschema aufgenommen (Abbildung 6).

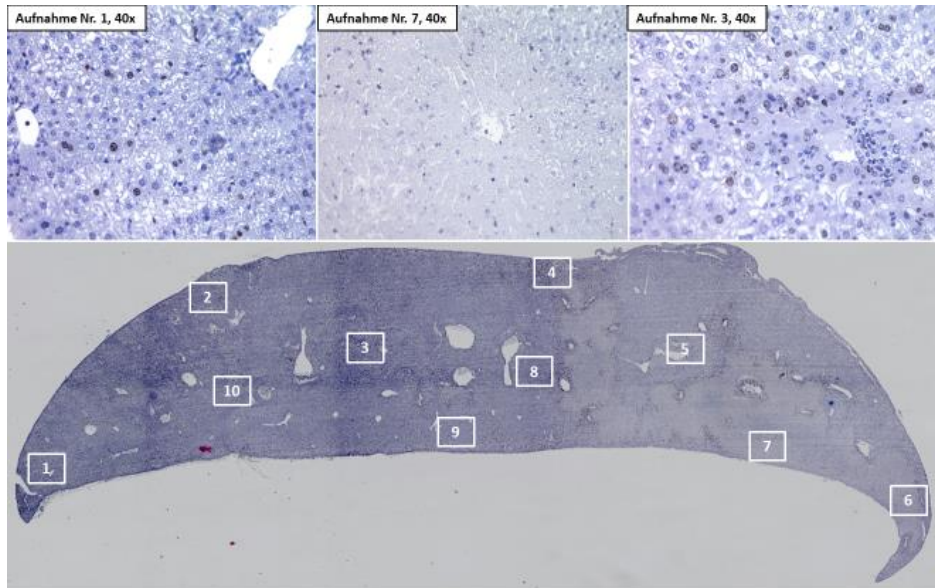


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung Mikroskopaufnahmen der Ki67-Auswertung. Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung mit Aufnahmeschema der 10 ausgewerteten Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

Anschließend wurden die Ki67-positiven Hepatozyten durch das automatische Auswertungsprogramm des BZ-Analyzers gezählt und für jeden Schnitt manuell nachkorrigiert. Die Angabe erfolgte in Ki67-positiven Hepatozyten pro HPF-Aufnahme in 40-facher Vergrößerung (siehe Abbildung 7).

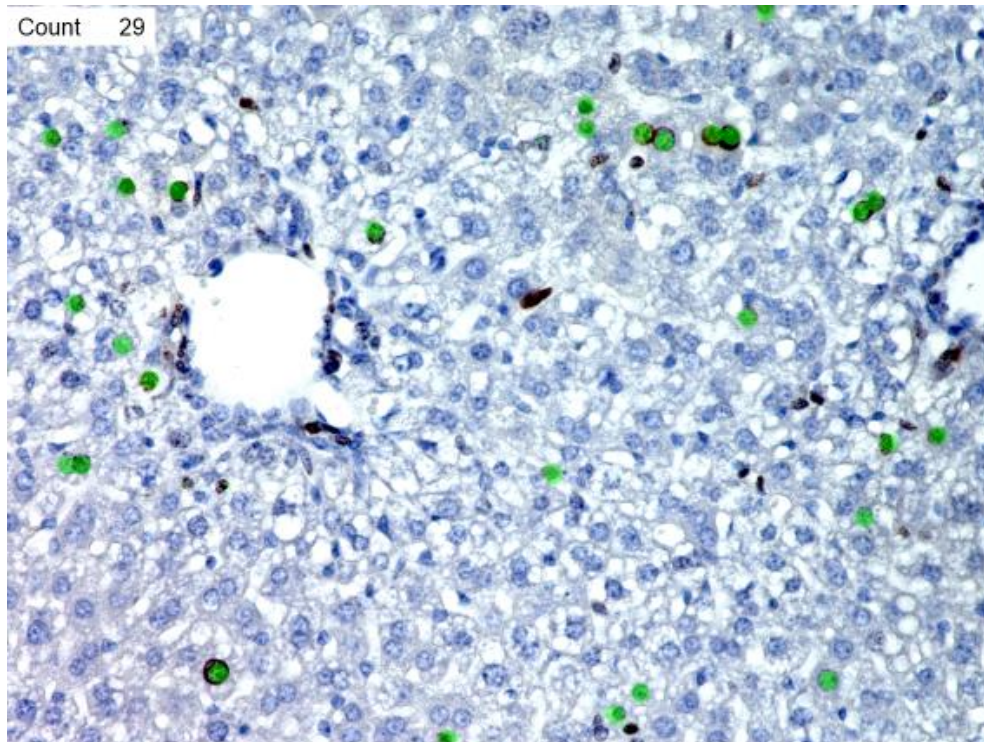


Abbildung 7: Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung der Ki67-Färbung anhand einer Mikroskopaufnahme in 40-facher Vergrößerung. Bearbeitung mittels der Cell-count-Funktion des B-Zell-II-Analyzers: Ki67-positive Hepatozyten (bräunlich verfärbter Zellkern) grün markiert, Anzahl („Count“) links oben im Bild.

2.6 Statistische Auswertung

Die tabellarische Datenerfassung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Excel (Office 365, Microsoft Corporation, Seattle, USA), die statistische Auswertung sowie die Erstellung der zugehörigen Graphen erfolgte durch die Software GraphPad PRISM® (Version 8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

III. Ergebnisse

3.1 Einfluss von hMSC und NHDF und deren extrazellulärer Vesikel auf den Ischämie-Reperfusionsschaden

Die zellmodulierenden Effekte von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und dermalen Fibroblasten („normal human dermal fibroblasts“ NHDF) sowie deren Extrazellulärvesikel (hMSC-EZV, NHDF-EZV) auf den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden („ischemia reperfusion injury“ IRI) wurden in einem Mausmodell untersucht. Dazu wurden die Zellen oder deren EZV mit PBS als Trägerlösung vor Beginn der 45-minütigen Ischämie in die Vena cava inferior injiziert. Der hepatozelluläre Schaden wurde durch die Messung der Transaminasen AST und ALT sowie einer histopathologischen Auswertung der Nekrose 24, 48 und 72 h nach Reperfusion beurteilt.

3.1.1 Vergleich der Lebertransaminasen (AST und ALT)

In einem ersten Schritt wurde die Auswirkung des IRI auf das Leberzellparenchym durch die Bestimmung der beiden Transaminasen AST und ALT im Serum bestimmt. AST, ein essenzielles Enzym in der Verwertung von Kohlenhydraten im Körper, kommt mitochondriengebunden in der Leber, der Skelettmuskulatur und im Herzen vor. Ein Anstieg weist also unspezifisch auf eine Leberzellschädigung hin. ALT dient als wichtiger Katalysator der Gluconeogenese und des Harnstoffzyklus und ist im Vergleich zu AST leberspezifisch [63]. Durch kombinierte Betrachtung dieser beiden Parameter lässt sich eine hepatozelluläre Schädigung verlässlich anhand laborchemischer Messungen im Serum quantifizieren.

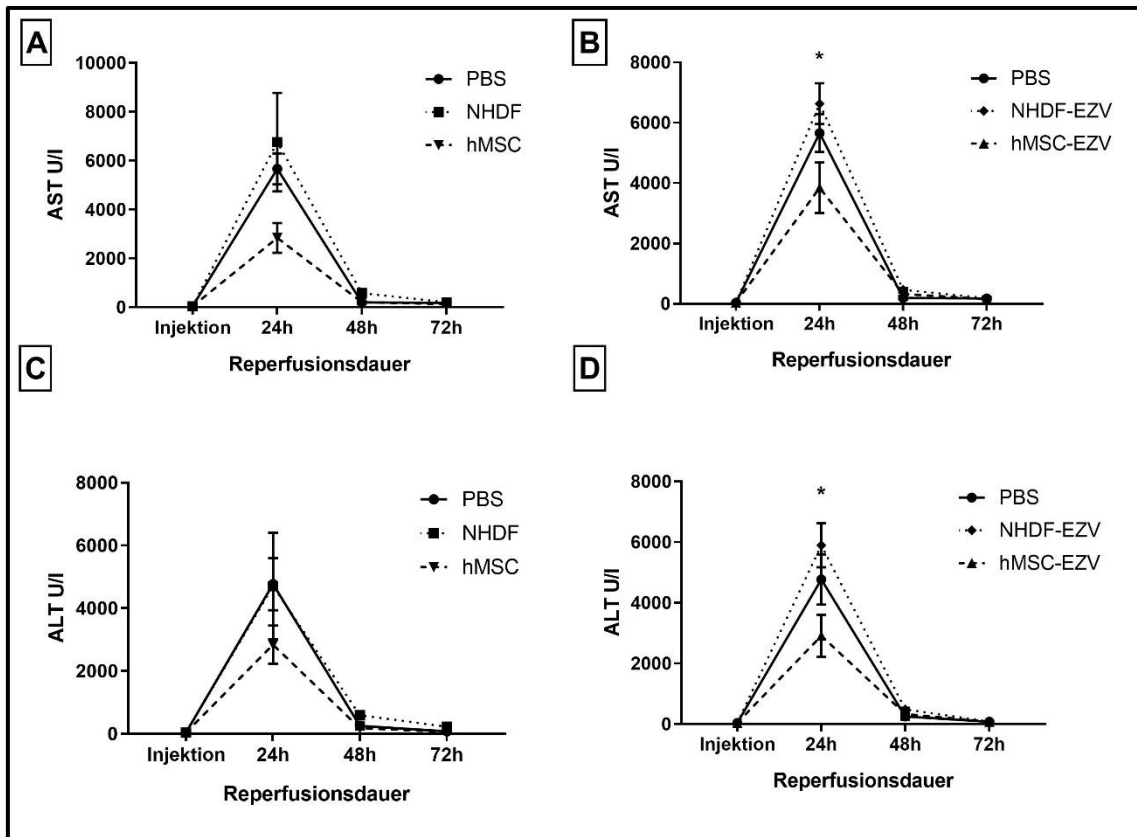


Abbildung 8: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Transaminasen der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere. A: AST bei NHDF/hMSC-Injektion; B: ALT nach NHDF/hMSC-EZV-Injektion; C: ALT nach NHDF/hMSC-Injektion; D: AST nach NHDF/hMSC-EZV-Injektion. X-Achse: Reperfusiondauer in Stunden; Y-Achse: AST/ALT-Spiegel in U/l (Mittelwert \pm SEM); * = $p < 0,05$.

Nach Induktion eines IRI kam es primär in allen Behandlungsgruppen zu einem Anstieg von AST und ALT. Maximale Transaminasenspiegel zeigten sich nach einer Reperfusionzeit von 24 h, danach kam es zu einem raschen Abfall nach 48 h und einem weiteren Rückgang nach 72 h. Die durchschnittliche Transaminasenaktivität im Serum war für Tiere, die mit hMSC behandelt wurden, über alle Untersuchungszeitpunkte niedriger als für Tiere die NHDF oder PBS erhalten hatten. Tiere, die vor Induktion des IRI mit hMSC-EZV behandelt wurden, zeigten ebenfalls deutlich niedrigere AST und ALT-Werte als die Kontrollgruppen NHDF-EZV und PBS an allen Untersuchungszeitpunkten. Dabei zeigten sich die AST-Werte der Tiere die hMSC oder hMSC-EZV erhalten hatten 24h nach Reperfusion signifikant niedriger im Vergleich zu den Tieren die NHDF, NHDF-EZV oder nur Trägerlösung erhalten hatten (hMSC vs. NHDF: $p = 0,016$; hMSC vs. PBS: $p = 0,016$; hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,032$; hMSC-EZV vs. PBS: $p = 0,151$) (Abbildung 8, A-D).

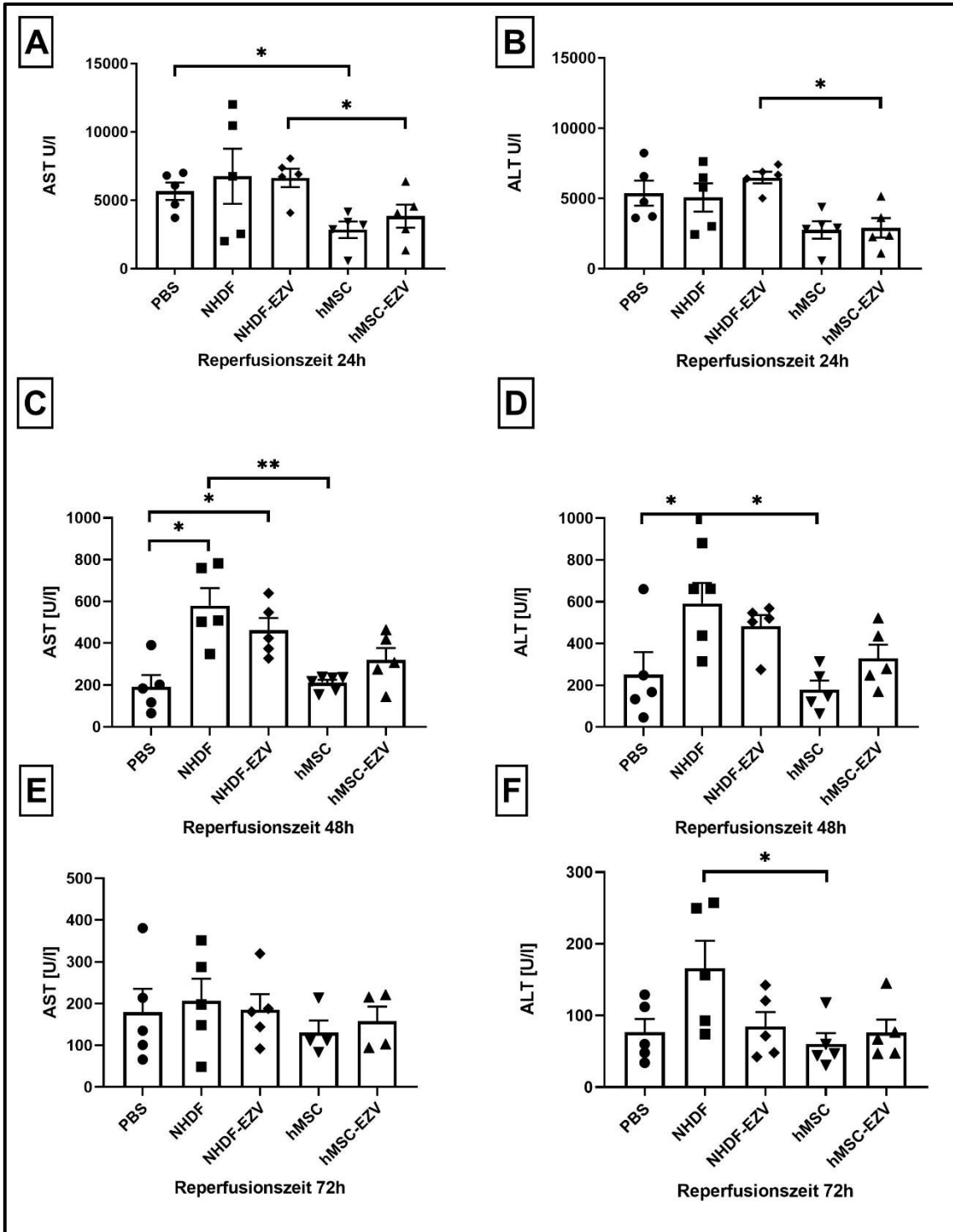


Abbildung 9: Darstellung der Transaminasenspiegel der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionzeiten. A: AST nach 24 h; B: ALT nach 24 h; C: AST nach 48 h; D: ALT nach 48 h; E: AST nach 72 h; F: ALT nach 72 h. X-Achse: Injektionsgruppen; Y-Achse: AST/ALT-Spiegel in U/I (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

24 Stunden nach Reperfusion zeigten Tiere nach präemptiver Gabe von hMSC (AST: 2839 ± 606 U/l; ALT: 2765 ± 615 U/l) niedrigere Werte als Tiere die mit NHDF (AST: 6753 ± 2017 U/l; ALT: 5076 ± 1004 U/l) oder PBS (AST: 5659 ± 632 U/l; ALT: 5381 ± 888 U/l) injiziert wurden. Dabei waren die AST-Werte nach einer Behandlung mit hMSC signifikant ($p = 0,016$) niedriger im Vergleich zu Tieren, die nur die Trägerlösung PBS erhalten hatten. Die Transaminasenspiegel für die hMSC-EZV- und NHDF-EZV-Gruppen waren ähnlich verteilt. So zeigten Tiere mit hMSC-EZV-Injektion (AST: 3845 ± 841 U/l; ALT: 2910 ± 692 U/l) eine signifikant geringere Serumtransaminasenaktivität (AST: $p=0,031$; ALT: $p=0,016$) im Vergleich zu Tieren die präemptiv mit NHDF-EZV (AST: 6631 ± 677 U/l; ALT: 6486 ± 402 U/l) behandelt wurden (Abbildung 9, A+B).

Betrachtet man die Transaminasenspiegel 48 h nach Reperfusion, zeigten sich auch hier signifikant niedrigere Werte nach einer Behandlung mit hMSC (AST: 215 ± 15 U/l; ALT: 179 ± 46 U/l) im Vergleich zu einer Behandlung mit NHDF (AST: 581 ± 83 U/l; ALT: 591 ± 98 U/l) (AST: $p = 0,004$, ALT: $p = 0,016$). Analog waren auch die Transaminasenspiegel nach Injektion mit hMSC-EZV (AST: 320 ± 56 U/l; ALT: 330 ± 64 U/l) niedriger als mit NHDF-EZV (AST: 463 ± 57 U/l; ALT: 483 ± 53 U/l), blieben in der statistischen Berechnung aber ohne Signifikanz (AST: $p = 0,151$; ALT: $p = 0,158$). Auffällig waren hier die niedrigen Serumspiegel für beide Transaminasen in der PBS-Kontrollgruppe mit einer AST von 192 ± 55 U/l und einer ALT von 251 ± 107 U/l mit signifikanten Unterschieden zu der NHDF- (AST: $p = 0,016$; ALT: $0,03$) und NHDF-EZV-Gruppe (AST: $p = 0,031$) (Abbildung 9, C+D).

Nach 72 h Reperfusionszeit glichen sich die Transaminasenaktivitäten in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen einander an. Die Transaminasenspiegel nach hMSC-Injektion (AST: 131 ± 27 U/l; ALT: 60 ± 15 U/l) waren im Vergleich mit Injektion von NHDF (AST: 207 ± 53 U/l; ALT: 166 ± 38 U/l) niedriger, die Differenz war aber geringer ausgeprägt als nach 24 h oder 48 h. Auffällig ist der signifikant höhere ALT-Spiegel nach NHDF-Gabe im Vergleich zu einer hMSC-Injektion ($p = 0,031$). Eine ähnliche Verteilung lässt sich für die Extrazellulärvesikelgruppen beobachten. Die Transaminasenwerte im Serum lagen auch hier nach hMSC-EZV-Injektion (AST: 158 ± 35 U/l; ALT: 76 ± 18 U/l) unter denen mit Injektion von NHDF-EZV (AST: 185 ± 38 U/l; ALT: 85 ± 20 U/l), blieben in der statistischen Berechnung aber ohne signifikante Unterschiede (AST: $p > 0,999$; ALT: $p >$

0,999). Die Transaminasenspiegel der Tiere nach Injektion mit PBS (AST: 179 ± 56 U/l; ALT: 77 ± 19 U/l) reihen sich in die Verteilung der anderen Behandlungsgruppen ein, auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zu einer Behandlung mit hMSC (AST: $p = 0,905$; ALT: $p = 0,548$) oder hMSC-EZV (AST: $p = 0,905$; ALT: $p > 0,999$) (Abbildung 9, E+F).

Vergleicht man die Effekte einer präemptiven Injektion mit hMSC oder hMSC-EZV vor IRI-Induktion, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Behandlungsgruppen an allen Beobachtungszeitpunkten (24 h: AST $p = 0,421$; ALT $p > 0,999$; 48 h: AST $p = 0,126$; ALT $p = 0,095$; 72 h: AST $p = 0,686$; ALT $p = 0,310$).

3.1.2 Vergleich der direkten Leberzellschädigung anhand des Nekroseareals

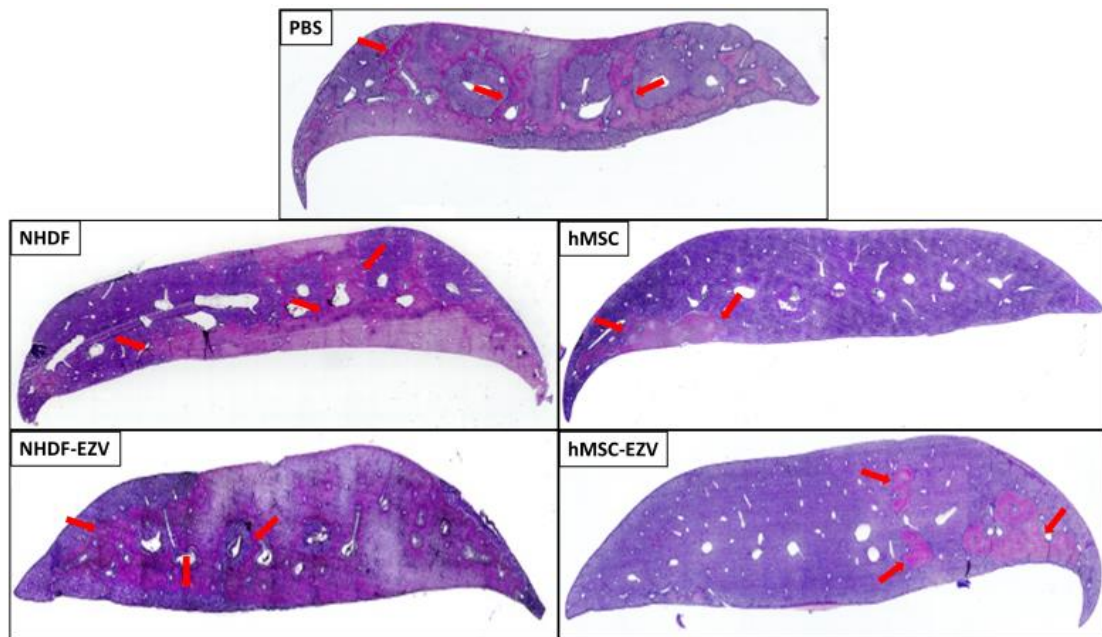


Abbildung 10: Repräsentative Längsschnitte (HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung) durch einen Leberlappen der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion. Die demarkierten Gewebsnekrosen stellen sich als pink- bis rotfarbige Areale im Kontrast zu gesundem lila-blauem Zellparenchym dar (Übergang beispielhaft mit Pfeilen markiert).

Um den Effekt einer präemptiven hMSC- oder hMSC-EZV-Injektion auf das IRI-Ausmaß zu beurteilen diente die Nekrosefläche als weiterer Parameter der hepatozellulären

Schädigung. Diese zeigte sich als scharf demarkiertes pink- bis rotfarbiges Areal im intakten lila-blauem Zellparenchym (Abbildung 10). Die leberspezifische Gewebsarchitektur mit Unterteilung in Periportalfeldern, Zentralvenen und Sinusoiden wurde zerstört, die nekrotischen Areale zeigten lediglich einen Konfluens aus toten Zellarealen (Abbildung 11).

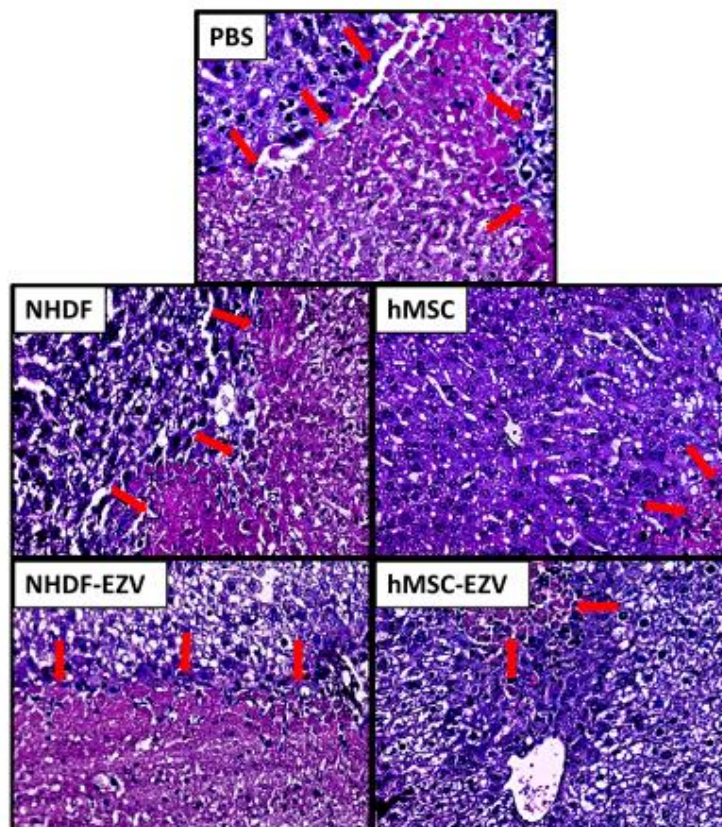


Abbildung 11: Repräsentative Lichtbildmikroskopieaufnahmen (40-facher Vergrößerung) von HE gefärbten Leberschnitten der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion. Der Übergang von gesundem zu nekrotischem Lebergewebe ist mit Pfeilen markiert.

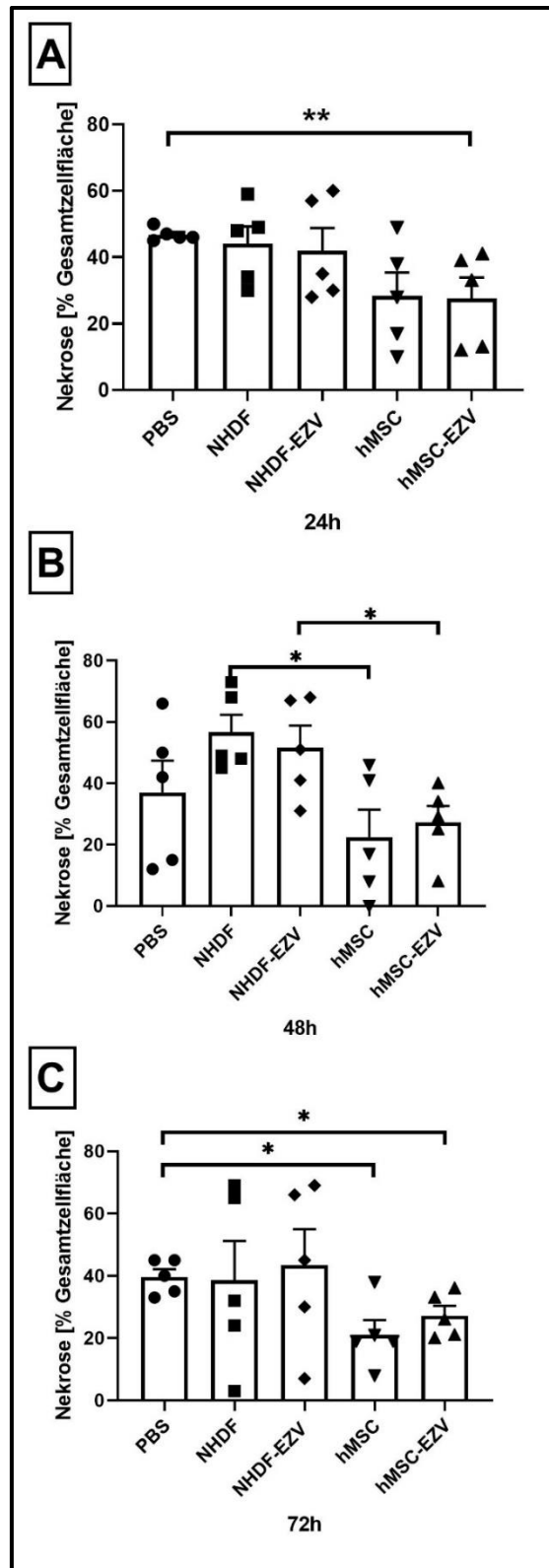


Abbildung 12: Darstellung der Nekrosewerte in Prozent zur Gesamtzellfläche der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionzeiten. A: Nekrose nach 24 h; B: Nekrose nach 48 h; C: Nekrose nach 72 h. X-Achse: Injektionsgruppen; Y-Achse: Nekrosewerte in % (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Die Injektion von hMSC und hMSC-EZ vor Ischämieinduktion sorgte für eine deutliche Reduktion der Gewebsnekrose. Die Tiere der Kontrollgruppen NHDF, NHDF-EZV und PBS zeigten diesen protektiven Effekt auf das Nekroseausmaß nicht.

Nach einer Reperusionszeit von 24 h zeigten die Tiere mit hMSC-Injektion mit einer mittleren Nekrosefläche von 28 ± 7 % niedrigere Werte als deren Kontrollgruppe NHDF mit 44 ± 5 %, der Unterschied zwischen den Injektionsgruppen war jedoch nicht signifikant ($p = 0,167$). Ähnliche Werte zeigten die Tiere mit Injektion von hMSC-EZV (28 ± 6 %) und NHDF-EZV (42 ± 7 %), auch dieser Vergleich blieb ohne statistische Signifikanz ($p = 0,421$). Den einzig signifikanten Unterschied in der Nekroseausprägung am Untersuchungszeitpunkt 24 h zeigte sich nach Injektion von hMSC verglichen mit PBS ($47 \pm 0,9$ %) mit einem p-Wert von $p = 0,0008$ (Abbildung 12, A).

Die signifikante Reduktion der durchschnittlichen Leberparenchymnekrose durch eine präemptive hMSC-Gabe (22 ± 9 %) gegenüber Tieren die präemptiv NHDF erhalten hatten (57 ± 6 %) wurde 48 h nach Reperfusion noch deutlicher ($p = 0,013$). Analog war dieser protektive Effekt auch nach einer hMSC-EZV-Injektion festzustellen, der Unterschied in der Nekroseausprägung zwischen den Behandlungsgruppen hMSC-EZV (27 ± 4 %) und NHDF-EZV (52 ± 7 %) war ebenfalls signifikant ($p = 0,032$). Auffällig war hier die inhomogene Verteilung der mittleren Nekrosefläche innerhalb der PBS-Gruppe mit großer Streuung der Werte (37 ± 10 %) (Abbildung 12, B).

Auch nach 72 h Reperusionszeit zeigten die Tiere mit hMSC-Injektion (21 ± 5 %) kleinere Nekroseflächen als Tiere mit NHDF-Injektion (39 ± 13 %). Dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der großen Varianz der Werte innerhalb der NHDF-Gruppe nicht signifikant ($p = 0,286$). Betrachtet man die beiden Vesikelgruppen, war die Gewebsnekrose in der hMSC-EZV-Gruppe mit 27 ± 3 % ebenfalls geringer ausgeprägt als in der NHDF-EZV-Gruppe mit 43 ± 12 %, der statistische Vergleich zeigte aber auch hier analog zu den Zellgruppen mit hMSC- und NHDF-Injektion keinen signifikanten Unterschied aufgrund der großen Streuung der Werte für NHDF-EZV ($p = 0,310$). Statistisch signifikant war am Analysezeitpunkt nach 72 h nur der Vergleich von hMSC und hMSC-EZV mit der PBS-

Kontrollgruppe (40 ± 2 %) mit einem p-Wert von $p = 0,032$ für hMSC vs. PBS und einem $p = 0,040$ für hMSC-EZV vs. PBS (Abbildung 12, C).

Auch hier gab es analog zur Auswertung der Lebertransaminasen keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Behandlung mit hMSC und hMSC-EZV an allen Behandlungszeitpunkten (hMSC vs. hMSC-EZV: 24 h $p > 0,999$; 48 h: $p = 0,889$; 72 h: $p = 0,246$).

3.1.3 Fazit aus den Parametern des Ischämie-Reperfusionsschadens

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine präemptive Injektion von hMSC oder hMSC-EZV zu einer Reduktion des IRI führt, da sowohl die Transaminasenwerte als auch die Lebergewebsnekrosen im Vergleich zu den Kontrollgruppen niedriger ausfallen. Des Weiteren zeigte sich ebendieser positive Einfluss auf den IRI unabhängig von einer Injektion mit intakten Stammzellen (hMSC) oder deren Extrazellulärvesikel (hMSC-EZV). NHDF und NHDF-EZV schienen keinen Einfluss auf den IRI zu nehmen. Die Transaminasen und der Leberparenchymschaden bleiben ohne signifikanten Unterschied zu Tieren, die lediglich die Trägerlösung PBS erhalten haben.

3.2 Einfluss von hMSC und NHDF und deren extrazellulärer Vesikel auf die Leberzellregeneration

In einem weiteren Schritt wurde die Regeneration der zuvor geschädigten Leber in Abhängigkeit der präemptiven Injektion von hMSC, hMSC-EZV, NHDF, NHDF-EZV und PBS untersucht. Als repräsentative Parameter wurden die Hepatozytenproliferation und die Ausbildung fetthaltiger intrazellulärer Microdroplets ausgewählt und nach einer Reperfusionszeit von 24 h, 48 h und 72 h analysiert.

3.2.1 Ausbildung lipidhaltiger Microdroplets als Ausdruck hepatozellulärer Regeneration

Ein Aspekt des hepatozellulären Regenerationsprozesses ist die Ausbildung lipidhaltiger intrazellulärer Vesikel, sogenannter Microdroplets. Diese liefern den Zellen Fette zur Energiegewinnung für die Vorgänge der Leberzellregeneration.

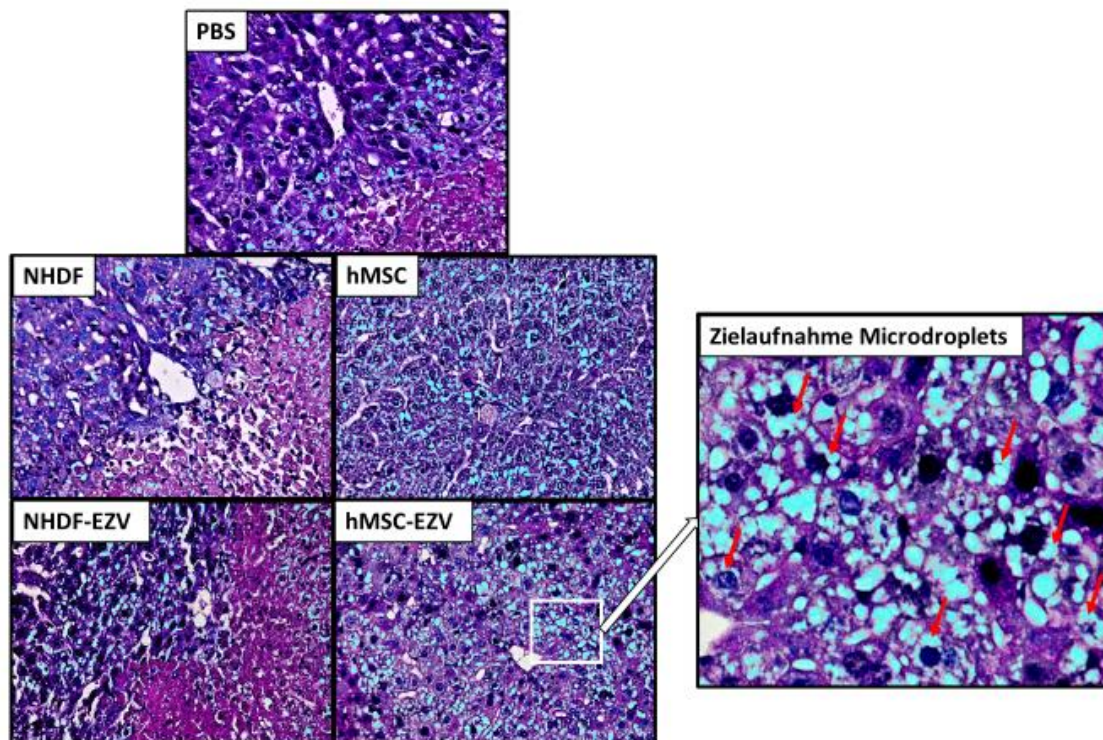


Abbildung 13: Repräsentative Lichtbildmikroskopieaufnahmen von Microdroplets (40-fache Vergrößerung) von HE gefärbten Leberschnitten der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion. Der Übergang von gesundem zu nekrotischen Lebergewebe ist mit Pfeilen markiert. Microdroplets hellblau eingefärbt; Zielaufnahme der Microdroplets am Beispiel von hMSC-EZV, Microdroplets beispielhaft mit Pfeilen markiert.

Durch Elimination lipidhaltiger Substanzen während der histologischen Färbung erscheinen die mit Fett gefüllten Microdroplets als leere Vakuolen mit konzentrischer Anordnung um den Zellkern im Zytoplasma der Hepatozyten [26,27]. In ihrer maximalen Ausprägung nehmen diese fast das gesamte intrazelluläre Volumen der Leberzellen ein (Abbildung 13).

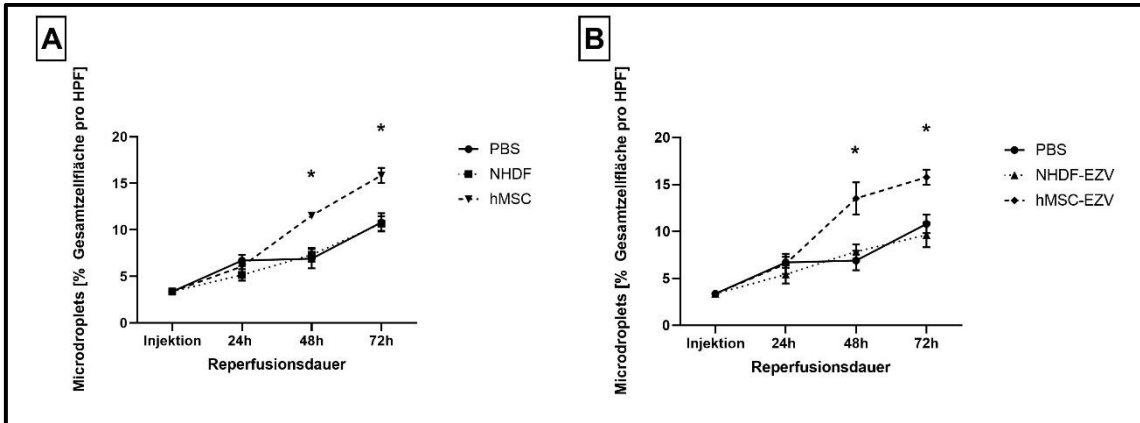


Abbildung 14: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Microdropletfläche der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere. A: Microdroplets nach NHDF/hMSC-Injektion; B: Microdroplets nach NHDF/hMSC-EZV-Injektion. X-Achse: Reperfusiondauer in Stunden; Y-Achse: prozentualer Anteil der Microdroplets im Bezug zur Gesamtzellfläche in % (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$.

Als Zeichen der einsetzenden Leberregeneration stieg die Anzahl von hepatozellulären Microdroplets mit der Zeit in allen Behandlungsgruppen an. Dabei waren die durchschnittlichen Werte nach 24 h noch sehr homogen verteilt. Nach 48 h und 72 h zeigten Tiere mit hMSC-Injektion signifikant höhere Microdropletfläche als Tiere mit Injektion von NHDF und PBS. Tiere mit hMSC-EZV-Behandlung zeigten ähnlich hohe Microdropletflächen wie hMSC, auch hier mit signifikant höheren Werten nach 48 h und 72 h verglichen mit den Kontrollgruppen NHDF-EZV und PBS (Abbildung 14, A+B).

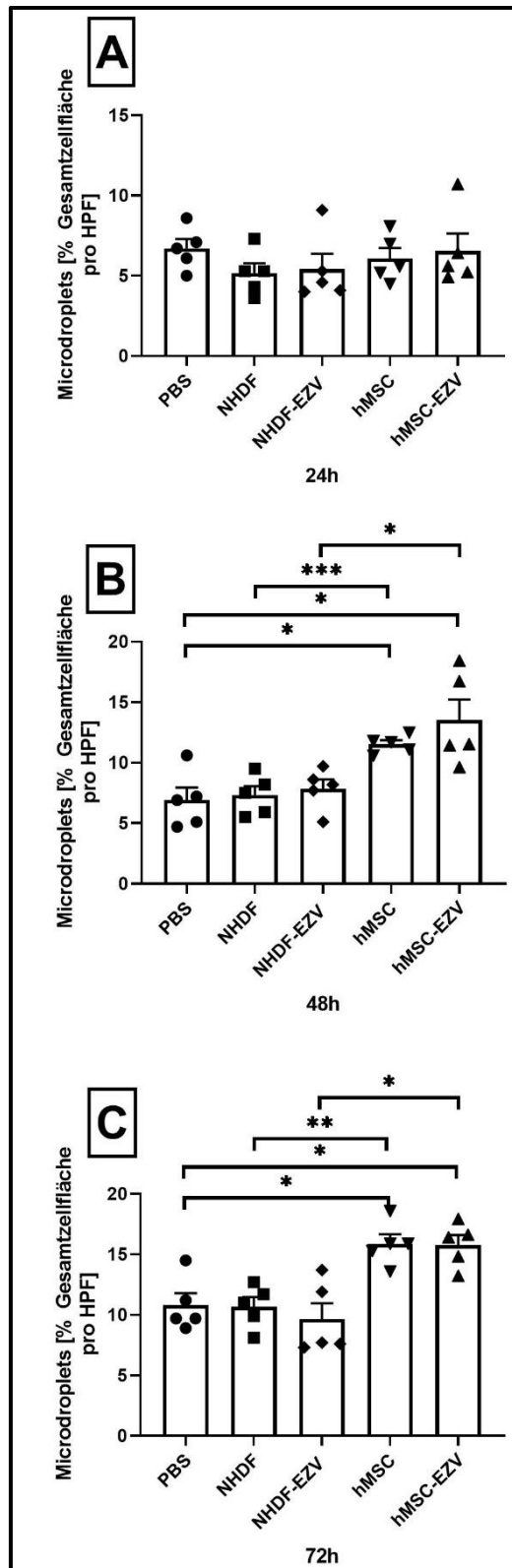


Abbildung 15: Darstellung der Microdropletfläche in Prozent zur Gesamtzellfläche pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionzeiten. A: Microdroplets nach 24 h; B: Microdroplets nach 48 h; C: Microdroplets nach 72 h. X-Achse: Injektionsgruppen; Y-Achse: Microdroplets in % (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$.

Nach einer Reperfusionzeit von 24 h war die Ausbildung der Microdroplets über alle Behandlungsgruppen sehr homogen verteilt. Die Microdropletflächen der Tiere mit hMSC-Injektion ($6,1 \pm 0,6$ %) unterschieden sich nicht signifikant von den Tieren mit NHDF- ($5,2 \pm 0,6$ %) und PBS-Injektion ($6,7 \pm 0,6$ %) (hMSC vs. NHDF: $p = 0,397$; hMSC vs. PBS: $p = 0,548$). Eine ähnliche Verteilung zeigte sich für die EZV-Gruppen, auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Behandlung mit hMSC-EZV ($6,6 \pm 1,1$ %) und NHDF-EZV ($5,4 \pm 0,9$ %) beziehungsweise PBS (hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,222$; hMSC-EZV vs. PBS: $p = 0,548$) (Abbildung 15, A).

Nach 48 h Reperfusionzeit zeigten sich nun deutliche Unterschiede in der Ausbildung intrazellulärer Microdroplets zwischen den unterschiedlich behandelten Tieren. Die Microdropletflächen nach Injektion von hMSC waren mit durchschnittlich $11,5 \pm 0,3$ % signifikant höher als nach Injektion mit NHDF ($7,32 \pm 0,7$ %; $p = 0,0008$) oder PBS ($6,9 \pm 1,0$ %; $p = 0,016$). Analog kam es auch nach hMSC-EZV-Behandlung ($13,5 \pm 1,8$ %) zu einer vermehrten Microdropletbildung verglichen mit der Behandlung durch NHDF-EZV ($7,9 \pm 0,8$ %) und PBS, auch diese Differenzen zeigten sich in der statistischen Berechnung signifikant (hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,016$; hMSC-EZV vs. PBS: $p = 0,016$) (Abbildung 15, B).

Ein weiterer Anstieg und ein ähnliches Verteilungsmuster der Microdropletflächen innerhalb der Behandlungsgruppen ließen sich auch nach 72 h beobachten. Analog zu den Untersuchungen nach 48 h lagen die Microdropletflächen der Tiere nach Injektion mit hMSC und hMSC-EZV deutlich über denen der Kontrollgruppen. Die durchschnittlichen Werte in der hMSC-Gruppe ($15,9 \pm 0,8$ %) waren verglichen mit der NHDF- ($10,1 \pm 0,8$ %) und PBS-Gruppe ($8,0 \pm 1,0$ %) deutlich höher mit Signifikanz in der statistischen Berechnung (hMSC vs. NHDF: $p = 0,008$; hMSC vs. PBS: $p = 0,016$). Eine Behandlung mit hMSC-EZV war mit einer durchschnittlichen Microdropletfläche von $15,8 \pm 0,8$ % einer Behandlung mit NHDF-EZV mit $9,6 \pm 1,3$ % ebenfalls überlegen, auch dieser Unterschied zeigte sich mit einem p-Wert von $p = 0,016$ signifikant. Auch der Vergleich zwischen der hMSC-EZV-Gruppe mit der PBS-Gruppe war mit $p = 0,016$ signifikant (Abbildung 15, C).

Vergleicht man die Effekte einer präemptiven Injektion von hMSC und hMSC-EZV vor Ischämieinduktion miteinander, so zeigten sich ähnliche Microdropletflächen in der histologischen Auswertung, signifikante Unterschiede zwischen diesen Behandlungsgruppen waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt feststellbar (24 h: $p = 0,984$; 48 h $p = 0,841$; 72 h: $p = 0,937$).

3.2.2 Leberzellproliferation anhand der Zahl Ki67 – positiver Zellen

Als weiterer Marker der Leberzellregeneration diente die Ki67-Färbung. Ki67 ist ein Oberflächenmarker auf Zellkernen, der sich nur während den Prozessen der Mitose ausbildet, also spezifisch Zellen markiert, die sich gerade im Zellteilungsprozess befinden [64,65]. Nach einer immunhistochemischen Färbung mit einem anti-Ki67-Antikörper werden alle Zellkerne von proliferierenden Zellen braun gefärbt, die Kerne der restlichen ruhenden Zellen zeigen die typische Hämalaun-Blau-Färbung (Abbildung 16).

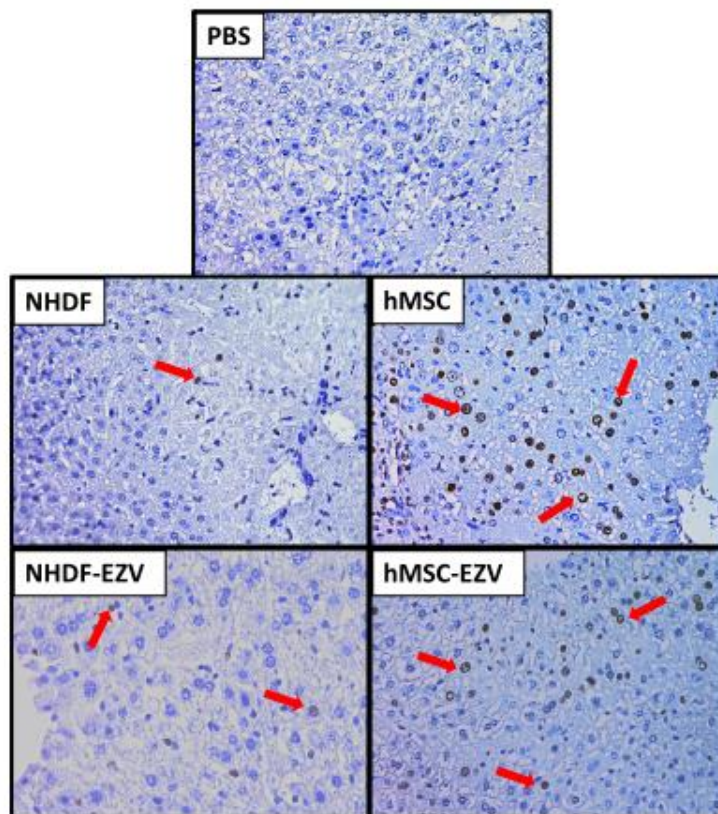


Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der Ki67-Färbung (40-fache Vergrößerung) der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion. Ki67-positive Hepatozyten: braun verfärbte Zellkerne (beispielhaft mit Pfeilen markiert).

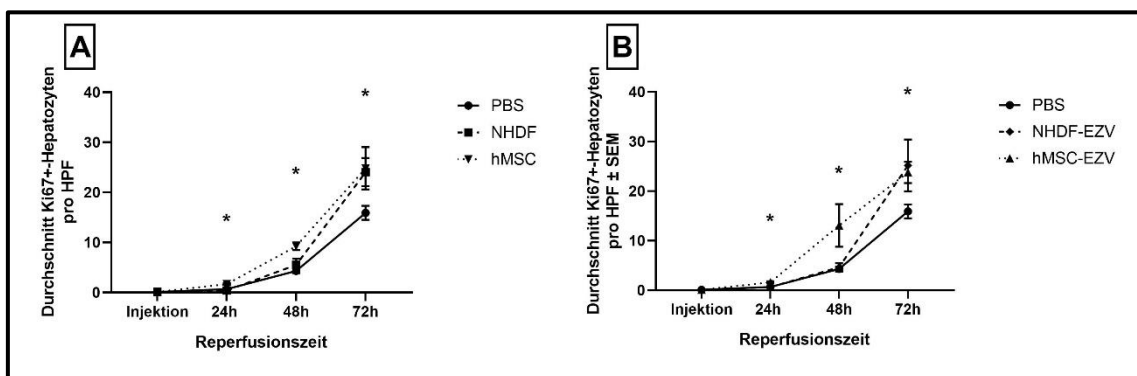


Abbildung 17: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere. A: Ki67-Zahl nach NHDF/hMSC-Injektion; B: Ki67-Zahl nach NHDF/hMSC-EZV-Injektion. X-Achse: Reperfusiondauer in Stunden; Y-Achse: durchschnittliche Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$.

Nach IRI-Induktion nimmt die Zellproliferationsrate der Hepatozyten in allen Behandlungsgruppen über den gesamten Analysezeitraum stetig zu. In der Frühphase (24 h und 48 h nach Ischämie-Reperfusion) zeigten die Tiere mit Injektion von hMSC signifikant höhere Ki67-Zahlen als nach Injektion von NHDF oder PBS. Nach 72 h gleichen sich die Werte der Behandlungsgruppen einander wieder an, nur der Unterschied von hMSC zur PBS-Gruppe blieb signifikant (Abbildung 17, A). Eine Behandlung mit hMSC-EZV erzielte einen ähnlichen Effekt wie mit hMSC, auch hier war die Proliferationsrate anhand der Ki67-Färbung gegenüber der Behandlungsgruppen mit Injektion von NHDF und PBS signifikant höher nach 24 h und 48 h. Nach 72 h glichen sich die Ki67-Zahlen ebenfalls einander an, ein signifikanter Unterschied bestand lediglich noch zwischen einer Injektion mit hMSC-EZV und PBS (Abbildung 17, B).

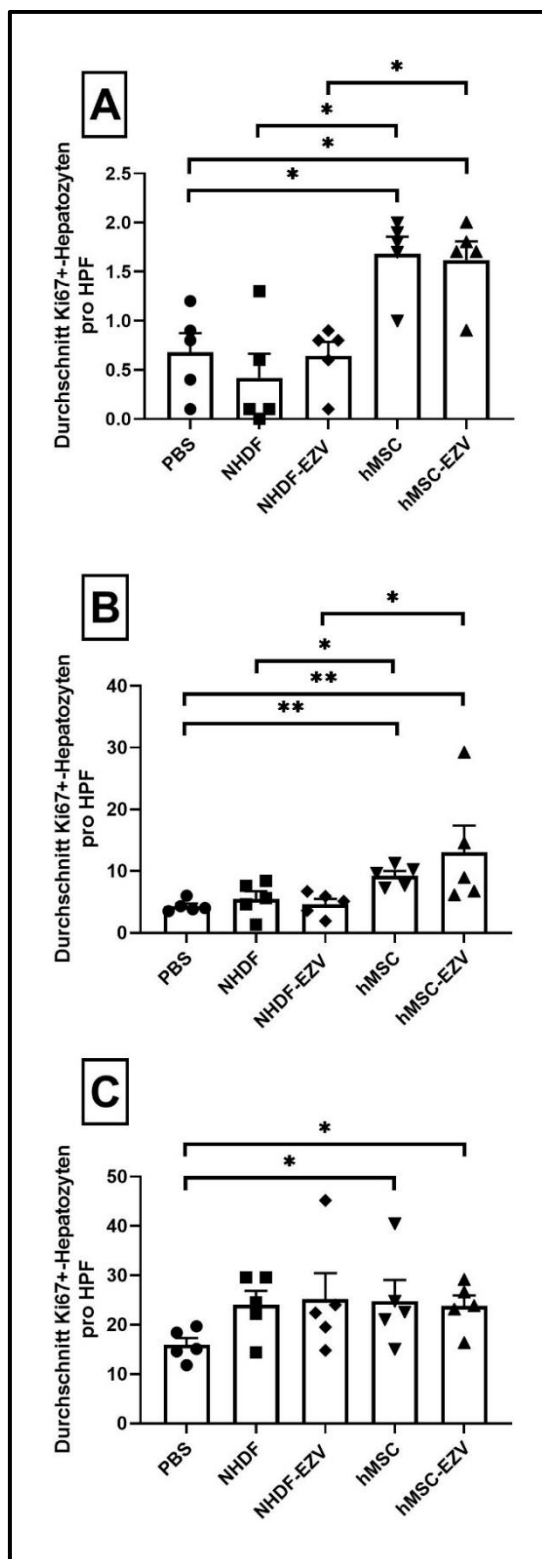


Abbildung 18: Darstellung der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionzeiten. A: Ki67-Zahl nach 24 h; B: Ki67-Zahl nach 48 h; C: Ki67-Zahl nach 72 h. X-Achse: Reperfusiondauer in Stunden; Y-Achse: durchschnittliche Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF (Mittelwert \pm SEM); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Tiere mit Injektion von hMSC ($1,7 \pm 0,2$) zeigten nach einer Reperusionszeit von 24 h signifikant mehr Ki67-positive Hepatozyten als nach Injektion von NHDF ($0,4 \pm 0,2$) oder PBS ($0,7 \pm 0,2$), der p-Wert in der statistischen Berechnung lag sowohl für hMSC vs. NHDF als auch für hMSC vs. PBS bei $p = 0,016$. Auch eine Behandlung mit hMSC-EZV wies mit durchschnittlich $1,6 \pm 0,2$ Ki67-positiven Leberzellen analog zu hMSC auf eine stärkere Zellproliferation als nach Behandlung mit NHDF-EZV ($0,6 \pm 0,1$) oder PBS hin. Auch diese Unterschiede waren signifikant (hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,016$; hMSC-EZV vs. PBS: $p = 0,024$) (Abbildung 18, A).

Nach 48 h zeigte sich in allen Gruppen eine Zunahme der Zellproliferationsraten mit ähnlicher Werteverteilung innerhalb der Injektionsgruppen im Vergleich zum 24 h Zeitpunkt. Tiere nach Behandlung mit hMSC zeigten durchschnittlich $9,3 \pm 0,8$, nach NHDF-Injektion $5,5 \pm 1,3$ und nach PBS-Injektion $4,3 \pm 0,4$ positive Zellen pro HPF. Diese Unterschiede waren in der statistischen Berechnung mit einem p-Wert von $p = 0,033$ für hMSC vs. NHDF und $p = 0,008$ für hMSC vs. PBS signifikant. Betrachtet man die EZV-Gruppen zeigt sich eine ähnliche Werteverteilung. Die Proliferationsrate war nach hMSC-EZV-Injektion ($13,1 \pm 4,3$) höher als nach Injektion mit NHDF-EZV ($4,6 \pm 0,9$) oder PBS, auch diese Differenzen ergaben signifikante p-Werte. (hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,024$; hMSC-EZV vs. PBS: $p = 0,008$) (Abbildung 18, B).

Maximale Proliferationsraten anhand der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten erreichten die Leberzellen in diesem Versuch nach 72 h, allerdings ließ sich kein Unterschied mehr zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen nachweisen. Eine Behandlung mit hMSC zeigte mit $24,8 \pm 4,2$ ähnlich hohe Zahlen Ki67-positiver Zellen als mit NHDF ($24,1 \pm 2,8$). Tiere mit hMSC-EZV-Injektion zeigten analog mit durchschnittlich $23,8 \pm 2,2$ positiven Hepatozyten ebenfalls keinen Unterschied zur NHDF-EZV-Gruppe ($25,18 \pm 5,2$). Beide Vergleiche zeigten keine signifikanten Unterschiede (hMSC vs. NHDF: $p = 0,952$; hMSC-EZV vs. NHDF-EZV: $p = 0,691$). Am Analysezeitpunkt nach 72 h war allein der Vergleich von hMSC und hMSC-EZV mit der PBS-Gruppe ($15,9 \pm 1,4$) mit einem p-Wert von $p = 0,040$ für hMSC vs. PBS und $p = 0,032$ für hMSC-EZV vs. PBS signifikant (Abbildung 18, C).

Vergleicht man die therapeutischen Effekte und Auswirkungen auf die Zellproliferation von hMSC-Injektion mit denen der hMSC-EZV-Injektion an allen Untersuchungszeitpunkten zeigten sich keine ausgeprägten Unterschiede anhand der Zahl Ki67-positiver Hepatozyten. Auch in der statistischen Berechnung blieben diese Vergleiche ohne Signifikanz (24 h: $p = 0,675$; 48 h: $p > 0,999$; 72 h: $p = 0,691$).

3.2.3 Fazit aus den Parametern der Leberzellregeneration

In der Zusammenschau aller erhobenen Regenerationsparameter zeichnet sich eine Induktion sowie Steigerung der Hepatozytenproliferation nach IRI durch die präemptive Gabe von hMSC oder hMSC-EZV ab. Dabei besteht kein Unterschied zwischen Tieren die hMSC oder deren EZV erhalten haben. Trotz fehlender Unterschiede in der Leberzellschädigung nach IRI, kommt es durch die Gabe von NHDF und NHDF-EZV gegenüber der Trägerlösung PBS zu einer späten Proliferationssteigerung der Hepatozyten.

IV. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduktion des hepatischen IRI sowie eine Beschleunigung der Leberzellregeneration in der Maus durch eine präemptive Injektion von hMSC und hMSC-EZV. Die Tiere mit einer Behandlung durch hMSC und hMSC-EZV zeigten neben verminderten Serumtransaminasenspiegeln auch geringer ausgeprägte Nekroseflächen. Zudem wurde der Regenerationsprozess verstärkt, es konnte eine vermehrte Bildung von intrazellulären Fetttröpfchen im Rahmen der Leberzellregeneration und eine erhöhte Proliferationsrate der Hepatozyten nach einer Behandlung mit hMSC oder hMSC-EZV nachgewiesen werden. NHDF und NHDF-EZV zeigten keine organprotektiven Eigenschaften in Bezug auf den hepatozytären Schaden und eine spätere Steigerung der Leberzellregeneration.

4.1 Auswahl des operativen Ischämie-Verfahrens

Die Erzeugung des IRIs erfolgte in dieser Arbeit durch eine 70% Ischämie des Lebergewebes für eine Dauer von 45 Minuten. Durch Abklemmen der arteriellen und portalvenösen Blutzufuhr des medianen und linken Leberlappens und ungehindertem Blutfluss durch den rechten Leberlappen konnte ein IRI erzeugt und ein portalvenöser Rückstau verhindert werden.

Der hepatische IRI wurde in diversen Mausmodellen bereits untersucht, die meisten durchgeführten Versuchsmodelle konzentrierten sich wie auch das hier durchgeführte Modell auf den warmen IRI. Am häufigsten angewendet wird eine partielle Ischämie (70%) des Lebergewebes um zusätzliche Schäden durch portalvenösen Rückstau zu vermeiden [52,53, 58, 62, 66 ,67]. Van Golen et al. konnten einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen der Ischämiedauer und dem hepatozellulärem Schaden zeigen, die maximale Ausprägung des IRI zeigte sich nach 37,5 Minuten. Eine weitere Verlängerung der Ischämiezeit zeigte keine signifikanten Veränderungen mehr [66]. Die Vorteile der iso-

lierten Betrachtung der warmen Ischämie sind vielseitig. Geringere technische Anforderungen an den operativen Eingriff resultieren in einer besseren Reproduzierbarkeit. Ein Versuchsmodell mit kalter Ischämie ist technisch durch eine Explantation und Implantation des Organs anspruchsvoller, Störfaktoren wie Lagerung des explantierten Organs, Notwendigkeit von Gefäßanastomosen oder auch höherer Blutverlust beeinträchtigen das Versuchsergebnis [68]. Die Phase der kalten Ischämie beeinflusst durch weitere Immun- und Entzündungsreaktionen im Lebergewebe die IRI-Ausprägung maßgeblich, die Inzidenz der Transplantatdysfunktion und Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation nimmt mit der Dauer der kalten Ischämie zu [68]. Die isolierte Betrachtung von Therapieoptionen zur IRI-Abmilderung in einem Modell mit nur warmer Ischämie, wie in dieser Arbeit durchgeführt, kann also lediglich Anstöße für weitere Erforschung therapeutischer Möglichkeiten aufzeigen. Vor der experimentellen Anwendung im Menschen müsste die Präkonditionierung mit hMSC-EZVs zuerst in einem murinen Transplantationsmodell Anwendung finden. Im Rahmen solcher Studien könnte dann auch ECD-Szenarien mit zum Beispiel steatotischen Organen oder sehr langer kalter Ischämiezeit generiert werden.

4.2 Reduktion des hepatischen IRI durch hMSC und hMSC-EZV

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduktion der hepatozellulär freigesetzten Lebertransaminasen als Ausdruck des hepatischen IRI nach Injektion mit hMSC oder hMSC-EZV einhergehend mit geringer ausgeprägten Nekroseflächen innerhalb der ersten 72 Stunden nach Ischämie. Eine Injektion mit NHDF oder NHDF-EZV zeigte keinen messbaren Effekt auf das Ausmaß des IRI.

Der hepatische IRI, also die Aggravierung des hypoxischen Leberschadens durch Wiederherstellung des Blutflusses und der Sauerstoffversorgung, lässt sich in 3 Phasen aufteilen: die akute Phase direkt nach Reperfusion, eine intermediäre Phase bis zu 6 Stunden nach Reperfusion und eine späte Phase bis zu 48 Stunden nach Ischämie. Die Initialphase ist gekennzeichnet durch ein pH-Paradoxon, die Wiederherstellung des physiologischen

pH-Wertes nach der Gewebsazidose während der Ischämie führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit konsekutivem Zelltod [11–14]. In der intermediären Phase sind oxidativer Stress durch ROS und eine ausgeprägte Zytokinfreisetzung („Zytokinsturm“) die treibenden Kräfte. Es kommt zur Apoptose durch DNA-Brüche, Membrandysfunktion und Zelllyse. Diese massive Zytokinfreisetzung führt auch zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten, die für die weitere Aggravierung der Zellschäden in der späten Phase des IRI verantwortlich sind [12,15,16]. Als Reaktion auf diese schädigenden Prozesse im Rahmen des IRI konnte die Sekretion von EZVs aus Hepatozyten oder anderen Zellbestandteilen des Leberparenchyms wie zum Beispiel Endothelzellen nachgewiesen werden [69]. Durch parakrin vermittelte Zellkommunikation über zum Beispiel den Sphingosin-Phosphat-Weg kommt es zu einer gesteigerten Zellproliferation und dadurch letztlich zur Rekonvaleszenz nach IRI [69]. Andere Versuchsmodelle konnten eben diesen Sphingosin-Phosphat-Weg als wichtigen Übertragungsweg interzellulärer Signale von mesenchymalen Stammzellen identifizieren [70], was die mildernden Effekte auf den IRI der hMSC und hMSC-EZVs dieser Arbeit erklären könnte. Auch Haga et al. konnten 2017 in einem Mausmodell nach intravenöser Infusion von murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und deren Extrazellulärvesikel 30 Minuten vor Ischämie eine signifikante Reduktion der Lebertransaminasen AST und ALT und der Leberzellnekrose im Vergleich zu einer Behandlung mit PBS bis zu 24 Stunden nach IRI nachweisen. Es konnte eine geringer ausgeprägte Neutrophileninvasion und verminderter oxidativer Stress in vivo und in vitro anhand antioxidativer Enzyme auf den hMSC und den hMSC-EZV nachgewiesen werden [52]. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch das Mausmodell der Arbeitsgruppe Lee et al. von 2015. Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe und deren Extrazellulärvesikel wurden hier innerhalb der ersten Stunde des IRI intravenös appliziert. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Nekrosefläche und Transaminasenspiegel innerhalb der ersten 24 Stunden nach IRI verglichen mit NaCl oder Stammzellmedium [62]. In einem Versuch von Jia Yao et al. aus dem Jahr 2019 wurde Mäusen 30 Minuten vor Reperfusion Extrazellulärvesikel von humanen mesenchymalen Nabelschnurstammzellen intravenös appliziert. Auch in diesem Tiermodell konnte mit Fokus auf die ersten 6 Stunden nach IRI eine signifikante

Reduktion der Nekroseausprägung und der Serumtransaminasen in vivo durch diese EZV verglichen mit PBS nachgewiesen werden. Hier zeigten sich zudem verminderte proinflammatorische Zytokinspiegel und eine Suppression des oxidativen Stresses durch abgeschwächte ROS-Produktion und Expression von Apoptosefaktoren auf B-Zellen in vitro [53]. Analog zu diesen drei Vorarbeiten führte auch in der hier durchgeführten Arbeit eine Injektion von hMSC-EZV und hMSC zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Lebertransaminasen als auch der Leberzellnekrose in der frühen und intermediären Phase der Reperfusion. Dieser positive Effekt auf den hepatischen IRI lässt sich aber, wie im Ergebnissteil dieser Arbeit bereits dargestellt, auch bis in einem Zeitraum von 72 Stunden nach IRI beobachten. Die oben genannten Mausmodelle mit Injektion von hMSC und hMSC-EZV beleuchten lediglich Zeiträume zwischen 6 und 24 Stunden. Die Entwicklung der Transaminasenspiegel und der Ausprägung der Nekrosefläche unter Therapie mit hMSC und hMSC-EZV bis in die Spätphase des IRI wie in der vorgelegten Arbeit durchgeführt wurde bisher noch nicht durchgeführt. Weitere Versuchsmodelle auch über 72 Stunden hinaus müssen vor der sicheren Anwendung in der klinischen Praxis noch durchgeführt werden, um mögliche negative Langzeitfolgen einer Stammzelltherapie auf den hepatischen IRI ausschließen zu können.

4.3 Steigerung der Leberzellregeneration durch hMSC und hMSC-EZV nach IRI

In der histologischen Auswertung der behandelten Versuchsgruppen führte eine präemptive Injektion von hMSC und hMSC-EZV zu einer Steigerung der Leberzellregeneration. Die Ausprägung der Microdroplets war nach Therapie mit hMSC und hMSC-EZV vor allem in der späten Phase deutlich verstärkt, die Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten war vor allem in der frühen und intermediären Phase deutlich höher als in den Vergleichsgruppen.

Der Leberregenerationsprozess basiert bei fehlenden hepatozytären Progenitorzellen primär auf der Aktivierung ruhender Zellen. Diese Hepatozyten treten im Rahmen der Zellproliferation erneut in den Zellzyklus ein und bilden eine Gewebhyperplasie aus, darunter kommt es auch zu metabolischen Stoffwechselveränderungen [26,27].

Treibende Faktoren sind hier Wachstumshormone aus Endothelzellen, Hepatozyten und Immunzellen sowie niedrige Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF α . Eine Therapie mit hMSC führt zu einer Inhibition der zelllytischen Funktion von T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen und fördert damit die Zellproliferation und die hepatozelluläre Stoffwechselaktivität [71–73]. Die metabolischen Veränderungen im Rahmen des Regenerationsprozesses führen zu einer gesteigerten Lipogenese und Ablagerung von intrazellulären Triglyceriddepots (Microdroplets). So bilden die Hepatozyten einen Energie- und Substratspeicher als Reserve für weitere Energie- und Ressourcen-intensive Proliferationsprozesse [27,28,31,70]. Die zellregenerationsfördernden Eigenschaften von hMSC wurden bereits in diversen Studien beschrieben [74–76]. Zu den Effekten nach IRI an der Leber gibt es bisher allerdings nur wenige aussagekräftige Versuchsmodelle. In einem von Fouraschen et al. durchgeführten Mausmodell mit hepatischen IRI konnte nach intraperitonealer Applikation humaner mesenchymaler Stammzellen aus der Leber eine verstärkte Hepatozytenproliferation mit vermehrter Expression von Bromdesoxyuridin (BrdU) sowie niedrigere Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 bis zu 48h nach Reperfusion beobachtet werden [58]. Ezquer et al. beschreibt ähnliche Ergebnisse nach einer intravenösen Applikation von murinen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen in einem murinen, partiellen Hepatektomie-Modell. Auch hier kam es nach Stammzellinjektion zu erhöhten hepatozytären Proliferationsraten gemessen anhand der zellulären BrdU-Aufnahme und dem „Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen“ (PCNA) sowie dem vermehrten Auftreten binukleärer Hepatozyten in der histologischen Auswertung als Zeichen des aktiven Zellteilungsprozesses bis zu sieben Tage nach IRI [77]. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die hier durchgeführte immunhistochemische Auswertung mit Anfärbung von Ki67 als Proliferationsmarker. Bei den Tieren, die eine Injektion mit hMSC oder hMSC-EZV erhalten haben, konnte eine verstärkte Leberzellregeneration innerhalb der ersten 72h nach Reperfusion nachgewiesen werden. Die Zellproliferationsrate war anhand der Ki67-Auswertung gegenüber den Kontrollgruppen signifikant höher. Das Auftreten von Microdroplets als intrazelluläres Fettdepot im Rahmen regenerationseigener Stoffwechsel-

prozesse wurde bereits beschrieben [31,32,73], ausführliche Untersuchung dieser metabolischen Veränderungen im Rahmen der Regenerationsprozesse nach IRI fehlen bisher noch. Yang et al konnten eine erhöhte hepatozytäre Regenerationsaktivität nach partieller Hepatektomie und Injektion von mesenchymalen Stammzellen in einem Zeitraum von sieben Tagen nach Resektion nachweisen. Es zeigten sich erhöhte Serumspiegel von IL-6, und IL-1 mit erhöhten Zellproliferationsraten anhand der Ki67-Färbung. Zudem konnte eine vermehrte Fettakkumulation in den Hepatozyten durch eine spezifische Lipidanfärbung als Ausdruck metabolischer Regenerationsvorgänge nachgewiesen werden [78]. Ähnliche Vorgänge zeigten sich in der histologischen Auswertung dieser Arbeit. Es kam zu einer verstärkten Ausbildung von Microdroplets als Ausdruck der hochregulierten Stoffwechselprozesse im Rahmen der hepatozytären Zellregeneration. Die intrazellulären Fettdepots wurden hier nicht wie in dem Versuchsmodell von Yang et al mit einer lipid-spezifischen Färbung identifiziert [78], sondern zeigten sich als „leere Flächen“ nach der alkoholischen Waschung im Rahmen des Färbeprozesses.

4.4 Vergleich der Effekte von hMSC und NHDF und deren EZV

In der hier durchgeführten Arbeit wurde immer der Effekt einer präemptiven Injektion von hMSC und NHDF mit der Injektion deren EZVs verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Therapie mit hMSC und hMSC-EZV beziehungsweise NHDF und NHDF-EZV. Gerade die Abmildernden Effekte der hMSC auf den IRI konnte in gleichem Maß durch Injektion von hMSC-EZV erreicht werden.

Lange Zeit wurden die regenerationsfördernden Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen primär ihrer Multipotenz mit Differenzierungsmöglichkeit in viele Zellen der mesenchymalen Zelllinie zugeschrieben [34,36,59]. Nähere Untersuchungen ergaben, dass nach intravenöser Applikation von mesenchymalen Stammzellen die Mehrheit der Zellen in der Lunge verbleiben und nach 24 Stunden nicht in den Zielorganen detektierbar waren [48,79]. Die in dieser frühen Phase nachgewiesenen positiven Effekte der Stammzell-Applikation waren also nicht nur durch zellgebundene Modulationen vor Ort erklärbar und die therapeutischen Effekte von Extrazellulärvesikeln rückten mehr und

mehr in den Vordergrund. Extrazelluläre Vesikel repräsentieren eine heterogene Gruppe und sind charakterisiert als von Zellen sezernierte Körper, die von einer lipidhaltigen Membran umschlossen werden. Die Einteilung erfolgt anhand ihrer Größe in Exosomen (40-120 nm Durchmesser), EZV (50-1000 nm Durchmesser) und Apoptosekörperchen (500-2000 nm Durchmesser) [79]. Die in dieser Studie verwendeten extrazellulären Vesikel wiesen einen Durchmesser von 160 ± 57 nm für die hMSC-EZV und 153 ± 42 nm für die NHDF-EZV auf [80]. In diversen Studien der letzten Jahre zeigte sich, dass die therapeutischen Eigenschaften von hMSC primär nicht auf deren Transformation in Zellen des Zielgewebes basieren, sondern die regenerationsfördernden und zelluntergangshemmenden Effekte parakriner Natur sind [52,53,57,60]. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt über extrazelluläre Vesikel und dem Transfer bioaktiver Substanzen wie Proteine, RNA und Zytokinen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Signalkaskaden in den Zielzellen [78,79,81]. In den bereits oben beschriebenen Mausmodellen von Haga et al und Lee et al gab es keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Auswirkungen auf den IRI zwischen einer Injektion mit mesenchymalen Stammzellen und deren EZVs. Weitere direkte Vergleiche zwischen einer Therapie mit mesenchymalen Stammzellen oder deren EZV und den Effekt auf den hepatischen IRI wurden bisher nicht durchgeführt. Positive Auswirkungen einer Stammzell-Injektion auf den Leberzellschaden und die Leberzellregeneration nach IRI wurden aber wiederholt nachgewiesen [49,52,53,60,62,72]. Ein direkter Vergleich der therapeutischen Potenz zwischen einer Behandlung mit Fibroblasten oder Fibroblasten-EZV wurde bisher nicht durchgeführt- In dem hier durchgeführten Versuchsmodell war der therapeutische Effekt einer Injektion mit NHDF oder NHDF-EZV mit Blick auf den Leberzellschaden und die Regeneration immer miteinander vergleichbar. Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Auswertung dieser Arbeit zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen einer Behandlung mit hMSC und hMSC-EZV, was die Hypothese unterstützt, dass die therapeutischen Effekte auf den IRI nicht zellgebunden, sondern primär parakriner Natur sind.

4.5 Möglichkeiten der therapeutischen Funktion von NHDF und deren EZV

Für jeden einzelnen Versuchsaspekt dieser Arbeit, wurde immer der therapeutische Effekt nach einer präemptiven Injektion von hMSC und hMSC-EZV mit dem einer Therapie mit NHDF und NHDF-EZV verglichen. In der Auswertung der Transaminasen und der Leberzellnekrose war eine Behandlung mit hMSC und hMSC der mit NHDF und NHDF-EZV überlegen. Die Leberregeneration war anhand der Microdroplet und Ki67-Auswertung nach Injektion mit hMSC und hMSC-EZV stärker ausgeprägt als nach Injektion von NHDF und NHDF-EZV.

Sowohl mesenchymale Stammzellen als auch Fibroblasten entstammen embryologisch der gleichen Zelllinie und zeigen dadurch Ähnlichkeiten in ihrer Zellmorphologie und haben vergleichbare immunmodulatorische Fähigkeiten [55,56]. Auch die EZV, gewonnen aus Zellkulturen dieser mesenchymalen Zelllinien, unterscheiden sich nicht in Größe oder Ausprägung von charakteristischen Oberflächenmarkern [80]. Fibroblasten spielen eine zentrale Rolle in den Vorgängen der Gewebereparatur durch Produktion von ECM, Ausbildung von Migrationsstraßen für andere Zellen des Reparaturvorgangs und Produktion bioaktiver Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen [82,83]. Eine wichtige Gruppe für die interzelluläre Kommunikation im Rahmen der Reparaturvorgänge spielt die Familie der „fibroblast growth factors“ (FGF), FGF 19 und 21 konnten in Vorarbeiten bereits als wichtiger Mediator hepatoprotektiver Zellvorgänge nach akutem und chronischem Leberzellschaden nachgewiesen werden [84]. Auch eine Injektion dieser Wachstumsfaktoren konnte in unterschiedlichen Mausmodellen chronische und akute Leberzellschäden abmildern [85–87], den kardialen IRI verringern [88] und die Leber- und Nierenfunktion nach intestinalem IRI verbessern [89]. Anhand dieser Daten scheinen eine Abmilderung des hepatischen IRIs und beschleunigende Effekte auf die Leberzellregeneration durch eine Therapie mit Fibroblasten oder deren EZV möglich, konnten aber in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine präemptive Injektion mit NHDF oder NHDF-EZV nimmt verglichen mit einer Behandlung mit PBS keinen positiven Einfluss auf die Transaminasenspiegel oder die Ausprägung der Nekrosefläche. Auch führt eine Therapie mit NHDF und NHDF-EZV nicht zu einer gesteigerten Microdroplet-

bildung, ein proliferationsfördernder Effekt konnte aber in der Spätphase der Reperfusion 72 Stunden nach Induktion des IRI anhand der Ki67-Auswertung nachgewiesen werden.

Bisher gibt es noch keine Daten zu den direkten Folgen einer Therapie mit Fibroblasten oder deren EZV auf den hepatischen IRI. Wachstumshormone der FGF – Familie scheinen wie oben beschrieben positiven Einfluss auf akute und chronische Leberschädigung zu nehmen. FGF-21 konnte zudem als Serummarker mit Anstieg bei Patienten nach einer Lebertransplantation identifiziert werden. Die Höhe des FGF-21-Spiegels korrelierte direkt proportional mit der Höhe von AST und ALT und somit mit dem Ausmaß des hepatischen IRI [87]. Studien, die den therapeutischen Effekt von Fibroblasten und deren EZV auf den hepatischen IRI nachweisen oder die Effekte einer Therapie mit mesenchymalen Stammzellen unter Einbezug der jeweiligen EZV vergleichen, wurden bisher noch nicht vorgenommen. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit scheint eine präemptive Injektion mit NHDF und NHDF-EZV einer Therapie mit hMSC und hMSC-EZV unterlegen zu sein, nur unter hMSC- und hMSC-EZV-Behandlung kommt es zu einer messbaren Abmilderung des IRI und einer Steigerung der Leberzellregeneration.

4.6 Möglichkeiten in der klinischen Anwendung für hMSC und hMSC-EZV

Die den IRI abschwächenden Effekte und die Förderung der hepatozellulären Regeneration durch eine präemptive Injektion von hMSC und hMSC-EZV vor IRI im Mausmodell bieten einen für die Transplantationschirurgie interessanten Ansatz zur Abschwächung von ischämiebedingten Leberzellschäden. Mesenchymale Stammzellen sind durch Gewinnung von Fettgewebe oder Knochenmark leicht zugänglich und lassen sich ohne große Probleme kulturell anzüchten und expandieren [38]. Jedoch kommt es gerade bei zu langer Lagerung in Zellkulturen und Zellexpansion durch Zellstress und einer Zunahme spontaner Zellmutationen proportional zur Zeit der kulturellen Anzucht zu onkogenen Veränderungen der Stammzellen [44,45]. Durch Injektion mit mesenchymalen Stammzellen kann es zu Mutationen von so genannten „Check-Point-Inhibitoren“, die wichtige Kontrollpunkte im Zellzyklus darstellen und zur Ausmusterung fehlerhafter

Zellen führen und dadurch als natürlicher Recyclingmechanismus für entartete Zellen dienen, kommen. Dadurch entziehen mutierte Zellen sich den natürlichem Aussortierungsprozess im Körper, tumorgene Veränderungen in Zielorganen wurden bereits beschrieben [44]. Auch ist bisher noch unklar, wie hoch die tatsächlich therapeutisch sinnvolle Dosis an mesenchymalen Stammzellen in klinischen Studien sein muss, um ischämiebedingte Schäden abzuschwächen und die Zellregeneration zu fördern. Problematisch an dieser Dosierungsfrage ist, dass hohe intravenös verabreichte Stammzell-Dosen mit Mikroembolien im Lungenkreislauf assoziiert sind [53]. In einem Tierversuchsmodell zum myokardialen IRI konnte bereits bei einer Injektionsdosis 2×10^6 mesenchymaler Stammzellen pulmonale Mikroembolien nachgewiesen werden [90]. Gängige Dosierungen in durchgeführten hepatischen IRI-Versuchen reichen von 1×10^6 [62] bis 3×10^6 [53] pro Injektion und Maus, in dieser Arbeit wurden 1×10^6 hMSC verwendet. Untersuchungen, ob es bei den hier genannten Dosierungen zu Mikro- bis Makroembolien in der Lungenstrombahn kam wurden aber nicht durchgeführt. Die Dosisabhängigkeit zwischen Zellmenge und Embolierisiko und sichere Maximaldosierungen bei Injektion mesenchymaler Stammzellen muss in weiteren Forschungsarbeiten noch genauer beleuchtet werden.

Die Verwendung von Extrazellulärvesikeln im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen gilt bisher als sicher, tumorgene Formationen oder andere durch Zellen bedingte negative Folgen sind bisher noch nicht beschrieben, müssen aber zur sicheren klinischen in vivo Verwendung noch weiter erforscht werden. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von EZVs anstelle von Stammzellen ist deren einfachere Lagerung und Transport. EZV überstehen eine Lagerung von über einem Jahr bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ohne messbare Veränderungen und eignen sich deshalb für eine klinische Anwendung ad hoc zum Beispiel bei der ungeplanten Transplantation postmortalen Organe in der Transplantationsmedizin [91].

4.7 Ausblick

Der hepatische IRI stellt Ärzte in der Transplantationschirurgie immer wieder vor große Probleme. Gerade Transplantatdysfunktionen stellen große Herausforderungen in der postoperativen Versorgung des Patienten dar. In Deutschland und Europa sind Spenderorgane knapp, lange Wartelisten mit hoher Mortalitätsrate gelisteter Patienten sind klinischer Alltag. Zudem sind gerade Transplantate von vorerkrankten Spendern, wie zum Beispiel Adipositas, hohes Spenderalter oder Steatosis hepatis, besonders empfänglich für den IRI, was den Pool an potenziellen Spenderorganen noch verschmälert. Die therapeutische Möglichkeit den IRI abzumildern und die lebereigene Regenerationsfähigkeit zu fördern birgt große Hoffnung den Spenderpool um ECD-Organen zu erweitern. Seit der Entdeckung der hMSC vor über 40 Jahren stehen diese im Zentrum der Forschung der regenerativen Medizin. In vielen vorangegangenen Tierversuchsmodellen konnte die Wirksamkeit der hMSC auf den IRI in diversen Organen bewiesen werden. Aufgrund der aufwendigen Kultur mit eingeschränkter Verfügbarkeit sowie potenziell onkogenen Eigenschaften der meist allogenen Zellen, der Bildung von organfremden Zellinseln im Zielorgan und pulmonalen Embolien gelten mesenchymale Stammzellen nur sehr eingeschränkt tauglich für die Anwendung am Menschen. Da die Effekte der Stammzellen primär parakriner Natur sind, rücken deren EZV mehr und mehr in den Forschungsmittelpunkt. Die möglicherweise beschriebenen adversen Langzeitfolgen der mesenchymalen Stammzellen wurden bei deren EZVs bisher nicht beobachtet. Zudem sind sie als nicht teilungsfähige Zellpartikel problemlos ad hoc einsetzbar. Eine EZV-Therapie zur Abmilderung des IRI und damit Erweiterung des Spenderpools scheint ein sehr vielversprechender Ansatz zu sein. In vivo Experimente am Menschen wären nach weiterer experimenteller Grundlagenforschung der nächste Schritt zu einer standardisierten klinischen Anwendung.

V. Zusammenfassung

Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden stellt ein großes Problem in der Transplantations- und Leberchirurgie dar: Insbesondere durch Fibrose, Steatose oder Entzündungsprozesse vorgeschädigte Organe zeigen eine erhöhte Vulnerabilität für den Reperfusionsschaden. Protektive Effekte einer Therapie mit mesenchymalen Stammzellen auf verschiedene Organsysteme wie Herz, Lunge oder Nieren konnten bereits gezeigt werden. Ein direkter Vergleich mit den morphologisch sehr ähnlichen Fibroblasten wurde bisher nicht durchgeführt. In Vorarbeiten zeigten sowohl mesenchymale Stammzellen als auch Fibroblasten eine regenerationsfördernde Wirkung durch Abmilderung von Zellschäden und Steigerung der Zellproliferation. Diese Wirkung scheint nach aktuellem Forschungsstand nicht durch zellgebundene, sondern parakrine Effekte vermittelt zu werden. Eine präemptive Injektion von Extrazellulärvesikel aus dem Überstand von Zellkulturen zeigte ähnliche Effekte wie eine Therapie mit Stammzellen. Das in dieser Arbeit durchgeführte Tierversuchsmodell basiert auf einer chirurgisch induzierten 70% Ischämie der Mausleber mit präemptiver Injektion von mesenchymalen Stammzellen, Fibroblasten, sowie deren jeweilige Extrazellulärvesikel. Die Auswertung des Ischämie-Reperfusionsschadens und der Leberzellregeneration erfolgte anhand histologischer und immunhistochemischen Färbungen. Die Beobachtung erfolgte als bisher einzige Forschungsarbeit zu diesem Thema bis in die Spätphase des Ischämie-Reperfusionsschadens nach 72 Stunden. Eine präemptive Therapie mit mesenchymalen Stammzellen und deren Extrazellulärvesikeln verringerte den Leberzellschaden, gemessen anhand der Serumtransaminasenspiegel und Ausprägung der Nekrosefläche innerhalb Ischämie-exponierter Leberabschnitte, und konnte die Leberzellregeneration durch vermehrte Ausbildung von Lipid-Microdroplets und erhöhte Zellproliferationsraten der Hepatozyten bis in die Spätphase des Ischämie-Reperfusionsschadens beschleunigen. In Tieren mit einer präemptiven Injektion von Fibroblasten und deren Extrazellulärvesikel konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden. Es konnte kein Unterschied zwischen einer Therapie mit mesenchymalen Stammzellen und deren Extrazellulärvesikeln festgestellt werden. Dies unterstützt die in anderen Forschungsarbeiten bereits postulierte Hypothese, dass

die therapeutischen Effekte der Stammzellen nicht zellgebunden, sondern primär parakriner Natur sind. Da die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen aufgrund von möglichen Nebenwirkungen wie einer onkogenen Potenz, Immunreaktionen, Embolien nach Injektion oder auch Absiedelung als organfremde Inseln in anderen Organen umstritten sind, gelten deren Extrazellulärvesikel als vielversprechende Alternative. Die einfache Lagerung und dadurch sofortige Verfügbarkeit stellt einen weiteren Vorteil gegenüber der Therapie mit Stammzellen in der klinischen Anwendung dar. Für die Translation einer EZV-basierten Therapie in die klinische Praxis müssen jedoch weitere Hürden überwunden werden. Dazu gilt es das optimale Protokoll für die Gewinnung, Isolation und Lagerung von EZV zu identifizieren. Weiterhin bedarf es der Entwicklung eines Tests, um die Potenz und Wirksamkeit einer jeden EZV-Charge zu überprüfen. Aus diesem Grund laufen derzeit nur wenige und kleine klinische Studien außerhalb Europas, die therapeutische Effekte von allogenen MSC-EZV bei verschiedenen Erkrankungen untersuchen.

VI. Publikationen

Zeitschriftenbeitrag:

Anger F, Camara M, Ellinger E, Germer CT, Schlegel N, Otto C, Klein I. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Improve Liver Regeneration After Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *Stem Cells Dev.* 2019 Nov 1;28(21):1451-1462. doi: 10.1089/scd.2019.0085 (Stem Cells and Development, Impact Factor: * 3.153)

Posterbeiträge:

Anger F, Camara M, Ellinger E, Otto C, Germer CT, Klein I. Mesenchymale Stammzell-vesikel zur Behandlung des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens in der Maus. Chirurgische Forschungstage 2017, Köln. (Posterpreis)

Anger F, Camara M, Ellinger E, Germer CT, Schlegel N, Otto C, Klein I. Microvesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve liver regeneration after ischemia reperfusion injury in mice compared to vesicles derived from adult fibroblasts. 30. Biotest Wilsede Workshop für Transplantation und Immunologie von Leber und Darm 2019, Wilsede.

VII. Literaturverzeichnis

- ¹ Chirurgie: mit integriertem Fallquiz ; mit 159 Tabellen. 9., überarb. Aufl. Berlin: Springer, 2012
- ² Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L et al. Orthotopic Homotransplantation of the Human Liver: *Ann Surg* 1968; 168: 392–415, doi:10.1097/00000658-196809000-00009
- ³ Gerth H, Pohlen M, Schmidt H. Leberersatzverfahren: bereits Standardtherapie. *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 2017; 142: 367–368, doi:10.1055/s-0042-113860
- ⁴ Gerth HU, Pohlen M, Thölking G et al. Molecular adsorbent recirculating system (MARS) in acute liver injury and graft dysfunction: Results from a case-control study. *PLOS ONE* 2017; 12: e0175529, doi:10.1371/journal.pone.0175529
- ⁵ Sinner B, Kirchner G. Organersatzverfahren - Leberunterstützungsverfahren. *AINS - Anästhesiol · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerzther* 2016; 51: 554–562, doi:10.1055/s-0041-109834
- ⁶ Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2017 Lebertransplantation Qualitätsindikatoren. 2018; Im Internet: https://iqtig.org/downloads/auswertung/2017/ltx/QSKH_LTX_2017_BUAW_V02_2018-08-01.pdf
- ⁷ Neves DB, Rusi MB, Diaz LGG et al. Primary graft dysfunction of the liver: definitions, diagnostic criteria and risk factors. *Einstein São Paulo* 2016; 14: 567–572, doi:10.1590/s1679-45082016rw3585
- ⁸ Li J, Li R-J, Lv G-Y et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 2036–2047
- ⁹ Varotti G, Grazi GL, Vetrone G et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. *Clin Transplant* 2005; 19: 492–500, doi:10.1111/j.1399-0012.2005.00373.x
- ¹⁰ Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly: Pathogenesis of hepatic ischemia reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 180–187, doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06584.x
- ¹¹ Kalogeris T, Baines CP, Krenz M et al. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, 2012: 229–317 Im Internet: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123943095000067>
- ¹² de Rougemont O, Dutkowski P, Clavien P-A. Biological modulation of liver ischemia–reperfusion injury: *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 183–189, doi:10.1097/MOT.0b013e3283373ced
- ¹³ Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 86–93, doi:10.1016/S0014-4800(03)00008-X

- ¹⁴ Weigand K, Brost S, Steinebrunner N et al. Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation: Pathophysiology. *HPB Surg* 2012; 2012: 1–8, doi:10.1155/2012/176723
- ¹⁵ Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 402–408, doi:10.1007/s005340050064
- ¹⁶ Saidi RF, Kenari SKH. Liver Ischemia/Reperfusion Injury: an Overview. *J Invest Surg* 2014; 27: 366–379, doi:10.3109/08941939.2014.932473
- ¹⁷ Feng S, Lai JC. Expanded Criteria Donors. *Clin Liver Dis* 2014; 18: 633–649, doi:10.1016/j.cld.2014.05.005
- ¹⁸ Neuhaus P, Beckebaum S, Becker T et al. Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 TPG Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. *Dtsch Ärzteblatt* 2016;, doi:10.3238/arztebl.2016.rili_baek_OrgaWIOvLeberTx20161028
- ¹⁹ Branger P, Undine S. Annual Report 2019 Eurotransplant International Foundation. Eurotransplant Foundation., 2020
- ²⁰ Ploeg RJ, D'alessandro AM, Knechtle SJ et al. Risk factor for primary dysfunction after liver transplantation - a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55: 807–813, doi:10.1097/00007890-199304000-00024
- ²¹ deLemos AS, Vagefi PA. Expanding the donor pool in liver transplantation: Extended criteria donors. *Clin Liver Dis* 2013; 2: 156–159, doi:10.1002/cld.222
- ²² Bankl H. *Allgemeine Pathologie: Lehrbuch für die Gesundheits- und Krankenpflege*. Wien: Facultas, 2003
- ²³ Gehrau RC, Mas VR, Dumur CI et al. Donor Hepatic Steatosis Induce Exacerbated Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Innate Immune Response Molecular Pathways: *Transplantation* 2015; 99: 2523–2533, doi:10.1097/TP.0000000000000857
- ²⁴ Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G193–G199, doi:10.1152/ajpgi.00426.2001
- ²⁵ Spitzer AL, Lao OB, Dick AAS et al. The biopsied donor liver: Incorporating macrosteatosis into high-risk donor assessment. *Liver Transpl* 2010; 16: 874–884, doi:10.1002/lt.22085
- ²⁶ Michalopoulos GK. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276: 60–66, doi:10.1126/science.276.5309.60
- ²⁷ Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M et al. Caveolin-1 Is Essential for Liver Regeneration. *Science* 2006; 313: 1628–1632, doi:10.1126/science.1130773
- ²⁸ Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213: 286–300, doi:10.1002/jcp.21172
- ²⁹ Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19–31, doi:10.1016/S0168-8278(00)80412-2

- ³⁰ Tiberio GAM, Tiberio L, Benetti A et al. IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. *Cytokine* 2008; 42: 372–378, doi:10.1016/j.cyto.2008.03.012
- ³¹ Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ et al. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1322–1332, doi:10.1002/hep.20462
- ³² Lee EY, Inoue S, Senoo A et al. Beneficial effects of ventromedial hypothalamus (VMH) lesioning on function and morphology of the liver after hepatectomy in rats. *Brain Res* 2011; 1421: 82–89, doi:10.1016/j.brainres.2011.09.012
- ³³ Pan G, Yang Y, Zhang J et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injuries via inactivation of the MEK/ERK signaling pathway in rats. *J Surg Res* 2012; 178: 935–948, doi:10.1016/j.jss.2012.04.070
- ³⁴ Herrera MB, Fonsato V, Bruno S et al. Human liver stem cells improve liver injury in a model of fulminant liver failure. *Hepatology* 2013; 57: 311–319, doi:10.1002/hep.25986
- ³⁵ Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–247
- ³⁶ Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal Stromal Cells — Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* 2009; N/A-N/A, doi:10.1002/stem.269
- ³⁷ Thöml H, Diem H, Haferlach T. Taschenatlas der Hämatologie: morphologische und klinische Diagnostik für die Praxis. 5., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2002
- ³⁸ Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 249–282
- ³⁹ Rani S, Ryan AE, Griffin MD et al. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther* 2015; 23: 812–823, doi:10.1038/mt.2015.44
- ⁴⁰ Arslan F, Lai RC, Smeets MB et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2013; 10: 301–312, doi:10.1016/j.scr.2013.01.002
- ⁴¹ Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC et al. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 302–311, doi:10.1093/cvr/cvu022
- ⁴² He J, Wang Y, Sun S et al. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model: MV in remnant kidney mice model. *Nephrolology* 2012; 17: 493–500, doi:10.1111/j.1440-1797.2012.01589.x
- ⁴³ Bruno S, Grange C, Collino F et al. Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury. *PLoS ONE* 2012; 7: e33115, doi:10.1371/journal.pone.0033115

- ⁴⁴ Prockop DJ, Olson SD. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* 2007; 109: 3147–3151, doi:10.1182/blood-2006-03-013433
- ⁴⁵ Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC et al. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035–3039, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4194
- ⁴⁶ Kunter U, Rong S, Boor P et al. Mesenchymal Stem Cells Prevent Progressive Experimental Renal Failure but Maldifferentiate into Glomerular Adipocytes. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1754–1764, doi:10.1681/ASN.2007010044
- ⁴⁷ Breitbach M, Bostani T, Roell W et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007; 110: 1362–1369, doi:10.1182/blood-2006-12-063412
- ⁴⁸ Saat TC, van den Engel S, Bijman-Lachger W et al. Fate and Effect of Intravenously Infused Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Hepatic Ischemia Reperfusion Injury and Resection. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1–9, doi:10.1155/2016/5761487
- ⁴⁹ Nong K, Wang W, Niu X et al. Hepatoprotective effect of exosomes from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Cytotherapy* 2016; 18: 1548–1559, doi:10.1016/j.jcyt.2016.08.002
- ⁵⁰ Lopatina T, Chiara Deregibus M, Cantaluppi V et al. Stem Cell-Derived Microvesicles: A Cell Free Therapy Approach to the Regenerative Medicine. *Curr Biotechnol E* 2012; 1: 11–22, doi:10.2174/2211550111201010011
- ⁵¹ Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* 2008; 9: 871–881, doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x
- ⁵² Haga H, Yan IK, Borrelli DA et al. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia/reperfusion injury: Haga et al. *Liver Transpl* 2017; 23: 791–803, doi:10.1002/lt.24770
- ⁵³ Yao J, Zheng J, Cai J et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neutrophil inflammatory response. *FASEB J* 2019; 33: 1695–1710, doi:10.1096/fj.201800131RR
- ⁵⁴ Flavell SJ, Hou TZ, Lax S et al. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation: Fibroblasts in inflammation. *Br J Pharmacol* 2009; 153: S241–S246, doi:10.1038/sj.bjp.0707487
- ⁵⁵ Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94: 258–263, doi:10.3324/haematol.13699
- ⁵⁶ Hantash BM. Differentiation of mesenchymal stem cells into fibroblasts, compositions comprising mesenchymal stem cell-derived fibroblasts and methods of using the same. *World Intellectual Prop Organ Pat Coop TREATY* 2009;, doi:PCT:WO 2009/155334 A1
- ⁵⁷ Soundararajan M, Kannan S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *J Cell Physiol* 2018; 233: 9099–9109, doi:10.1002/jcp.26860

- ⁵⁸ Fouraschen SMG, Wolf JH, van der Laan LJW et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Factors Promote Tissue Repair in a Small-for-Size Ischemic Liver Model but Do Not Protect against Early Effects of Ischemia and Reperfusion Injury. *J Immunol Res* 2015; 2015: 1–13, doi:10.1155/2015/202975
- ⁵⁹ Jin G, Qiu G, Wu D et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *Int J Mol Med* 2013; 31: 1395–1401, doi:10.3892/ijmm.2013.1340
- ⁶⁰ Du Y, Li D, Han C et al. Exosomes from Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hiPSC-MSCs) Protect Liver against Hepatic Ischemia/ Reperfusion Injury via Activating Sphingosine Kinase and Sphingosine-1-Phosphate Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43: 611–625, doi:10.1159/000480533
- ⁶¹ Fouraschen SMG, Pan Q, de Ruiter PE et al. Secreted Factors of Human Liver-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Liver Regeneration Early After Partial Hepatectomy. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2410–2419, doi:10.1089/scd.2011.0560
- ⁶² Lee SC, Kim JO, Kim S-J. Secretome from human adipose-derived stem cells protects mouse liver from hepatic ischemia–reperfusion injury. *Surgery* 2015; 157: 934–943, doi:10.1016/j.surg.2014.12.016
- ⁶³ Löffler G. *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*. 7., komplett überarbeitete Auflage. Heidelberg: Springer, 2008
- ⁶⁴ Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 2018; 127: 175–186, doi:10.1007/s00412-018-0659-8
- ⁶⁵ Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–322, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- ⁶⁶ van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M et al. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models. *J Hepatol* 2015; 62: 975–977, doi:10.1016/j.jhep.2014.12.014
- ⁶⁷ de Graaf W, Heger M, Spruijt O et al. Quantitative Assessment of Liver Function after Ischemia-Reperfusion Injury and Partial Hepatectomy in Rats. *J Surg Res* 2012; 172: 85–94, doi:10.1016/j.jss.2010.06.038
- ⁶⁸ Shen X-D, Gao F, Ke B et al. Inflammatory responses in a new mouse model of prolonged hepatic cold ischemia followed by arterialized orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 1273–1281, doi:10.1002/lt.20489
- ⁶⁹ Nojima H, Freeman CM, Schuster RM et al. Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J Hepatol* 2016; 64: 60–68, doi:10.1016/j.jhep.2015.07.030
- ⁷⁰ Yuan X, Li D, Chen X et al. Extracellular vesicles from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells (hiPSC-MSCs) protect against renal ischemia/reperfu-

- sion injury via delivering specificity protein (SP1) and transcriptional activating of sphingosine kinase 1 and inhibiting necroptosis. *Cell Death Dis* 2017; 8: 3200, doi:10.1038/s41419-017-0041-4
- ⁷¹ van Poll D, Parekkadan B, Cho CH et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2008; 47: 1634–1643, doi:10.1002/hep.22236
- ⁷² Bruno S, Herrera Sanchez MB, Pasquino C et al. Human Liver-Derived Stem Cells Improve Fibrosis and Inflammation Associated with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 1–14, doi:10.1155/2019/6351091
- ⁷³ Tautenhahn H-M, Brückner S, Baumann S et al. Attenuation of Postoperative Acute Liver Failure by Mesenchymal Stem Cell Treatment Due to Metabolic Implications: *Ann Surg* 2016; 263: 546–556, doi:10.1097/SLA.0000000000001155
- ⁷⁴ Wang Y, Chen X, Cao W et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014; 15: 1009–1016, doi:10.1038/ni.3002
- ⁷⁵ Giuliani M, Oudrhiri N, Noman ZM et al. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* 2011; 118: 3254–3262, doi:10.1182/blood-2010-12-325324
- ⁷⁶ Gao F, Chiu SM, Motan DAL et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2062–e2062, doi:10.1038/cddis.2015.327
- ⁷⁷ Ezquer F, Bahamonde J, Huang Y-L et al. Administration of multipotent mesenchymal stromal cells restores liver regeneration and improves liver function in obese mice with hepatic steatosis after partial hepatectomy. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 20, doi:10.1186/s13287-016-0469-y
- ⁷⁸ Yang Y, Hong Y, Cho E et al. Extracellular vesicles as a platform for membrane-associated therapeutic protein delivery. *J Extracell Vesicles* 2018; 7: 1440131, doi:10.1080/20013078.2018.1440131
- ⁷⁹ Bjørge IM, Kim SY, Mano JF et al. Extracellular vesicles, exosomes and shedding vesicles in regenerative medicine – a new paradigm for tissue repair. *Biomater Sci* 2018; 6: 60–78, doi:10.1039/C7BM00479F
- ⁸⁰ Anger F, Camara M, Ellinger E et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Improve Liver Regeneration After Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *Stem Cells Dev* 2019; 28: 1451–1462, doi:10.1089/scd.2019.0085
- ⁸¹ Bei Y, Das S, Rodosthenous RS et al. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Theranostics. *Theranostics* 2017; 7: 4168–4182, doi:10.7150/thno.21274
- ⁸² Costa-Almeida R, Soares R, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration: Fibroblasts orchestrating tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12: 240–251, doi:10.1002/term.2405

- ⁸³ Mackey AL, Magnan M, Chazaud B et al. Human skeletal muscle fibroblasts stimulate *in vitro* myogenesis and *in vivo* muscle regeneration: Human skeletal muscle fibroblasts stimulate myogenesis. *J Physiol* 2017; 595: 5115–5127, doi:10.1113/JP273997
- ⁸⁴ Shan Z, Alvarez-Sola G, Uriarte I et al. Fibroblast growth factors 19 and 21 in acute liver damage. *Ann Transl Med* 2018; 6: 257–257, doi:10.21037/atm.2018.05.26
- ⁸⁵ Luo J, Ko B, Elliott M et al. A nontumorigenic variant of FGF19 treats cholestatic liver diseases. *Sci Transl Med* 2014; 6: 247ra100-247ra100, doi:10.1126/scitranslmed.3009098
- ⁸⁶ Zhou M, Learned RM, Rossi SJ et al. Engineered FGF19 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and fibrosis in mice: Zhou et al. *Hepatol Commun* 2017; 1: 1024–1042, doi:10.1002/hep4.1108
- ⁸⁷ Ye D, Li H, Wang Y et al. Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is A Sensitive Biomarker for Severe Ischemia/reperfusion Injury in Patients with Liver Transplantation. *Sci Rep* 2016; 6: 19776, doi:10.1038/srep19776
- ⁸⁸ Cuevas P, Reimers D, Carceller F et al. Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury. *Eur J Med Res* 1997; 2: 465–468
- ⁸⁹ Weng L, Fu X, Li X et al. [Effects of acidi fibroblast growth factor on hepatic and renal functions after intestinal ischemia/reperfusion injury]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue Chin Crit Care Med Zhongguo Weizhongbing Jijiuyixue* 2004; 16: 19–21
- ⁹⁰ Lee RH, Pulin AA, Seo MJ et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 54–63, doi:10.1016/j.stem.2009.05.003
- ⁹¹ Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res* 2019; 7: 8, doi:10.1186/s40364-019-0159-x

VIII. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
ECD	„Expanded Criteria Donor“
ECM	„Extracellular Matrix“
EGF	„Epidermal Growth Factor“
EVZ	Extrazellulärvesikel
FGF	„Fibroblast Growth Factor“
hMSC	„Human Mesenchymal Stem Cells“
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
i.p.	intraperitoneal
MARS	„Molecular Adsorbent Recirculation System“
MSC	„Mesenchymal Stem Cells“
NHDF	„Normal human Dermal Fibroblasts“
PCNA	„Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen“
ROS	„Reactive Oxygen Species“
SPAD	„Singel Pass Albumin Dialysis“
s.c.	subcutan
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF- γ	Tumornekrosefaktor gamma
VEGF	„Vascular Epidermal Growth Factor“

IX. **Abbildungsverzeichnis**

		Seite
Abbildung 1	Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus.	11
Abbildung 2	Darstellung der verschiedenen Operationsschritte.	13
Abbildung 3	Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung des Nekroseareals.	17
Abbildung 4	Repräsentative Darstellung der Mikroskopaufnahmen der Microdroplet-Auswertung.	18
Abbildung 5	Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung des Microdropletanteils.	19
Abbildung 6	Repräsentative Darstellung der Mikroskopaufnahmen der Ki67-Auswertung.	20
Abbildung 7	Repräsentative Darstellung der quantitativen Auswertung der Ki67-Färbung anhand einer Mikroskopaufnahmen in 40-facher Vergrößerung.	21
Abbildung 8	Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Transaminasen der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere.	23
Abbildung 9	Darstellung der Transaminasenspiegel der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionzeiten.	24
Abbildung 10	Repräsentative Längsschnitte (HE-Färbung, 20-facher Vergrößerung) durch einen Leberlappen der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion.	26
Abbildung 11	Repräsentative Lichtbildmikroskopieaufnahmen (40-facher Vergrößerung) von HE gefärbten Leberschnitten der mit	27

	PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion.	
Abbildung 12	Darstellung der Nekrosewerte in Prozent zur Gesamtzellfläche der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionenzeiten.	28
Abbildung 13	Repräsentative Lichtbildmikroskopieaufnahmen von Microdroplets (40-fache Vergrößerung) von HE gefärbten Leberschnitten der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion.	31
Abbildung 14	Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Microdropletfläche der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere.	32
Abbildung 15	Darstellung der Microdropletfläche in Prozent zur Gesamtzellfläche pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionenzeiten.	33
Abbildung 16	Repräsentative Aufnahmen der Ki67-Färbung (40-fache Vergrößerung) der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere 48 h nach Reperfusion.	36
Abbildung 17	Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere.	36
Abbildung 18	Darstellung der Anzahl Ki67-positiver Hepatozyten pro HPF der mit PBS, NHDF, NHDF-EZV, hMSC, hMSC-EZV behandelten Tiere nach den jeweiligen Reperfusionenzeiten.	38

X. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Ingo Klein für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie die Hilfe und Korrektur bei der Fertigstellung danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Dr. Friedrich Anger und Dr. Monica Camara, für die ausgezeichnete praktische Betreuung im Labor, stetige Ratschläge bei der Ausarbeitung der Fragestellung, Auswertung der erhobenen Daten und Geduld bei der Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung und andauernde Ermutigung mein bisheriger Lebensweg nicht möglich gewesen wäre.