

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

Einfluss der Tie-2 modulierenden Angiopoetine-1 und -2 auf die nephroprotektiven
Effekte endothelialer Vorläuferzellen im Mäusemodell des akuten ischämischen
Nierenversagens

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

vorgelegt von
Jörg Rinneburger
aus
Düsseldorf

Göttingen 2013

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

- I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Patschan
- II. Berichterstatter: Prof. rer. nat. Wilting
- III. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Schäfer
- IV. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2013

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
1. Stand der Forschung und Zielsetzung	6
1.1 Stand der Forschung	6
1.1.1 Akute mikrovaskuläre renale Funktionsstörungen als Ursache des akuten Nierenversagens	6
1.1.2 Endothelvorläuferzellen	7
1.1.3 EPCs im Mausmodell des akuten ischämischen Nierenversagens	10
1.1.4 Angiopoetine	11
1.2 Zielsetzung.....	12
2. Materialien und Methoden	13
2.1 EPC-Gewinnung aus Spendermäusen	13
2.2 Zellmarkierung für EPC-Verteilungsbewertung	14
2.3 Inkubation mit Ang-1, Ang-2 und Ang-1-Antagonist	14
2.4 Operationstechniken	15
2.4.1 Einführende Bemerkungen	15
2.4.2 Anästhesie	15
2.4.3 Fixierung des Tieres / Operationsvorbereitung.....	16
2.4.4 Schnittführung und Darstellung des Operationsfeldes	16
2.4.5 Injektion der Zellen / Ischämie	16
2.4.6 Blut- und Organentnahme nach 48 Stunden	17
2.5 Serumkreatininbestimmung.....	17
2.6 Dünnschnitte zur histologischen Auswertung	18
2.6.1 Konventionelle histologische Beurteilung	19
2.6.2 Immunfluoreszenzhistologie	21
2.7 Statistische Auswertung	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Serumkreatininmessungen.....	23
3.1.1 Kontrollgruppe	23
3.1.2 Gruppe 1.....	23
3.1.3 Gruppe 2.....	23
3.1.4 Gruppe 3.....	23
3.1.5 Gruppe 4.....	24
3.1.6 Gruppe 5.....	24

3.1.7 Tabelle der Ergebnisse	24
3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	26
3.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzhistologie	31
4. Diskussion	32
5. Zusammenfassung	35
6. Anhang	36
6.1 Tabellen 5 und 6	36
6.2 Tabellenverzeichnis	38
6.3 Abbildungsverzeichnis	39
7. Literatur	39

Abkürzungsverzeichnis

ANV	Akutes Nierenversagen
Ang	Angiopoetin
BP	Blocking Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CFU-EC	Colony Forming Unit Endothelial Cell
EBM	Endothelial Basal Medium
ECFC	Endothelial Colony Forming Cell
Egr	Early Growth Response
EPC	Endothelial Progenitor Cell
Flk	Fetal Liver Kinase
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IL	Interleukin
MPS	Mononukleär-Phagozytären System
OEC	Late Outgrowth Endothelial Cell
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Englisch Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
SEM	Standard Error Of The Mean
SVF	Stromal Vascular Fraction
TGF	Transforming Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VE-Cadherin	Vascular-Endothelial-Cadherin

Einleitung

Das akute Nierenversagen (ANV) ist zu einem wesentlichen Anteil verantwortlich für Morbidität und Mortalität stationär behandelter Patienten. Die Inzidenz des akuten Nierenversagens liegt auf Normalstationen bei etwa 5%. Intensivmedizinisch betreute Patienten entwickeln in bis zu 50% der Fälle ein akutes Nierenversagen (KRIBBEN et al. 2003). Unter einem diesbezüglich besonders hohen Risiko leiden Patienten mit Sepsis. Das immer noch entscheidende Problem beim akuten Nierenversagen ist die sehr hohe Mortalität. Auch heutzutage liegt die Sterblichkeit der im Krankenhaus aufgetretenen Fälle des ANV bei 50%. Ungeachtet der Fortschritte auf den Gebieten der Nierenersatztherapie (Dialyse) und Intensivmedizin während der letzten 20 Jahre handelt es sich beim akuten Nierenversagen noch immer um die kostenintensivste stationäre Nierenerkrankung. Die derzeit verfügbaren Therapiekonzepte des ANV führen kaum zu einer merklichen Verbesserung der Prognose der betroffenen Patienten. Ein möglicherweise neuer Therapieansatz könnte in der Anwendung von so genannten Endothelvorläuferzellen (*endothelial progenitor cells* - EPCs) bestehen. EPCs entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und sind unter physiologischen und pathologischen Umständen an der *Vaskulogenese*, der Neubildung von kleinen Blutgefäßen beteiligt (ASAHARA et al. 1997; ASAHARA et al. 1999; KHAKOO & FINKEL 2005; URBICH & DIMMELER 2004a; URBICH & DIMMELER 2004b). Im Jahre 2006 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Zellen nach einer akuten renalen Ischämie aus dem Knochenmark mobilisiert werden und eine nephroprotektive Wirkung im postischämischen Organ entfalten (PATTSCHAN et al. 2006).

Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob die exogene Gabe von Angiopoetin-1- oder Angiopoetin-2-vorbehandelten Endothelvorläuferzellen die therapeutische Effizienz von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen verstärken kann. Bei dieser in-vivo-Versuchsreihe wurden murine EPCs mit den potentiell EPC-aktivierenden Substanzen Angiopoetin-1 bzw. Angiopoetin-2 vorbehandelt und in Wildtypmäuse (C57BI/6N) mit akut ischämischem Nierenversagen injiziert. Die Qualität der Behandlung wurde mittels Bestimmung der Serumkreatininwerte sowie durch die Beurteilung der Nierenmorphologie evaluiert. Zum Vergleich standen Mäuse ohne Zellinjektion sowie Mäuse mit Injektion von nicht vorbehandelten EPCs.

1. Stand der Forschung und Zielsetzung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Akute mikrovaskuläre renale Funktionsstörungen als Ursache des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen manifestiert sich als akute (innerhalb von Stunden bis Tagen auftretende) Funktionsverschlechterung des Organs, welche in allen Fällen durch einen Anstieg der Blutkonzentration so genannter Retentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff) um mindestens 50% des Ausgangswertes gekennzeichnet ist. Prinzipiell kann sich ein ANV als Komplikation einer Störung des Urinabflusses (postrenales ANV - 5% aller Fälle), als Folge einer vorübergehenden Minderdurchblutung (prärenales ANV - 55% der Fälle) sowie schließlich als Komplikation von Erkrankungen manifestieren, die primär zu einer funktionellen / strukturellen Alteration des Nierenparenchyms führen (intrarenales ANV - 40%). Die häufigste singuläre Ursache des ANV ist eine, meist nur vorübergehende, generalisierte Minderdurchblutung der Nieren. Diese verursacht insbesondere Funktionsstörungen bzw. strukturelle Schäden an den Tubulusepithelzellen. Dementsprechend kann eine Minderdurchblutung (Ischämie) sowohl zu einem prärenalen als auch zu einem intrarenalen ANV führen. Entscheidend für die Differenzierung zwischen prä- und intrarenalem ANV auf dem Boden einer Ischämie ist das Ausmaß der renalen Funktionsstörung. Während beim prärenalen ANV die Nierenfunktionsstörung nach Beseitigung der Ursache (z.B. Blutung mit Blutdruckabfall) rasch reversibel ist, hält beim intrarenalen ANV die renale Dysfunktion an. Morphologisch finden sich dabei tubuläre Epithelzellnekrosen. Das durch eine Ischämie hervorgerufene prärenale / intrarenale ANV wird auch als akutes ischämisches Nierenversagen bezeichnet. Interessanterweise wird der Erholungsprozess der Nieren nach einer Ischämie durch verschiedene Prozesse beeinflusst. Einerseits kommt es zur interstitiellen Entzündung, andererseits entwickeln sich Schäden an den kleinen, intrarenalen Arterien und Venen (PATTSCHAN et al. 2012). Diese sind durch Endothelzellschwellungen charakterisiert. Die Zellschwellungen inhibieren den Blutwiedereinstrom ins Gewebe, was ein prolongiertes ANV zur Folge hat. Dieses als *'no reflow phenomenon'* bezeichnete Phänomen ist Angriffspunkt des in dieser Arbeit untersuchten Therapieansatzes.

1.1.2 Endothelvorläuferzellen

Der Vertebratenorganismus ist durch eine ständige Geweberegeneration gekennzeichnet. Auch die Blutgefäße sind einem stetigen strukturellen Wandel unterworfen. Ein solcher vollzieht sich einerseits physiologisch bei z.B. erhöhter Muskelaktivität bei andauernder sportlicher Betätigung oder pathologisch im Rahmen von malignem Gefäßwachstum in Tumoren. Die Neubildung von Gefäßen kann auf zwei verschiedene Arten stattfinden. Zum einen kommt es zur lokalen Proliferation ortsständiger, reifer Endothel- und anderer Gefäßwandzellen. Dieser Prozess wird als *Angiogenese* bezeichnet (KHAKOO & FINKEL 2005; URBICH & DIMMELER 2004a; URBICH & DIMMELER 2004b). Zum anderen kommt es bei der so genannten *Vaskulogenese* zur Formation und Einwanderung von nicht ortsständigen unreifen Vorläufer- bzw. Stammzellen (BAILEY et al. 2004; PATSCHAN et al. 2006). Entgegen der früheren Ansicht, dass dieser Vorgang nur bei der erstmaligen Gefäßausbildung während der Embryogenese stattfindet, ist man mittlerweile zu der Ansicht gekommen, dass die Vaskulogenese auch im adulten Organismus zeitlebens stattfindet. Eine zentrale Bedeutung bei diesem Prozess kommt benannten endothelialen Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells* - EPC) zu. Diese wurden erstmals durch Untersuchungen von ASAHARA et al. (1997) als zirkulierende Blutbestandteile identifiziert. Dabei wurden CD34⁺-Leukozyten aus humanem Blut isoliert. Nach einigen Tagen der Kultivierung unter definierten Bedingungen wurden die Zellen morphologisch und im Hinblick auf ihr entsprechendes Oberflächenmarkerprofil untersucht. Dabei fanden sich eindeutige endotheliale Zellmerkmale. Injektionen der isolierten Zellen in immuninkompetente Versuchstiere mit Extremitätenischämien bewirkten eine deutlich schnellere funktionelle Erholung des postischämischen Gewebes (KALKA et al. 2000). Bei der Untersuchung von entnommenen Gewebeproben ließen sich in den Kapillarwänden des reperfundierten Gewebes in erhöhtem Maße die injizierten Zellen nachweisen.

Bis zum heutigen Tage ist die Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzellen sehr viel weiter vorangeschritten. Man geht mittlerweile von der Existenz zweier Hauptgruppen von EPCs aus.

1.1.2.1 'colony forming unit endothelial cells' (CFU-ECs)

Die erste Gruppe wird durch Zellen repräsentiert, die sich überwiegend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln (BAILEY et al. 2004; GRANT et al. 2002). Zum Teil werden auch andere Zelltypen als mögliche Vorläufer beschrieben, so z.B. bestimmte Fettzellsubtypen ('cultures stromal-vascular fraction cells' - SVF cells) (PLANAT-BENARD et al. 2004) und auch kardiale Progenitorzellen (BELTRAMI et al. 2003). Hauptsächlich finden sich EPCs, die sich von den genannten Zellen ableiten, innerhalb der Monozytenfraktion des Blutes (ROMAGNANI et al. 2005). Diese EPCs besitzen Zellmarker von „reifen“ und „unreifen“ Zellen. Als Marker „unreifer“ Zellen sind hier c-Kit, CD34, CD133 (RAFII & LYDEN 2003) zu nennen. Von EPCs exprimierte Marker „reifer“ Zellen sind KDR bzw. Flk-1 (humaner bzw. muriner Typ-2 Rezeptor des Gefäßwachstumsfaktors VEGF (KHAKOO & FINKEL 2005)), Tie-2 (Rezeptor für Angiopoetin-1 (WAKUI et al. 2006)) und CD31 (PECAM₁ endotheliales Zelladhäsionsmolekül (BALDWIN et al. 1994)). Will man diese Gruppe von EPCs kultivieren, wählt man als Medium EBM-2 (*Endothelial Basal Medium-2*). Die Zellen werden auf Fibronektin-beschichteten Platten ausgebracht. Die Kultivierungszeit liegt bei 5-7 Tagen. In neueren Studien werden die anwachsenden Zellen auch als 'colony forming unit endothelial cells' (CFU-ECs) definiert (CASE et al. 2007; YODER et al. 2007). Die beschriebenen Zellen wurden in den meisten bislang veröffentlichten Arbeiten als EPCs klassifiziert. Sie weisen auch definitiv proangiogene Effekte auf. Allerdings ist davon auszugehen, dass es keine „wirklichen“ endothelialen Vorläuferzellen sind. Ihre Injektion zeigte im Tiermodell Ischämie-protective Effekte: knochenmarktransplantierte Mäuse mit iatrogenem Herzinfarkt zeigten im postischämischen Verlauf eine Inkorporation von CFU-ECs in den Randbereich des infarzierten Myokards „Grenzzone“ - die Mehrzahl der Zellen stammte dabei vom Spenderorganismus ab (ASAHARA et al. 1999; SCHUSTER et al. 2004). Klinische Untersuchungen zeigten zudem, dass EPCs bzw. CFU-ECs bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung vermindert sind (ADAMS et al. 2004; LAMBIASE et al. 2004), was für einen „Verbrauch“ der zirkulierenden Zellen in den geschädigten Endothelien spräche. Allerdings findet man nicht durchweg einen sicheren Nachweis für einen Einbau der Zellen in die geschädigten Gefäßwände bzw. für den Ersatz von nekrotischen Endothelzellen durch CFU-ECs. Dementsprechend werden diese Zellen in einigen neueren Arbeiten eher als

„hämatopoetische Vorläuferzellen mit proangiogenem Potential bezeichnet“ (Case et al. 2007; Yoder et al. 2007).

1.1.2.2 'endothelial colony forming cells' (ECFCs)

Betrachtet man die zweite Gruppe, so weisen die ihr zugehörigen Zellen phänotypisch sehr viel mehr Gemeinsamkeiten mit reifen Endothelzellen auf. In Tierexperimenten ist auch ein ausgeprägterer „Einbau“ der Zellen in die endotheliale Kontinuität von Blutgefäßen im geschädigten Gewebe nachweisbar. In einer ersten Beschreibung von LIN et al. (2000) wurden die Zellen der zweiten Hauptgruppe als *'late outgrowth endothelial cells'* (OECs) bezeichnet. Diese wurden später von YODER et al. (2007) als *'endothelial colony forming cells'* (ECFCs) den oben beschriebenen EPCs bzw. besser CFU-ECs gegenübergestellt. Eine Kultivierung von ECFCs bedarf im Gegensatz zu CFU-ECs einer Beschichtung von Kulturplatten mit Kollagen. Außerdem kommt es erst ab 3 Wochen nach Kultivierungsbeginn zu einer nennenswerten Zellproliferation. Vergleicht man ECFCs mit reifen Endothelzellen, so ist der größte Unterschied die stärkere proliferative Aktivität der ECFCs. Im Vergleich mit CFU-ECs zeigen ECFCs eine deutliche Vaskulogeneseaktivität *in vitro* und *in vivo*. ECFCs führen *in vitro* nachweisbar zur Formation von gefäßähnlichen Strukturen und zeigen im Tiermodell eine deutlichere Inkorporation in geschädigte Gefäßwände (CASE et al. 2007; YODER et al. 2007).

Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit CFU-ECs, die im weiteren Verlauf als EPC bezeichnet werden.

EPC sind vorzugweise, wie bereits beschrieben, in der Monozytenfraktion des Blutes zu finden (ROMAGNANI et al. 2005). Ihre Konzentration im Blut wird in großer Spannbreite angegeben. Die Werte reichen von 0,0001% (INGRAM et al. 2005) bis 12% (HIASA et al. 2004), wobei sich die Werte auf die Monozytenfraktion als Nennwert beziehen.

EPCs können auf verschiedene Weise aus dem Blut, Knochenmark oder beispielsweise der Milz isoliert und gezählt werden. Zum einen gelingt dies durch Kultivierung im Rahmen des *'colony forming unit assay'* (HEESCHEN et al. 2003), zum anderen durchflusszytometrisch. (LAMBIASE et al. 2004). Im ersten Verfahren geschieht die Differenzierung der Zellen durch die Untersuchung der in Kultur koloniebildenden Zellen auf verschiedene endotheliale Marker. Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden Zellen innerhalb der monozytären

Fraktion auf die Koexpression von „unreifen“ (CD34, CD133, c-Kit) und endothelialen Markern (KDR bzw. Flk-1, Tie-2, CD31) analysiert. Durch die Parallelsuche nach „reifen“ und „unreifen“ Kriterien sollen die Zellen mit zweiseitigem Charakter identifiziert werden. Dabei sollen jene Zellen gefunden werden, die zum einen Stamm- bzw. Vorläuferzellcharakteristika aufweisen, aber zum anderen schon eine Differenzierung in Richtung des endothelialen Phänotyps durchlaufen haben.

Betrachtet man die beschriebene protektive Wirkung der EPCs, so beruht diese überwiegend nicht auf einer direkten Inkorporation in Gefäßwände mit nachfolgender endothelialer Ausdifferenzierung, sondern wahrscheinlich eher auf einer erstmals von REHMAN et al. (2003) gezeigten Produktion und Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren (VEGF, HGF, G-CSF, GM-CSF). Diese Faktoren vermitteln in vivo eine Rückbildung von Endothelzellschwellungen, welche der Durchblutung entgegenwirken. (URBICH & DIMMELER 2004a)

Die pathophysiologische Bedeutung von EPCs für die Restauration der Mikrozirkulation nach Gewebeischämien konnte insbesondere für die koronare Herzkrankheit gezeigt werden (SCHUH et al. 2007). Deutlich geringer sind die Erkenntnisse über die pathophysiologische Bedeutung von EPCs bei Nierenerkrankungen. Allerdings konnte die Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen an glomerulären Endothelregenerationen bei der anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis mehrfach bewiesen werden (ROOKMAAKER et al. 2003). Erste wegweisende Untersuchungen zur Wertigkeit von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen wurden von YAMAMOTO et al. (2002) veröffentlicht. Hierbei wurde die Wirksamkeit von reifen humanen Endothelzellen (*'human umbilical vein endothelial cells'* - HUVECs) auf die Nierenfunktion von Ratten nach beidseitiger renaler Ischämie analysiert. Zellbehandelte Ratten entwickelten kein akutes Nierenversagen. Histologisch waren die injizierten Zellen sowohl in tubulären als auch glomerulären Kapillarwänden nachweisbar. Dieser Befund deutete daraufhin, dass die infundierten Zellen das Erholungspotential der Kapillaren erhöhten und dadurch die Wiederherstellung der Nierenfunktion beschleunigt hatten. In 2006 wurde erstmals die prinzipielle therapeutische Anwendbarkeit von EPCs zur Behandlung des akuten ischämischen Nierenversagens publiziert (PATTSCHAN et al. 2006).

1.1.3 EPCs im Mausmodell des akuten ischämischen Nierenversagens

Im Rahmen der bislang am Mausmodell durchgeführten Untersuchungen zur Wertigkeit von EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen konnten folgende Befunde erhoben werden:

- Eine 25-minütige, einseitige renale Ischämie führt zu einer signifikanten Mobilisierung von EPCs; diese Mobilisierung ist an einer raschen und transienten Akkumulation der Zellen in den Milzen der entsprechenden Tiere erkennbar.
- Werden die Mäuse hingegen einer ischämischen Präkonditionierungsbehandlung unterzogen (erstmalige Ischämie von 25 Minuten Dauer exakt 7 Tage vor einer zweiten Ischämie von 25 Minuten Dauer), lässt sich die beobachtete kurzfristige Akkumulation von EPCs in der Milz nicht nachweisen.

Nach ischämischer Präkonditionierung zeigen die entsprechenden Tiere im Vergleich zu nicht präkonditionierten Mäusen jedoch signifikant ausgeprägtere EPC-Infiltrate im medullären Anteil der geschädigten Niere (PATTSCHAN et al. 2006).

- Werden die EPC-Infiltrate aus der Niere nach ischämischer Präkonditionierung isoliert und in Wildtyp-Mäuse nach beidseitiger renaler Ischämie injiziert, entwickeln diese Tiere kein akutes Nierenversagen.

Weiterführende Arbeiten zeigten, dass EPCs tatsächlich aus dem Blut und den Milzen von Mäusen isoliert und kultiviert werden können (PATTSCHAN et al. 2010) und dass die therapeutische Anwendung der Zellen im Mäusemodell des ischämischen ANV reproduzierbar mit nephroprotektiven Effekten verbunden ist. Dabei lassen sich die antiischämischen Zelleffekte verstärken, wenn EPCs vor der Injektion mit der Substanz 8-O-cAMP inkubiert werden. Dieser Integrinaktivator induziert eine Umverteilung von Beta1-Integrinen auf die Oberfläche von EPCs, was zu einem vermehrten Einwandern der Zellen ins postischämische Organ führt.

In jedem Fall konnte mit diesen Untersuchungen belegt werden, dass sich das ischämieprotektive Potential syngener muriner EPCs beim ischämischen ANV durch definierte pharmakologische Vorbehandlungen *in vitro* verstärken lässt. Dieser Umstand wurde Ausgangspunkt für die Suche nach weiteren EPC-Agonisten.

1.1.4 Angiopoetine

Angiopoetine sind eine Gruppe von Proteinen, die an der Regulation von gefäßreparativen bzw. vasohomöostatischen Prozessen beteiligt sind. Sie entfalten ihre Wirkung im wesentlichen nach Bindung an den so genannten Tie-2-Rezeptor in endothelialen Zellen. Bislang am genauesten charakterisiert sind die Angiopoetine-1 und -2. Beide Moleküle sind Glykoproteine von ähnlicher Struktur und einem ungefähren Molekulargewicht von 70 kDa (MAISONPIERRE et al. 1997). Um die Interaktion mit Tie-2 konkurrieren die Angiopoetine-1 und -2. Das Verständnis der jeweiligen biologischen Wirkungen von Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 ist noch im dynamischen Wandel begriffen. Grundsätzlich wirkt Angiopoetin-2 in Abwesenheit von Angiopoetin-1 als Tie-2-Rezeptoragonist. In Anwesenheit von Angiopoetin-1 hingegen fungiert es als dosisabhängiger partieller Tie-2-Antagonist. Exogenes Angiopoetin-2 bindet und stimuliert Tie-2 mit geringerer Affinität bzw. Potenz als exogenes Angiopoetin-1 (YUAN et al. 2009). Die partielle antagonisierende Wirkung von Angiopoetin-2 wird zum Teil der Wirkung von Tie-1 auf Tie-2 zugerechnet (HANSEN et al. 2010). Dabei wird davon ausgegangen, dass Tie-1 und Tie-2 als präformierte hetero-oligomere Komplexe an der Endotheloberfläche vorliegen (CHEN-KONAK et al. 2003; MARRON et al. 2007).

Die biologischen Konsequenzen der Wirkungen von Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 werden nach wie vor intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Angiopoetin-1 im Mäusemodell *in vivo* den Blut- und Lymphgefäßumbau sowie die Wundheilung anregt. Außerdem supprimiert Angiopoetin-1 die Apoptose von Endothelzellen und fördert die Zellmigration, -proliferation und -differenzierung (BRINDLE et al. 2006). Diese Wirkung von Angiopoetin-1 wird der Erhöhung der Transkriptionsrate von Egr-1 (*Early growth response 1*) zugeschrieben. Zusammen mit VEGF kommt es zu einer synergistischen Wirkung auf Egr-1 und damit der Migration, Proliferation und Formation von Endothelzellen (ABDEL-MALAK et al. 2009).

1.2 Zielsetzung

Ziel der aktuellen Arbeit war die Analyse der modulatorischen Effekte von Angiotensin-1 und -2 auf die Nierenfunktion von C57Bl/6N-Mäusen beim akuten ischämischen Nierenversagen. Folgenden Fragen wurde nachgegangen:

1. Werden die nephroprotektiven Wirkungen von EPCs durch Zellvorbehandlung mit Angiotensin-1 und -2 in definierten Konzentrationen beeinflusst?
2. Kommt es nach Injektion von mit den Substanzen vorbehandelten Zellen zu morphologischen Veränderungen im Organ?
3. Lassen sich nach EPC-Vorbehandlung mit den benannten Mediatoren vermehrt oder gar weniger EPCs in den postischämischen Nieren detektieren als bei Tieren, welche unbehandelte Zellen erhalten hatten?

2. Materialien und Methoden

2.1 EPC-Gewinnung aus Spendermäusen

Die Isolation der EPCs erfolgte unter sterilen Bedingungen aus Milz und Blut von 8-12 Wochen alten, männlichen C57Bl/6N-Mäusen (JACKSON LABORATORY, Bar Harbor, USA). Präoperativ wurden die Mäuse durch eine Injektion von Xylazin und Ketamin in die Peritonealhöhle analgesiert und narkotisiert. Zum Einsatz kamen pro Maus jeweils 300-400 µl folgender Injektionslösung: 6,8 ml 0,9% NaCl + 520µl eines Narkosegemisches der Firma SIGMA-ALDRICH (10 ml enthalten 800 mg Ketamine HCl und 120 mg Xylazine HCl Katalog Nr.: K-113). Nach Bewusstseinsprobe mittels Einkneifen in den Mäuseschwanz wurde ein senkrechter Bauchschnitt angelegt und anschließend das Diaphragma dargestellt. Das schlagende Herz wurde transdiaphragmal mit einer Spritze zur Blutabnahme punktiert. Die Spritze beinhaltete zur Gerinnungshemmung einen Tropfen zuvor aufgezogenen Heparins (Heparin-Natrium 25000, Firma RATIOPHARM, Katalog Nr.: N21086.21-Z04). Nach maximal möglicher Blutentnahme (meist 400-500 µl) wurde die Spritze auf Eis gelegt. Nachfolgend wurde die Milz präpariert und entnommen. In einem 15-ml-Greiner-Röhrchen mit 2 ml EBM-2 (EBM-2, 'Endothelial Basal Medium-2',

Firma LONZA, Katalog Nr.: CC-3156) wurde die Milz mittels Spritzenkolben zur weiteren Verwendung homogenisiert. Vollblut und homogenisierte Milz wurden in einem 50-ml-Greiner-Röhrchen mit *Biocoll separating solution* (Dichte 1,077 g/ml) (Firma BIOCHROM AG, Katalog Nr.: L6115) überschichtet. Das Greiner-Röhrchen wurde für 30 Minuten bei 1400U/min "ohne Bremse" zentrifugiert. (Zentrifuge der Firma BECKMANN Typ: G5-6R). Die mononukleäre Zellfraktion wurde mit einer 1- ml-Pipette abpipettiert und in ein 50-ml-Gefäß gegeben, sowie anschließend mit EBM-2-Medium auf 40 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden danach für 10 Minuten bei 1400U/min "mit Bremse" zentrifugiert und in 2 ml EBM-2 resuspendiert. In einer Neubauerkammer wurden die Zellen gezählt und auf 4×10^6 EPCs in 2 ml EBM-2 durch Verdünnung reguliert. Des Weiteren wurden nun je 2 ml der Suspension in eine Vertiefung einer mit Fibronektin beschichteten 6-*well*-Kulturplatte pipettiert. Die Kulturplatten wurden dann bis zum ersten Mediumwechsel nach 3 Tagen bei 37°C inkubiert.

2.2 Zellmarkierung für EPC-Verteilungsbewertung

Die über 5 Tage angezüchteten Zellen wurden durch Absaugen des Mediums isoliert und mit jeweils 200 µl Trypsin-Lösung für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser kurzen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 500 µl EBM-2-Spülung von der Kulturfläche abgelöst und in einem 50-ml-Greiner-Röhrchen für 10 Minuten bei 1400U/min zentrifugiert.

Der Farbstoff wurde in Ethanol angesetzt. Dazu wurden 50 µg Cell Tracker (*Cell Tracker*® - CM-Dil, Firma INVITROGEN, Katalog Nr.: C700) in 50 µl reinen Ethanols aufgelöst. Die Farbstoff-Ethanollösung wurde mit EBM-2 im auf 1:1000 weiter verdünnt. In 1 ml dieser Lösung wurden die gewonnenen Zellen resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und auf Eis gelegt. Nach 15 Minuten wurde eine erneute Zellzählung in einer Neubauerkammer durchgeführt. Die Suspension wurde mit EBM-2 auf 12 ml aufgefüllt und erneut für 10 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Danach wurde eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen je 50 µl durch Resuspension in EBM-2 erstellt und in die Injektionsspritze für die Operationen aufgezogen. Diese wurde bis zur Injektion abgedunkelt auf Eis gelagert.

2.3 Inkubation mit Ang-1, Ang-2 und Ang-1-Antagonist

Für die eigentliche Zellvorbehandlung wurden die Zellen noch vor der Markierung mit *Cell Tracker*® für jeweils eine Stunde in einem 50-ml-Falcon mit 50 µl Stimulationslösung bei 37°C inkubiert. Die Konzentration von Angiopoetin-1 und -2 (*Recombinant Human Angiopoietin-1*, Firma BIOCAT, Katalog Nr.: 4921-10 und *Recombinant Human Angiopoietin-2*, Firma BIOCAT, Katalog Nr.: 4922-10) in der Stimulationslösung lagen jeweils bei 200 ng/ml (KIM et al. 2000; KOBLIZEK et al. 1998). Für eine Serie von Injektionsexperimenten wurden Angiopoetin-1 (200 ng/ml) und ein Angiopoetin-1 blockierendes Peptid (Ang1 (C-19), Firma SANTA CRUZ, Katalog Nr.: sc-6320) (15 µg/ml) für die Inkubation verwendet. Nach der Inkubation wurde die Lösung abzentrifugiert und mit der Markierung und Zählung wie unter Punkt 2.2 beschrieben fortgeführt.

2.4 Operationstechniken

2.4.1 Einführende Bemerkungen

Es handelt sich bei der Erhebungstechnik der Daten um tierexperimentelle Methoden. Es wurde eine Ausnahmegenehmigung des Landes Niedersachsen zur Durchführung der erforderlichen Tierexperimente erteilt. Im Rahmen dieses Verfahrens überzeugte sich der zuständige Tierschutzbeauftragte, Herr Prof. Jarry, persönlich von der korrekten und gewissenhaften Durchführung der notwendigen Operationen. Grundsätzlich wurden pro Tier im Rahmen des Experiments zwei Operationen im Abstand von 48 Stunden durchgeführt. Bei der ersten Operation wurde der ischämische Schaden an der linken Niere mittels 40-minütigen Verschlusses der Nierengefäße (Nierenarterie und -vene) erzeugt. Nach Reperfusion wurde der entsprechende Versuchs- oder Kontrollstoff in die Vene der rechten Nieren injiziert und diese resiziert. Ziel war dabei die Induktion eines akuten ischämischen Nierenversagens mit gleichzeitiger Injektion von entweder unbehandelten oder vorbehandelten EPCs.

Im Rahmen der zweiten Operation (48 Stunden nach dem ischämischen Schaden) wurden Blut zur Analyse der Nierenfunktion (Serumkreatininwert) sowie die jeweils in den Tieren belassene linke Niere zur weiteren histologischen Auswertung gewonnen bzw. entnommen.

2.4.2 Anästhesie

Das Anästhetikum (Injektionslösung: 6,8 ml 0,9% NaCl + 520 µl eines Narkosegemisches der Firma SIGMA - ALDRICH (10 ml enthalten 800 mg Ketamine HCl und 120 mg Xylazine HCl Katalog Nr.: K-113)) wurde jeweils nach negativer Aspirationskontrolle in die Bauchhöhle der Tiere appliziert. Es wurden durchschnittlich 300-400 µl des Anästhetikums injiziert. Die anästhesierte Maus wurde für 10-15 Minuten zurück in den Käfig gelegt, bis eine tiefe Sedierung vorlag.

2.4.3 Fixierung des Tieres / Operationsvorbereitung

Die analgosedierte Maus wurde aus dem Käfig entnommen und auf einer Styroporplatte mit Klebestreifen fixiert. Die Tiefe von Sedierung und Anästhesie wurde nochmals geprüft. Das Bauchfell wurde mit einer Hautdesinfektionslösung desinfiziert.

2.4.4 Schnitfführung und Darstellung des Operationsfeldes

Der Bauchraum wurde in zwei Schritten eröffnet. Dazu wurde zunächst ein ca 2 cm langer Medianschnitt im Fell angelegt. Im zweiten Schritt wurde die Muskelschicht auf der selben Länge mit einer Schere durchtrennt. Die Wundränder wurden mit sterilen feuchten Tüchern abgedeckt. Nun wurde zuerst die linke Niere mit Hilfe von angefeuchteten Wattestäbchen aufgesucht und die Hilusgefäße in stumpfer Präparationstechnik dargestellt. Zur besseren Darstellung wurden die Darmschlingen auf ein feuchtes Tuch außerhalb der Bauchhöhle gelegt und abgedeckt, um Austrocknung bzw. Dehydration zu vermeiden.

2.4.5 Injektion der Zellen / Ischämie

Die Hilusgefäße wurden unter direkter Sichtkontrolle mit einer Gefäßklammer okkludiert. Die Zeit des Ischämiebeginns wurde notiert. Nach erfolgreicher Positionierung der Klammer wurde die rechte Niere dargestellt. Hierzu wurden die in feuchte Tücher eingeschlagenen Darmschlingen von der rechten auf die linke Seite gelegt. Auch die rechte Niere wurde stumpf mobilisiert und aus ihrem Fettlager komplett gelöst, um eine Nahtschlinge anbringen zu können. Diese sollte dem zeitlich sofortigen proximalen Verschluss der rechten Nierengefäße nach Injektion der Zellen dienen und eine Nachblutung der Punktionsstelle unterbinden. Die Gefäßklammer an der linken Niere wurde genau nach 40 Minuten Ischämiedauer entfernt. Die Ischämie der linken Niere wurde nochmals anhand der Färbung

kontrolliert. Nach beginnender Reperfusion wurde in einem maximalen Zeitintervall von 2 Minuten der entsprechende Bolus von 50 µl in die rechte Nierenvene injiziert. Die Injektion in die Nierenvene entsprach somit einer systemischen Zellapplikation. Die proximal von der Punktionsstelle liegende Ligatur wurde schnellstmöglich geschlossen und mittels mehrfacher Knotung gesichert. Die richtige Punktion konnte durch eine sofortige Blutung nach Entfernung der Injektionskanüle verifiziert werden. Nach Sitzkontrolle wurde die rechte Niere vollständig entfernt (Nephrektomie). Nach Remobilisierung der Darmschlingen in die Bauchhöhle wurde die Bauchdecke verschlossen. Der dichte Verschluss erfolgte zweischichtig in fortlaufender Nahttechnik. Jede Maus wurde nach dem Nahtverschluss mit einem feuchten Tuch gereinigt und in einen frischen Käfig gelegt.

2.4.6 Blut- und Organentnahme nach 48 Stunden

Der Zeitpunkt von 48 Stunden wurde gewählt, da bereits publizierte Voruntersuchungen gezeigt hatten, dass die Serumkreatininkonzentration 48 Stunden nach einer akuten Ischämie am höchsten ist (PATTSCHAN et al. 2010).

Die Anästhesie erfolgte auf gleiche Weise, wie bereits dargestellt. Zusätzlich zum medianen Bauchschnitt wurden laterale Entlastungen subdiaphragmal angelegt. Das schlagende Herz wurde mit einer Insulinspritze transdiaphragmal zur Blutgewinnung punktiert. Es wurde eine maximale Vollblutgewinnung unter schonender Entnahmetechnik angestrebt, um hämolytische Effekte zu minimieren. Das gewonnene Blut wurde bis zur Weiterverarbeitung in Eppendorfgefäße gegeben und bei Zimmertemperatur gelagert. Nach erfolgreicher Blutentnahme erfolgte die Dekapitation der Maus und die Entnahme der linken Niere zur histologischen Auswertung.

2.5 Serumkreatininbestimmung

Das gewonnene Vollblut wurde zeitnah zur Entnahme bei 37°C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert und anschließend für 30-45 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 1.400 U/min für 10 Minuten. Anschließend konnte das Serum abpipettiert werden. Das Serum wurde sofort in Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C tiefgefroren. Die Kreatininbestimmung erfolgte mittels des Kreatinin-Testverfahrens 'LT-SYS' der Firma LABOR UND TECHNIK EBERHARD LEHMANN (Creatinin PAP, enzymatisch, flüssig, Bestellnummer: LT-CR 0101) und einem Photometer (SCHIMADZU Spectrophotometer UV-120-01). Die Reagenzien (Reagenz 1: EHSPT 0,4 mmol/l, Creatinase ≥ 10 kU/l, Sarcosinoxidase $\geq 3,5$ kU/l, Ascorbinatoxidase ≥ 1 kU/l; Reagenz 2: 4-Aminoantipyrin 2,95 mmol/l, Peroxidase ≥ 4 kU/l, Creatininase ≥ 150 kU/l) wurden gebrauchsfertig geliefert.

Für jede Probe, sowie für Standard- und Leerprobe wurden je 600 μ l Reagenz 1 benötigt. Die Serumproben wurden in einem 1,5 ml-Eppendorf mit Aquadest auf 1:5 bis 1:10 verdünnt. Um ein Zielvolumen von 50 μ l zu erreichen, wurden 10 μ l Serum mit 40 μ l destilliertem Wasser auf 50 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden zusammen mit 50 μ l Kreatinin-Standardlösung (Kreatinin 2,00 mg/dl) in einem 1,5 ml-Eppendorf im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Photometer-Küvetten wurden mit den Serumproben und der Standardprobe sowie mit jeweils 600 μ l Reagenz 1 gefüllt. Zusätzlich wurden 600 μ l Reagenz 1 als Leerprobe in eine Küvette eingebracht. Die befüllten Küvetten wurden für 3 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200 μ l Reagenz 2 weiter befüllt und bei 37°C inkubiert.

Die Absorptionsmessung zur Ermittlung des Extinktionswertes E1 wurde 90 Sekunden nach der Zugabe von Reagenz 2 bei 550 nm durchgeführt.

Die Absorptionsmessung zur Ermittlung des Extinktionswertes E2 wurde 120 Sekunden nach der ersten Absorptionsmessung bei 550 nm durchgeführt.

Der Serumkreatininwert errechnete sich aus dem Sollwert des Standards, multipliziert mit dem Quotienten aus der Differenz von E2 und E1 (dE) der Analyse und dE des Standards.

2.6 Dünnschnitte zur histologischen Auswertung

Die entnommenen Nieren wurden zu gleichen Teilen für die konventionelle histologische Beurteilung sowie die Immunfluoreszenzhistologie aufgeteilt.

2.6.1 Konventionelle histologische Beurteilung

Die Organhälften wurden bis zur Paraffineinbettung in, mit Phosphatpuffer (Firma GIBCO, Katalog Nr.: 10010-015), pH Bereich 7,4 +/- 0,05) auf 4% verdünnte Formalinlösung (Formalin (Firma MERCK, Katalog Nr.: 103 999 2500)) gelagert und fixiert.

2.6.1.1 Einbettung in Paraffin

Zunächst erfolgte eine automatisierte Formalinauswaschung (Gewebeinfiltrationsautomat LEICA TP1020) für 10-12 Stunden. Anschließend wurde das Präparat in Xylol dehydriert. Dann wurde das Organ in der Ausgießstation (*Tissue Block Dispenser* PAG 12, MEDITE MEDIZINTECHNIK) in Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte auf ca. 2°C abgekühlt.

2.6.1.2 Schnittherstellung

Geschnitten wurde mit einem 'Autocut Microtom' (LEICA Reichert-Jung 2040 Autocut Microtome) in einer Schnittdicke von 5-7 µm. Der Schnitt wurde mit einem Pinsel abgehoben und bei 50-55°C in ein Wasserbad (NAGEL GMBH Kiel, Meday Typ 24900) gelegt. Nachdem er sich komplett entfaltet hatte, wurde der Schnitt mit einem Objektträger aufgenommen und sofort auf einer Trockenplatte (AP-Thermoplatte) bei 40°C getrocknet.

2.6.1.3 Färbung und histologische Auswertung der Präparate

Die Schnitte wurden nach der PAS-Methode gefärbt. Zuerst erfolgte die Entparaffinierung und Entwässerung mit Xylol und absteigender Alkoholreihe. Gespült wurde mit Aquadest. Danach erfolgte die Einlage in 3%ige Essigsäure für 3 Minuten gefolgt von der ersten Färbung mit Alcianblau für 30 Minuten. Nach kurzer Spülung mit Aquadest folgte eine 5-minütige Wässerung mit Leitungswasser und eine erneute Spülung mit Aquadest. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in frisch angesetzte 1%ige Perjodsäure gegeben und nach Aquadest Spülung für 15 Minuten in Schiffsreagenz getaucht. Es folgten dreimal 2 Minuten Sulfitwasser, 5-10 Minuten kaltes Leitungswasser, Aqua dest., 10 Minuten Hämalaun nach Mayer, Aquadest, Leitungswasser für 10 Minuten, Aquadest, Entwässerung und Eindeckung.

Das Ergebnis war die Einfärbung von sauren MPS in Blau, neutrale MPS in Rosarot und Kerne in Dunkelblau.

Die Alcianblau-Lösung wurde aus 1g Alcianblau 8 GS (wasserlöslich) hergestellt, das in 1000 ml 3%iger Essigsäure gelöst wurde.

Zur Herstellung der Schiff's-Reagenz wurden zuerst Lösungen A und B hergestellt, die dann nach der Mischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur standen. Im Anschluss wurden sie mit 30 g Aktivkohle versetzt, für 15 Minuten geschüttelt und anschließend filtriert. Für Lösung A wurden 5 g Pararosanilin in 150 ml 1-M-HCl gelöst.

Für Lösung B wurden 5 g Natriumdisulfid in 850ml Aqua dem. gelöst.

Nach der oben beschriebenen Färbung wurde der akute tubuläre Schaden semiquantitativ wie folgt separat für die isolierten Parameter ‚Epithelabflachung‘, ‚Epithelnekrose‘, ‚Vakuolierung‘ und ‚Bürstensaumverlust‘ bewertet:

- Grad 0 - keiner
- Grad 1 - minimal
- Grad 2 - moderat
- Grad 3 - schwer.

Schließlich wurde ein Mittelwert aus den einzelnen Parametern berechnet.

2.6.2 Immunfluoreszenzhistologie

2.6.2.1 Schnittherstellung

Die zweiten Organhälften wurde für jeweils 1 Stunde in mit 4%iger Formalinlösung gefüllten Eppendorf-Gefäßen leicht fixiert und dann in 30%iger Saccharose für mindestens 12 Stunden, optimal jedoch für 24 Stunden, bei 5°-7°C aufbewahrt. Anschließend wurden sie sofort in *Tissue Tek*-Einbettmedium (Firma SAKURA OCT, Katalog Nr.: 4583) überführt und bei -80°C tiefgefroren. Die Anfertigung der 5-7 µm dicken Schnitte erfolgte mit einem Gefriermikrotom (Firma LEICA, Jung CM 3000), die Schnitte wurden sodann auf mit Eiweißglycerin (Firma ROTH, Art. Nr.: P04.1) beschichteten Objektträgern platziert. Diese wurden bis zur Färbung und Auswertung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2.2 Immunmarkierung

Zuerst wurden die Objektträger für 30 Minuten in 1%ige PBS-BSA (*Bovine Serum Albumin*, Firma PAA, Katalog Nr.: K41-001) gelegt und anschließend bei Raumluft getrocknet. Zur Fixierung der später aufgebrachten Flüssigkeitsvolumina auf die Schnittpräparate wurden diese mit Nagellack umkreist. Die Inkubation der Schnitte erfolgte mit FITC anti-mouse CD117 (c-kit) (Firma BD, Katalog Nr.: 553354). Dieser Antikörper wurde zuvor mit PBS auf 1:100 verdünnt. Die Inkubationsdauer lag bei 12 Stunden, die Temperatur bei +4°C. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde "DAPI"-Lösung (Firma MIBITEC, Katalog Nr.: D1306) verwendet. Die Objektträger wurden dafür dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit auf 1:50 verdünnter "DAPI"-Lösung für 10 Minuten bei +4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger nochmals dreimalig mit PBS gewaschen und abschließend mit *Fluorescent Mounting Medium* (Firma DAKO, Katalog Nr.: S3023) abgedeckt. Die Lagerung bis zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte bei 4-8°C.

2.6.2.3 Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate

Die Auswertung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung. Es wurden je 10 Gesichtsfelder der Nierenrinde und 5 Gesichtsfelder des Nierenmarks auf die Präsenz von c-Kit+/cell tracker®+ Zellen analysiert. Die Markierung von c-Kit führte zu einer grünen Fluoreszenz der potentiell c-Kit+ Zellen, bei gleichzeitig nachweisbarer roter Fluoreszenz (*Cell Tracker*®) musste von der Präsenz applizierter Zellen (EPCs) im Nierengewebe ausgegangen werden. Die Resultate der Zellzählung wurden als Anzahl in Bezug auf alle Gesichtsfelder wiedergegeben.

2.7 Statistische Auswertung

Der Beurteilung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Tieren der verschiedenen Gruppen diente der Mann-Whitney Test. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ postuliert.

3. Ergebnisse

3.1 Serumkreatininmessungen

3.1.1 Kontrollgruppe

Nach der Blutabnahme wurden die Standardwerte für den Vergleich der Kreatininkonzentration im Blut bestimmt. Der Mittelwert betrug 0,09 mg/dl (SEM 0,022).

3.1.2 Gruppe 1

6 Tiere wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden jeweils 50 µl NaCl in die rechten Nierengefäße injiziert. Entsprechend der Operationstechnik wurden die Tiere sofort einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Der durchschnittliche Kreatininwert lag bei 0,42 mg/dl (SEM 0,098).

3.1.3 Gruppe 2

6 Tiere wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ unbehandelte EPCs suspendiert in 50 µl EBM-2 in die rechten Nierengefäße injiziert. Entsprechend der Operationstechnik wurden die Tiere sofort einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Es sollte gezeigt werden, dass EPCs ohne Vorbehandlung keine nephroprotektiven Eigenschaften besitzen. Der durchschnittliche Kreatininwert lag bei 0,43 mg/dl (SEM 0,065).

3.1.4 Gruppe 3

5 Tiere wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ mit Angiopoetin-1 vorbehandelte EPCs suspendiert in 50 µl EBM-2 in die rechten Nierengefäße injiziert. Entsprechend der Operationstechnik wurden die Tiere sofort einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Es sollten die nephroprotektiven Effekte der vorbehandelten EPCs untersucht werden. Der durchschnittliche Kreatininwert lag bei 0,71 mg/dl (SEM 0,143).

3.1.5 Gruppe 4

5 Tiere wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ mit Angiotensin-2 vorbehandelte EPCs suspendiert in 50 μ l EBM-2 in die rechten Nierengefäße injiziert. Entsprechend der Operationstechnik wurden die Tiere sofort einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Es sollten die nephroprotektiven Effekte der vorbehandelten EPCs untersucht werden. Der durchschnittliche Kreatininwert lag bei 0,46 mg/dl (SEM 0,103).

3.1.6 Gruppe 5

4 Tiere wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ mit antagonistisiertem Angiotensin-1 vorbehandelte EPCs suspendiert in 50 μ l EBM-2 in die rechten Nierengefäße injiziert. Entsprechend der Operationstechnik wurden die Tiere sofort einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Es sollten die nephroprotektiven Effekte der vorbehandelten EPCs untersucht werden. Der durchschnittliche Kreatininwert lag bei 0,19 mg/dl (SEM 0,04)

3.1.7 Tabelle der Ergebnisse

	ohne Ischämie (Kontrolle)	NaCl (Gruppe 1)	$0,5 \times 10^6$ EPCs (Gruppe 2)	$0,5 \times 10^6$ EPCs + Angiotensin-1 (Gruppe 3)	$0,5 \times 10^6$ EPCs + Angiotensin-2 (Gruppe 4)	$0,5 \times 10^6$ EPCs + BP (Gruppe 5)
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Versuchstier						
1	0,09	0,32	0,66	0,8	0,84	0,21
2	0,11	0,18	0,2	0,59	0,26	0,09
3	0,06	0,5	0,54	1,23	0,43	0,18
4	0,03	0,35	0,35	0,39	0,46	0,29
5	0,17	0,29	0,47	0,56	0,29	
6		0,85	0,38			

Tabelle 1: Ergebnisse der Serumkreatininbestimmung

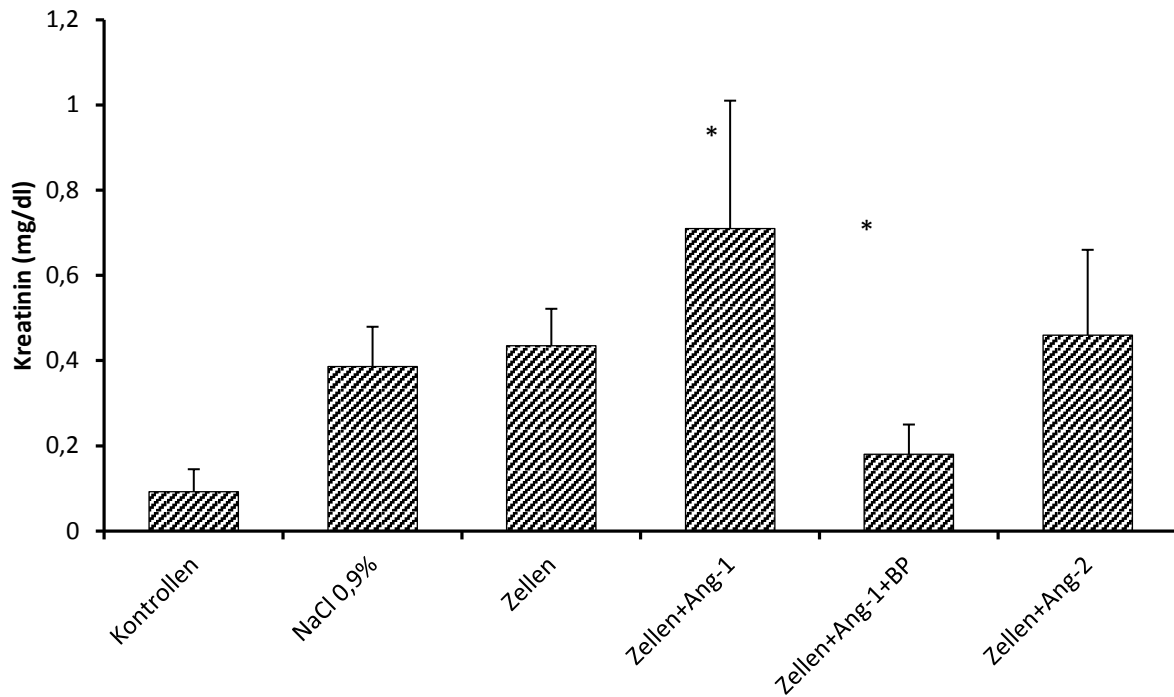


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Versuchs- und Kontrollgruppen (* p-Wert von <0,05) Signifikante Kreatininwertverminderung bei Gruppe 5 (Zellen+Ang-1+BP) und signifikante Kreatininwerterhöhung bei Gruppe 3 (Zellen+Ang-1)

Die Abbildung 1 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Serumkreatininwerten der Gruppen 2, 3 und 5. Beachtlich ist der niedrige Wert für Gruppe 5 (in Abbildung 1: Zellen+Ang-1+BP). Somit zeigte sich eine nephroprotektive Wirkung für Ang-1+Blocking Peptide.

3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Voraussetzung der histologischen Untersuchung der Niere von postischämischen unbehandelten und zellinjizierten Mäusen war die Anfärbung von Gewebeschnitten mittels der PAS-Methode. Folgende Einzelparameter beurteilt (siehe Material und Methoden):

- Abflachung der Tubulusepithelzellen
- Detritus intratubulär (apoptotisches/nekrotisches Zellmaterial im tubulären Lumen)
- Kernverlust/Nekrose der Tubulusepithelzellen
- Vakuolisierung der Tubulusepithelzellen
- Bürstensaumabflachung/-verlust der Tubulusepithelzellen.

Der Schweregrad jedes einzelnen Parameters wurde folgendermaßen graduiert:

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

Die Analyse der Angiopoetin-1-Kohorte ergab signifikante Unterschiede in folgenden Unterkategorien: Detritus, Kernverlust und Vakuolisierung (Abbildungen 2-4). Zudem war der mittlere Gesamtpunktwert in dieser Kohorte erhöht (Abbildung 5). Dabei zeigten Tiere, die Angiopoetin-1-behandelte EPCs erhalten hatten stets einen signifikant stärkeren histologischen Schaden als Tiere, in die unbehandelte Zellen injiziert worden waren. Diese Wirkungen waren nach gleichzeitiger Zellvorbehandlung mit Angiopoetin-1 und einem spezifischen Blockade-Peptid ebenfalls signifikant abgeschwächt, was auf die Spezifität des Effektes hindeutet. Auf eine weitergehende Analyse der Angiopoetin-2-Kohorte wurde verzichtet, zeigten die Tiere doch bereits in der Nierenfunktionsanalyse (Kreatininmessung) keine signifikanten Unterschiede zu postischämischen unbehandelten Kontrollen.

	0,5 x 10 ⁶ EPCs (Gruppe 2)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 (Gruppe 3)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 + BP (Gruppe 5)
Versuchstier			
1	0	2	0
2	0	2	0
3	1	2	1
4	2	1	1
5	2	1	
6	1		

Tabelle 2: Bewertung intratubulärer Detritus in Grad 0-3

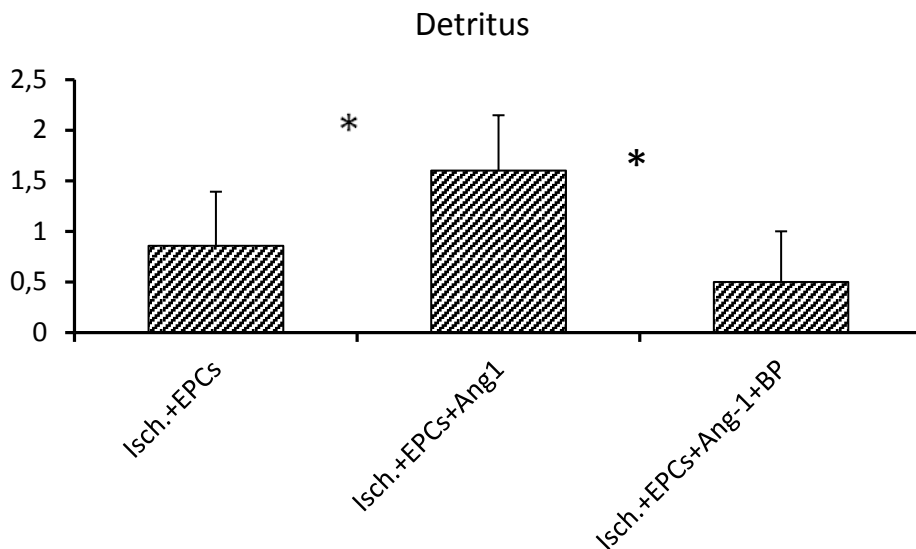


Abbildung 2: Detritus intratubulär (apoptotisches / nekrotisches Zellmaterial im tubulären Lumen); Ergebnisse als Mittelwerte SD, *: $p < 0,05$; Es zeigt sich die signifikante Detritusverminderung der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1+BP (Gruppe 5) gegenüber Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3). Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3) zeigt eine signifikante Detritussteigerung gegenüber der Kontrolle Isch.+EPCs (Gruppe 2).

	0,5 x 10 ⁶ EPCs (Gruppe 2)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 (Gruppe 3)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 + BP (Gruppe 5)
Versuchstier			
1	0	2	0
2	0	2	1
3	0	2	1
4	1	1	1
5	2	1	
6	2		

Tabelle 3: Bewertung Kernverlust in Grad 0-3

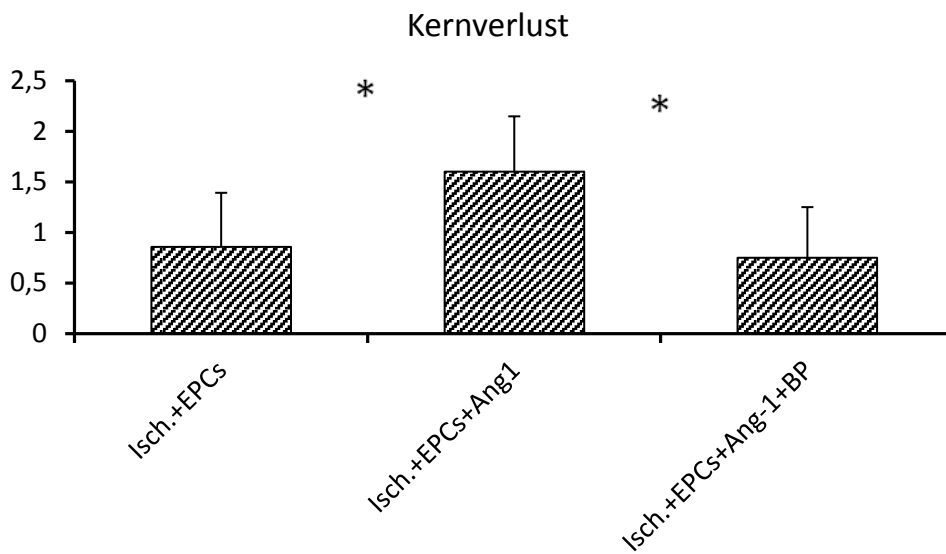


Abbildung 3: Kernverlust; Ergebnisse als Mittelwerte SD, *: $p < 0,05$; Es zeigt sich ein signifikant geringerer Kernverlust in der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1+BP (Gruppe 5) gegenüber Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3). In der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3) ist der Kernverlust signifikant erhöht zur Kontrolle Isch.+EPCs (Gruppe 2).

	0,5 x 10 ⁶ EPCs (Gruppe 2)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 (Gruppe 3)	0,5 x 10 ⁶ EPCs + Angiopoetin-1 + BP (Gruppe 5)
Versuchstier			
1	0	2	1
2	0	2	1
3	2	3	1
4	1	1	1
5	1	1	
6	1		

Tabelle 4: Bewertung Vakuolisierung in Grad 0-3

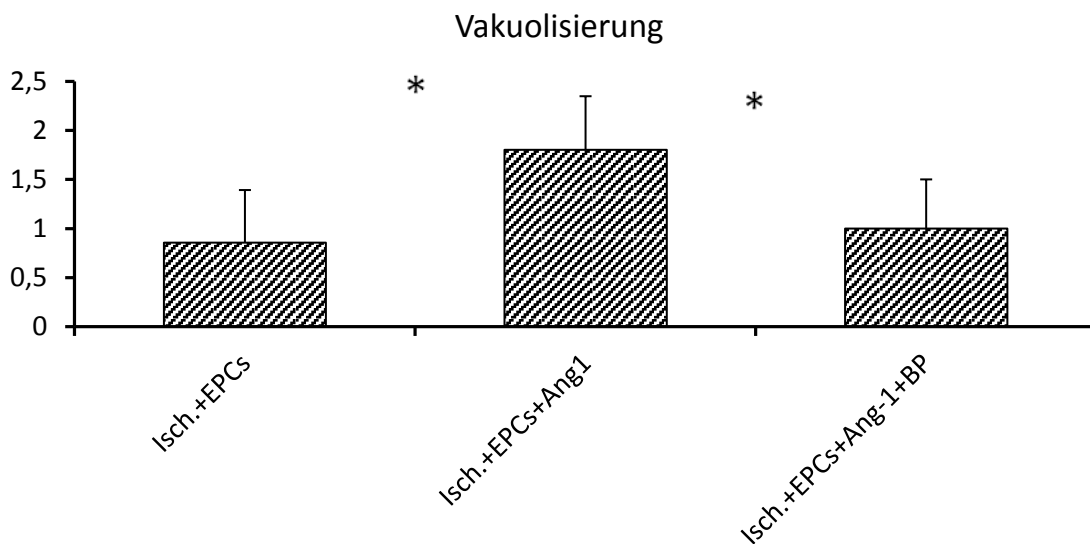


Abbildung 4: Vakuolisierung; Ergebnisse als Mittelwerte SD, *: $p < 0,05$; Es zeigt sich eine signifikante verminderte Vakuolisierung in der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1+BP (Gruppe 5) gegenüber Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3). Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3) zeigt eine signifikante erhöhte Vakuolisierung gegenüber der Kontrolle Isch.+EPCs (Gruppe 2).

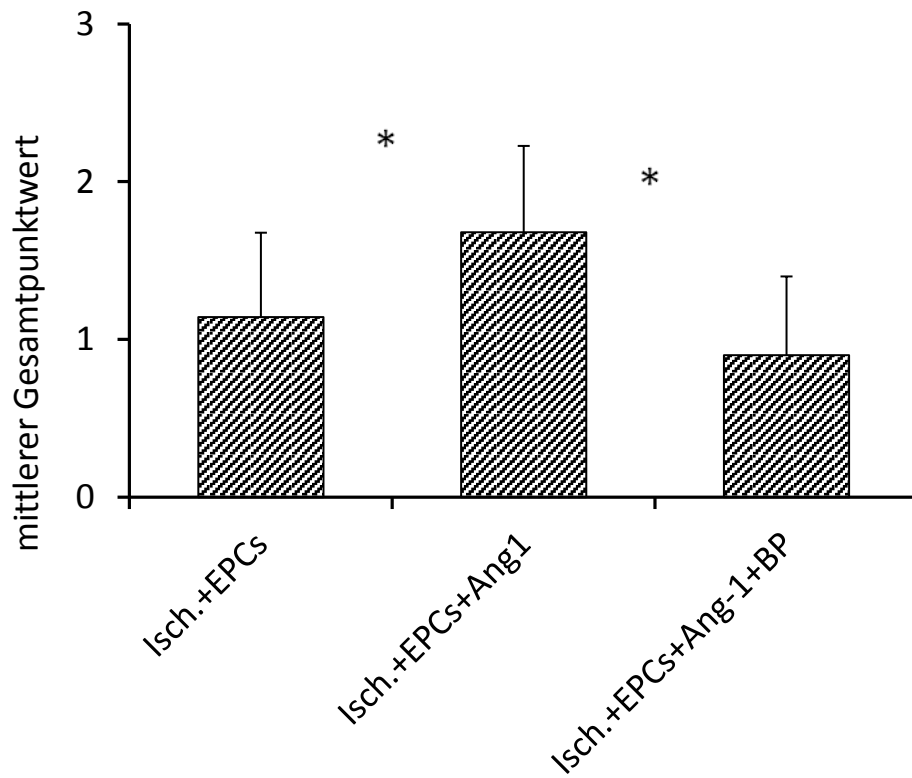


Abbildung 5: mittlerer Gesamtpunktwert, *: $p < 0,05$; Es zeigt sich die signifikante Gesamtpunktverminderung der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1+BP (Gruppe 5) gegenüber der Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3). Gruppe Isch.+EPCs+Ang-1 (Gruppe 3) zeigt eine signifikante Gesamtpunktsteigerung gegenüber der Kontrolle Isch.+EPCs (Gruppe 2)

3.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzhistologie

Achtundvierzig Stunden nach den Operationen ließen sich de facto keine injizierten Zellen in den Nieren der Tiere identifizieren. Dementsprechend wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen jenen Tieren gefunden werden, die unbehandelte Zellen erhalten hatten, und jenen Tieren, welchen mit Ang-1 vorbehandelte EPCs injiziert worden waren.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Strategien zu etablieren mit deren Hilfe das nephroprotektive Potential von so genannten Endothelvorläuferzellen beim akuten ischämischen Nierenversagen verstärkt werden kann. Konkret sollten die möglichen Effekte der Proteine Angiopoetin-1 und -2 auf EPCs im Kontext des ischämischen ANV analysiert werden. Beide Faktoren sind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen für die vaskuläre Regeneration bzw. Homöostase von essentieller Bedeutung. So stabilisiert etwa Angiopoetin-1 den interendothelialen Zell-Zellkontakt durch agonistische Wirkungen auf spezielle endotheliale Zellmembranrezeptoren (VE-Cadherin - *Vascular-Endothelial-Cadherin*) (GAMBLE et al. 2000) Angiopoetin-2 hingegen antagonisiert die Wirkungen von Angiopoetin-1. Bereits 1997 konnte im Mäusemodell gezeigt werden, dass Angiopoetin-2 den endothelialen Zellverband destabilisiert (MAISONPIERRE et al. 1997). In jedem Fall entfalten Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 ihre Effekte nach intrazellulärer Interaktion mit dem endothelialen Faktor Tie-2 (FUKUHARA et al. 2010). Die Proteine scheinen die Aktivität von VEGF und anderen vasomodulierenden Mediatoren in vivo wesentlich zu beeinflussen. Bislang waren die Konsequenzen der Behandlung von EPCs mit Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 vollständig unbekannt. Folgende Ergebnisse wurden erhoben:

- Die alleinige Applikation von $0,5 \times 10^6$ EPCs erzeugt im Mausmodell des akuten ischämischen Nierenversagens keinen signifikanten nephroprotektiven Effekt.
- Die Applikation von $0,5 \times 10^6$ mit Angiopoetin-2-vorbehandelten EPCs geht ebenfalls nicht mit einem signifikanten nephroprotektiven Effekt einher.
- Die systemische Injektion von $0,5 \times 10^6$, mit Angiopoetin-1-vorbehandelten EPCs verschlechtert die Nierenfunktion signifikant.
- Der letztgenannte Effekt lässt sich mit Hilfe eines spezifischen, antagonistischen Peptids (*blocking peptide*) vollständig aufheben.

Insbesondere die Blockierbarkeit der Angiotensin-1-Effekte mit Hilfe eines selektiven Inhibitors deutet auf die Spezifität der, durch dieses Protein induzierten Wirkungen auf EPCs hin.

Histologisch zeigte die Analyse der Angiotensin-1-Kohorte signifikante Unterschiede in folgenden Unterkategorien: Detritus im tubulären Lumen, Kernverlust der tubulären Epithelzellen und Vakuolisierung der Zellen. Zudem lag der mittlere Gesamtpunktwert in der Angiotensin-1-Kohorte deutlich höher, was einen ausgeprägteren histologischen Schaden bedeutet.

Dementsprechend zeigte sich weder unter dem Einfluss von Angiotensin-1 noch Angiotensin-2 eine Zunahme der nephroprotektiven Eigenschaften der EPCs. Erstaunlich war vielmehr die deutliche Verschlechterung der Nierenfunktion zellbehandelter Tiere nach EPC-Inkubation mit Angiotensin-1. Gründe für dieses Phänomen sind bislang noch nicht identifiziert worden. Bedenkt man die spezielle Pathophysiologie des akuten ischämischen Nierenversagens, sollte besonderes Augenmerk den die Nierentubuli umgebenden Blutgefäßen gelten. Eine Verminderung der Nierendurchblutung ist mit funktionellen und im weiteren Verlauf strukturellen Veränderungen nahezu aller Zellen des Organs verbunden. Auf mikrovaskulärer Ebene imponieren Schwellungen der Endothelzellen der peritubulären und glomerulären Blutgefäße (JOHNSTON et al. 1977; SUMMERS et al. 1971). Diese bewirken eine „Verengung“ der Mikrovaskulatur. In der Konsequenz wird die Wiederdurchblutung des Organs inhibiert, auch wenn die eigentliche Ursache des ANV (etwa Blutung mit Blutdruckabfall) bereits behoben wurde (*'no-reflow phenomenon'*). Diese anhaltende Minderdurchblutung beschränkt das Regenerationspotential der Tubulusepithelien und auch des Gefäßendothels selbst. Auf die Steigerung dieses Regenerationspotentials zielt die Anwendung von EPCs ab. Die Wirksamkeit von EPCs im Mausmodell des ischämischen ANV konnte bereits mehrfach belegt werden. So zeigten PATSCHAN et al (2006), dass die Injektion von EPCs in postischämische Empfängermäuse ein ischämisches ANV sicher verhindert. Im weiteren Forschungsverlauf konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass EPC bei unterschiedlichen Schweregraden des ischämischen ANV nephroprotektive Effekte vermittelt (PATSCHAN et al. 2010). Ein ausbleibender nephroprotektiver Effekt stellte sich allerdings unter Gabe konstanter Zellmengen bei Ischämiedauern von mehr als 35 Minuten ein. Dies warf zwingend die Frage nach Maßnahmen auf, mit Hilfe derer das nephroprotektive Potential von EPCs verstärkt werden könnte. Eine solche Steigerung des Potentials konnte etwa für die Substanz

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (EPAC-1 Ac) belegt werden. Der Effekt von EPAC-1 Ac beruhte auf der vermehrten Expression so genannter Beta-1-Integrine auf den mit EPAC-1 Ac behandelten Zellen (PATTSCHAN et al. 2010). Da Beta-1-Integrine für das 'homing' von Leukozyten, also die Einwanderung in entzündliches Gewebe verantwortlich sind, wurde angenommen, dass über diesen Aktivierungsweg auch die nephroprotektiven Wirkungen der EPCs verstärkt würden. Als Bestätigung wurde der vermehrte Nachweis von EPCs in der postischämischen Niere gewertet. Auf der Suche nach weiteren möglichen Stoffen zur Wirkverstärkung bzw. zur Migrationssteigerung der EPCs wurden Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 als mögliche Kandidaten untersucht.

Da Angiopoetin-1 im Mäusemodell in vivo den Blut- und Lymphgefäßumbau sowie die Wundheilung anregt und die Apoptoserate von Endothelzellen minimiert (BRINDLE et al. 2006), wurde auch ein positiver Effekt auf EPCs vermutet. Die letztgenannte Wirkung von Angiopoetin-1 wird der Erhöhung der Transkriptionsrate von *Egr-1* (*Early growth response 1*) zugeschrieben. Zusammen mit VEGF kommt es zu einer synergistischen Wirkung auf *Egr-1* und damit zur Migration, Proliferation und Formation von Endothelzellen (ABDEL-MALAK et al. 2009). Unsere Ergebnisse zeigten allerdings keine Verbesserung, sondern eine merkliche Verschlechterung der Nierenfunktion von Mäusen, die Angiopoetin-1 behandelte EPCs erhalten hatten. Eine Zellvorbehandlung mit Angiopoetin-2 blieb ohne Effekt, zumindest in einer Konzentration von 200 ng/ml. Die für diese überraschenden Resultate verantwortlichen Mechanismen lassen sich derzeit nur mutmaßen. Festzuhalten wäre zunächst, dass die Angiopoetin-1-Wirkungen spezifisch sind, lassen sie sich doch mit Hilfe eines blockierenden Peptids vollständig aufheben. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass EPCs vorzugsweise über indirekte Mechanismen gefäßreparativ wirken. Dabei bilden die Zellen diverse proangiogene Substanzen (VEGF, HGF, IGF-1), welche eine funktionelle und strukturelle Erholung ischämiegeschädigter mikrovaskulärer Endothelzellen beschleunigen (HUMPERT et al. 2008; IWABAYASHI et al. 2012; WAKUI et al. 2006). Dementsprechend wäre etwa denkbar, dass EPCs unter dem Einfluss von Angiopoetin-1 nicht nur in geringerem Ausmaß proangiogene Mediatoren synthetisieren und freisetzen, sondern möglicherweise auch vaso- bzw. tubuluszelldeletäre Substanzen bilden (IL-6, TGF- β). Diese könnten eine weitergehende Nierenfunktionsverschlechterung vermitteln. Diese Hypothese wird derzeit in weiterführenden Untersuchungen geprüft. Zweitens wäre es prinzipiell denkbar, dass Angiopoetin-1 Einfluss auf das 'homing' der Zellen nimmt. Dies würde bedeuten, dass die Intensität der Einwanderung von EPCs ins postischämische Gewebe unter Einfluss von

Angiopoetin-1 zunimmt. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch keine Unterschiede in den intrarenalen Mengen applizierter Zellen. Es sei allerdings angemerkt, dass die Tiere in dieser Arbeit stets 48 Stunden nach den Zellinjektionen untersucht wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass etwa unmittelbar nach den Injektionen Unterschiede in den intrarenalen Zellmengen bestehen könnten. Es ist zudem möglich, dass Angiopoetin-1-behandelte EPCs im frühen Verlauf nach Injektion vorzugsweise im Gefäßstromgebiet verbleiben und dort direkt die Wiederdurchblutung hemmen. Auch im Hinblick auf diese Fragestellung sind derzeit weiterführende Untersuchungen in der Planung.

In jedem Fall führt die Arbeit einen wichtigen Umstand vor Augen: zellbasierte Therapien zur Behandlung ischämischer Erkrankungen, insbesondere zur Behandlung des akuten ischämischen Nierenversagens sind potentiell gefährlich. In den vergangenen Jahren sind insbesondere EPCs im Rahmen unterschiedlicher ischämischer Krankheitsbilder mit wechselndem Erfolg eingesetzt worden. So konnte beim ischämischen Schlaganfall durch die Transplantation von EPCs das Infarktvolume n signifikant verkleinert werden. Bereits 24 Stunden nach Injektion von 10^6 EPCs konnten diese im Hirngewebe nachgewiesen werden, was mit einer merklichen EPC-vermittelten Neuroprotektion verbunden war (FAN et al. 2010). Auch im pAVK-Modell wurden die Zellen erfolgreich eingesetzt (KALKA et al. 2000). In klinischen Studien an pAVK-Patienten zeigte sich eine Vergrößerung des schmerzfreien Laufintervalls, sowie eine stimulierte Ausbildung kollateraler Gefäße (KAWAMURA et al. 2006; TATEISHI-YUYAMA et al. 2002). Bei mehreren Studien zum Themenkomplex des Herzinfarktes wurde nach intramyokardialer EPC Injektion eine signifikante Funktionsverbesserung gegenüber der Kontrollgruppe, sowie eine niedrigere Apoptoserate festgestellt (HONG et al. 2011; SCHUH et al. 2008; SEN et al. 2010). Eine Erweiterung des therapeutischen Arsenal s ist bei Erkrankungen, die sich letztlich als Folge der Arteriosklerose manifestieren, auch äußerst wünschenswert. Allerdings sollte der unkritische Einsatz von vermeintlich oder tatsächlich ischämieprotektiv wirkenden Zellen unterbleiben. Die Effekte von Angiopoetin-1 zeigen, dass etwaige Konsequenzen von Zelltherapien unter in-vivo-Bedingungen noch kaum adäquat abschätzbar sind. Bevor also EPCs beim ANV des Menschen Anwendung finden können, müssen die komplexen Mechanismen der EPC-vermittelten Vasoprotektion noch wesentlich genauer verstanden bzw. vorhersagbar werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Suche nach verstärkenden Substanzen, die die nephroprotektive Wirkung der EPCs auf Ischämiedauern von 40 Minuten ausdehnen. Als potentielle verstärkende Substanzen wurden die beiden Tie-2-modulierenden Angiopoetine-1 und -2 ausgewählt. Im Mäusemodell wurde durch Okklusion des rechten Nierenhilus für 40 Minuten bei gleichzeitiger kontralateraler Nephrektomie ein ischämisches ANV erzeugt. Die syngen gewonnenen und in vitro kultivierten EPCs wurden auf $0,5 \times 10^6$ EPCs in 50 μ l EBM-2 ausgezählt und vor der Transplantation mit den Testsubstanzen inkubiert. Für Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 wurde eine Konzentration von 200 ng/ml gewählt, für das Ang-1-Blocking-Peptide 15 μ g/ml. Untersucht wurden die Kreatinkonzentrationen 48 Stunden postOP, sowie histologische und immunfluoreszenzhistologische Schnitte der geschädigten Nieren.

Es wurden 5 Gruppen analysiert: Kontrolltiere (Gabe von NaCl), $0,5 \times 10^6$ unbehandelte EPCs, $0,5 \times 10^6$ Angiopoetin-1-vorbehandelte EPCs, $0,5 \times 10^6$ Angiopoetin-2-vorbehandelte EPCs und $0,5 \times 10^6$ EPCs, behandelt mit Angiopoetin-1 und einem spezifischen Inhibitor.

Die Injektion von $0,5 \times 10^6$ nicht vorbehandelten EPCs führte, wie erwartet, nicht zu einer signifikanten Nephroprotektion. Eine alleinige Vorbehandlung mit Angiopoetin-1 führte hingegen zu einer deutlichen Verschlechterung der Serumkreatinwerte sowie einem Anstieg des histologischen Schadens. Die letztgenannten Effekte ließen sich mit Hilfe eines spezifischen Antagonisten vollständig aufheben. Angiopoetin-2 entfaltete im ausgewählten Modell weder protektive noch deletäre Effekte.

Ein neues Verfahren zur Verstärkung der nephroprotektiven Wirkung von syngen transplantierten und in vitro kultivierten EPCs konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Hingegen zeigte sich, dass Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 (in den gewählten Konzentrationen) als Verstärkersubstanzen nutzlos bzw. im Falle von Angiopoetin-1 nachweislich kontraproduktiv für die Wiederherstellung der Nierenfunktion sind. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind noch zu identifizieren. In jedem Fall muss jedoch genau abgewogen werden, unter welchen Bedingungen EPCs beim akuten ischämischen Nierenversagen des Menschen zukünftig zum Einsatz kommen könnten.

6. Anhang

6.1 Tabellen 5 und 6

Stoff	Herstellerfirma	Katalognummer	Verwendung
Ketamine / Xylazine	SIGMA - ALDRICH	K-113	<i>Anästhesie</i>
Heparin	RATIOPHARM	N21086.21-Z04	<i>Hemmung der Blutgerinnung bei Zellisolation</i>
EBM-2 Medium	LONZA	CC-3156	<i>Verschiedenes</i>
Biocoll	BIOCHROM AG	L-6115	<i>Dichtentrennung der EPCs aus Vollblut und Milz</i>
Fibronectin	SIGMA - ALDRICH	F0895 - 1MG	<i>Kultivierung der Zellen</i>
CM Dil Zelltracker	INVITROGEN	C7000	<i>Markierung der Zellen</i>
Angiopoetin-1	BIOCAT	4921-10	<i>Stimulierung der Zellen</i>
Angiopoetin-2	BIOCAT	4922-10	<i>Stimulierung der Zellen</i>
Blocking-Pepdite Ang-1 (C19)	SANTA CRUZ	SC 6320	<i>Blocking Peptide von Angiopoetin-1</i>
Formalin	MERCK	103 999 2500	<i>Fixierung der Organe</i>
Phosphatpuffer	GIBCO	10010-015	<i>Verdünnung und Waschung</i>
Tissue Tek	SAKURA OCT	4583	<i>Fixieren der Organe für Kryoschnitte</i>
Eiweißglycerin	ROTH	P049.1	<i>Vorbehandlung der Objektträger für Kryoschnitte</i>
Bovine Serum Albumin	PAA	K41-001	<i>Vorbehandlung der Kryoschnitte</i>
FITC anti-mouse CD117 / c-kit	BD	553354	<i>Antikörper zur Markierung der EPCs in Kryoschnitten</i>
Fluorescent Mounting Medium	DAKO	S3023	<i>Eindeckung der Kryoschnitte</i>
Creatinin PAP	TECHNIK EBERHARD LEHMANN	LT-CR 0101	<i>Kreatininbestimmung im Serum</i>

Tabelle 5: Liste der verwendeten Reagenzien mit Angabe von Firma und Katalognummer

Gerät	Firma	Verwendung
Schere klein (14568-12)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Schere groß (14502-14)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Pinzette groß (11008-15)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Pinzette chirurgisch (11023-14)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Pinzette klein Stahl 10cm 0,8mm (11050-10)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Nadelhalter Matthieu 14cm (12510-14)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Clipapplikator (18057-14)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Clip 6mm (18055-03)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Operation</i>
Instrumentenbox (20311-21)	FINE SCIENCE TOOLS	<i>Aufbewahrung der Instrumente</i>
Naht atraumatisch (Nr. 100 6830)	HENRY SCHEIN	<i>Operation (Nähen der Wunde)</i>
Insulinspritze, Safety Glide (Nr. 305930)	BD	<i>Operation (Injektion der Zellen bzw. Kochsalzlösung)</i>
Spectrophotometer (UV-120-01)	SCHIMADZU	<i>Kreatininbestimmung</i>
Pipette (0,5 - 10 µl)	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Pipettierspitzen für 0,5 - 10 µl Pipette	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Pipette (10 - 100 µl)	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Pipettierspitzen für 10 - 100 µl Pipette	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Pipette (100 - 1000 µl)	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Pipettierspitzen für 100 - 1000 µl Pipette	EPPENDORF	<i>Laborarbeiten</i>
Zentrifuge (G5-6R)	BECKMANN	<i>Zellisolation</i>
Photometerreader	TECA SPECTRA	<i>ELISA Auswertung</i>

Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten Instrumente/Geräte

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ergebnisse der Serumkreatininbestimmung	S. 24
Tabelle 2:	Bewertung intratubulärer Detritus in Grad 0-3	S. 27
Tabelle 3:	Bewertung Kernverlust in Grad 0-3	S. 28
Tabelle 4:	Bewertung Vakuolisierung in Grad 0-3	S. 29
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Reagenzien mit Angabe von Firma und Katalognummer	S. 37
Tabelle 6:	Zusammenfassung der verwendeten Instrumente/Geräte	S. 38

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grafische Darstellung der Versuchs- und Kontrollgruppen	S. 25
Abbildung 2:	Detritus intratubulär (apoptotisches/nekrotisches Zellmaterial im tubulären Lumen)	S. 27
Abbildung 3:	Kernverlust	S. 28
Abbildung 4:	Vakuolisierung	S. 29
Abbildung 5:	mittlerer Gesamtpunktwert	S. 30

7. Literatur

Abdel-Malak NA, Mofarrahi M, Mayaki D, Khachigian LM, Hussain SNA (2009): Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration, and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 209-216

Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R (2004): Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 684-690

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967

Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH (2004): Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103, 13-19

Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum NE, Newman PJ, Albelda SM (1994): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120, 2539-2553

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003): Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776

Brindle NPJ, Saharinen P, Alitalo K (2006): Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 98, 1014-1023

Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA (2007): Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 35, 1109-1118

Chen-Konak L, Guetta-Shubin Y, Yahav H, Shay-Salit A, Zilberman M, Binah O, Resnick N (2003): Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells. *FASEB J* 17, 2121-2123

Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, Liu J, Chen Y, Su H, Young WL, Yang GY (2010): Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol* 67(4), 488-97.

Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N (2010): Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol* 25, 387-396

Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW (2002): Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8, 607-612

Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA (2000): Angiopoietin-1 Is an Antipermeability and Anti-Inflammatory Agent In Vitro and Targets Cell Junctions. *Circ Res* 87, 603-607

Hansen TM, Singh H, Tahir TA, Brindle NPJ (2010): Effects of angiopoietins-1 and -2 on the receptor tyrosine kinase Tie2 are differentially regulated at the endothelial cell surface. *Cell Signal* 22, 527-532

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R., Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102, 1340-1346

Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K (2004): Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* 109, 2454-2461

Hong SJ, Kihlken J, Choi SC, March KL, Lim D-S (2011): Intramyocardial transplantation of human adipose-derived stromal cell and endothelial progenitor cell mixture was not superior to individual cell type transplantation in improving left ventricular function in rats with myocardial infarction. *Int J Cardiol* [Epub ahead of print]

Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U, Oikonomou D, Seregin Y, Laine K, Eckstein V, Nawroth PP, Bierhaus A (2008): Insulin Stimulates the Clonogenic Potential of Angiogenic Endothelial Progenitor Cells by IGF-1 Receptor-Dependent Signaling. *Mol Med* 14, 301-308

Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC (2005): Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106, 1525-1531

Iwabayashi M, Taniyama Y, Sanada F, Azuma J, Iekushi K, Okayama K, Chatterjee A, Rakugi H, Morishita R (2012): Inhibition of Lp(a)-induced Functional Impairment of Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells by Hepatocyte Growth Factor. *Biochem Biophys Res Commun* 423, 79-84

Johnston WH, Latta H (1977): Glomerular mesangial and endothelial cell swelling following temporary renal ischemia and its role in the no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 89, 153-166

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427

Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H, Iida J, Sakata H, Onodera K, Tamaki T, Furui H, Kukita K, Meguro J, Yonekawa M, Tanaka S (2006): Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs* 9, 226-233

Khakoo AY, Finkel T (2005): Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 56, 79-101

Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY (2000): Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 86, 952-959

Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W (1998): Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 8, 529-532

- Kribben A, Herget-Rosenthal S, Pietruck F, Philipp T (2003): [Acute renal failure--an review]. *Dtsch Med Wochenschr* 128, 1231-1236
- Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng YG, Bucknall CA, Redwood SR, Pearson JD, Marber MS (2004): Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation* 109, 2986-2992
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105, 71-77
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60
- Marron MB, Singh H, Tahir TA, Kavumkal J, Kim H-Z, Koh GY, Brindle NPJ (2007): Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 282, 30509-30517
- Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS (2006): Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F176-185
- Patschan D, Patschan S, Wessels JT, Becker JU, David S, Henze E, Goligorsky MS, Müller GA (2010). Epac-1 activator 8-O-cAMP augments renoprotective effects of syngeneic [corrected] murine EPCs in acute ischemic kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F78-85
- Patschan D, Patschan S, Müller GA (2012): Microvasculopathy in ischemic acute kidney injury: consequences and therapeutic implications. *Panminerva Med* 54, 45-52
- Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L (2004): Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109, 656-663
- Rafii S, Lyden D (2003): Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9, 702-712

Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003): Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.

Circulation 107, 1164-1169

Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, Cosmi L, Maggi L, Lasagni L, Scheffold A, Kruger M, Dimmeler S, Marra F, Gensini G, Maggi E, Romagnani S (2005): CD14⁺CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 97, 314-322

Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van't Wout K, Martens AC, Goldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Gröne H-J, Rabelink TJ, Verhaar MC (2003): Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis.

Am J Pathol 163, 553-562

Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C (2008): Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol* 103, 69-77

Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itescu S (2004): Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H525-532

Sen S, Merchan J, Dean J, Li M, Gavin M, Silver M, Tkebuchava T, Yoon Y, Rasko JEJ, Aikawa R (2010): Autologous transplantation of endothelial progenitor cells genetically modified by adeno-associated viral vector delivering insulin-like growth factor-1 gene after myocardial infarction. *Hum Gene Ther* 21, 1327-1334

Summers WK, Jamison RL (1971): The no reflow phenomenon in renal ischemia.

Lab Invest 25, 635-643

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T (2002): Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435

Urbich C, Dimmeler S (2004a): Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353

Urbich C, Dimmeler S (2004b): Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 14, 318-322

Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, Hano H, Endou H, Kanai Y (2006): Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest* 86, 1172-1184

Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F, Goligorsky MS (2002): Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F1150-1155

Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA (2007): Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109, 1801-1809

Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM (2009): Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 29, 2011-2022

Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. D. Patschan, Oberarzt der Abteilung für Nephrologie & Rheumatologie des Universitätsklinikums Göttingen, für die Vergabe dieses spannenden Forschungsthemas und die überragende Betreuung bei der Umsetzung der Doktorarbeit aussprechen.

Des Weiteren möchte ich der Dipl. Biologin Frau Elvira Henze für die umfangreiche Betreuung und Hilfe im Labor danken.

Vielen Dank an die MTA Frau Annika Krüger für die Unterstützung bei Zellisolation, Kultivierung und Färbung.

Ich danke allen helfenden Händen des Uniklinikums Göttingen, in Labor und Tierstall, die die Umsetzung des Projektes erst ermöglicht haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mitdoktoranden und Kollegen Axel Hildebrandt für die konstruktive und immer erheiternde Zusammenarbeit danken.