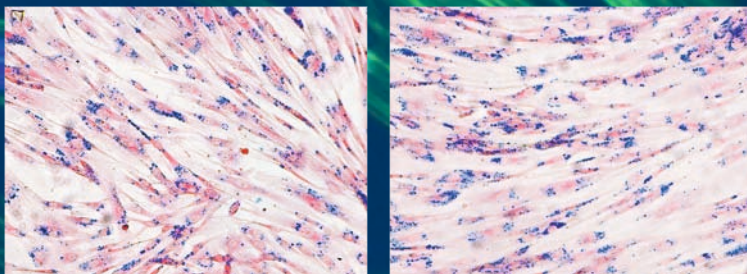


# Untersuchung zum Wachstums- und Signalverhalten von kaninen mesenchymalen Stammzellen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung im MRT

---

Małgorzata Anna Kofecka



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere – Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer:

PD Dr. Martin Schmidt

**Untersuchung zum Wachstums- und  
Signalverhalten von kaninen mesenchymalen Stammzellen nach  
Endorem<sup>®</sup>-Markierung im MRT**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Małgorzata Anna Kolečka

Tierärztin aus Warschau

I kgEgp"2014

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Dr. habil. Martin Schmidt

Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Tag der Disputation: 17.04.2014

**Meinen Eltern,  
meiner Schwester und meinem Bruder**

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen, die ich in der Dissertation angegeben habe, angefertigt. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen, habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Małgorzata Anna Kolečka

# Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis.....   | I   |
| Abkürzungsverzeichnis.....  | III |
| 1 Einleitung .....  | 1   |
| 2 Literaturübersicht .....  | 2   |
| 2.1 Stammzellen .....   | 2   |
| 2.1.1 Geschichte der Stammzellen .....  | 2   |
| 2.1.2 Einteilung der Stammzellen .....  | 2   |
| 2.1.3 Stammzelltherapie: Art der Stammzellen und Applikation .....  | 7   |
| 2.1.4 Allgemeiner Einsatz von Stammzellen in der Neurologie.....  | 10  |
| 2.1.5 Weiterer Einsatz von mesenchymalen Zellen in der Human- und Veterinärmedizin.....                                     | 12  |
| 2.2 Molekulare Bildgebung .....   | 14  |
| 2.2.1 Magnetresonanztomographie .....   | 15  |
| 2.2.2 Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie .....   | 21  |
| 2.2.3 Labeling (Markierung) von Stammzellen.....  | 24  |
| 2.3 Zielsetzung der Studie .....  | 28  |
| 3 Material und Methoden .....   | 30  |
| 3.1 Material .....  | 30  |
| 3.1.1 Liste der Chemikalien .....   | 30  |
| 3.1.2 Liste der Materialien und Geräte .....  | 32  |
| 3.2 Methoden.....   | 33  |
| 3.2.1 Gewinnung der Stammzellen aus kaninem Fettgewebe .....  | 33  |
| 3.2.2 Inkubation von Stammzellen .....  | 34  |
| 3.2.3 Ablösen von Stammzellen von dem Flaschenboden .....   | 34  |
| 3.2.4 Zählen von Stammzellen .....  | 35  |
| 3.2.5 In vitro Untersuchung.....  | 35  |
| 3.2.6 MRT Untersuchung .....  | 49  |
| 3.2.7 Statistische Auswertung .....   | 52  |
| 4 Ergebnisse .....  | 53  |
| 4.1 Kultivierung der kaninen Stammzellen .....  | 53  |
| 4.2 Untersuchung der Aufnahme des Endorems <sup>®</sup> durch die kaninen Stammzellen mittels<br>Berliner Blau Färbung..... | 53  |
| 4.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....  | 56  |
| 4.4 Untersuchung des Endorem <sup>®</sup> -Einflusses auf das Zytoskelett.....  | 60  |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.5   | Bestimmung des prozentuellen Anteils der markierten und nicht markierten Zellen nach 1, 2 und 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung mittels MACS-Untersuchung ..... | 62  |
| 4.6   | Untersuchung der Multipotenz der mit Endorem <sup>®</sup> -markierten kaninenn ASCs anhand des adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotenzials .....      | 64  |
| 4.6.1 | Chondrogene Differenzierung .....  | 64  |
| 4.6.2 | Adipogene Differenzierung .....  | 66  |
| 4.6.3 | Osteogene Differenzierung.....   | 68  |
| 4.7   | MTT-Test .....   | 70  |
| 4.8   | MRT-Untersuchung .....   | 72  |
| 5     | Diskussion .....   | 91  |
| 5.1   | Isolierung der Stammzellen aus dem Fettgewebe .....  | 91  |
| 5.2   | Endorem <sup>®</sup> -Aufnahme durch ASCs und Markierungseffizienz .....   | 91  |
| 5.3   | Einfluss von Endorem <sup>®</sup> auf das Zytoskelett .....  | 94  |
| 5.4   | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Untersuchung der Eisenpartikel-verteilung in der Zelle .....   | 95  |
| 5.5   | Untersuchung der Multipotenz der mit Endorem <sup>®</sup> -markierten Zellen .....   | 96  |
| 5.5.1 | Adipogene Differenzierung .....  | 97  |
| 5.5.2 | Osteogene Differenzierung.....   | 97  |
| 5.5.3 | Chondrogene Differenzierung .....  | 98  |
| 5.6   | Untersuchung des Einflusses von Endorem <sup>®</sup> -Markierung auf Überlebensfähigkeit der Zellen mittels MTT-Test .....   | 99  |
| 5.6.1 | MRT-Untersuchung .....   | 101 |
| 5.7   | Schlussfolgerungen und Ausblick .....  | 105 |
| 6     | Zusammenfassung .....  | 109 |
| 7     | Summary .....  | 111 |
| 8     | Literaturverzeichnis.....  | 113 |
| 9     | Abbildungsverzeichnis .....  | 135 |
| 10    | Tabellenverzeichnis.....   | 140 |
| 11    | Danksagung .....   | 141 |



**Abkürzungsverzeichnis**

|                 |  |
|-----------------|--|
| ASCs            | Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (adipose-derived stromal cells)      |
| BMSCs           | Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (bone-marrow-derived stromal cells) |
| BSA             | Bovines Serum Albumin  |
| C               | Celsius  |
| ca.             | circa  |
| CD              | Cluster of Differentiation / „Unterscheidungsgruppen“                            |
| cm <sup>2</sup> | Zentimeter   |
| d. h.           | das heißt  |
| DMEM            | Dullbecco`s Modified Eagle Medium  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat   |
| ESCs            | Embryonal Stem Cells / embryonale Stammzellen                                    |
| et al.          | et alii  |
| Fe              | Eisen  |
| FBS             | Fetales Bovines Serum  |
| FOV             | Field of View  |
| g               | Erdbeschleunigung  |
| g               | Gramm  |
| GRMD            | Golden Retriever Muscle Dystrophie   |
| H <sup>+</sup>  | Wasserstoffproton  |
| HCl             | Chlorwasserstoffsäure  |
| Hd              | Hund   |
| hMSCs           | human Mesenchymal Stem Cells / humane mesenchymale Stammzellen                   |

|       |   |
|-------|---|
| IBMX  | 3-isobutyl-1-methylxanthine                                       |
| KM    | Kontrastmittel  |
| m     | Meter   |
| M     | molar   |
| MHC   | Major Histocompatibility Complex                                  |
| MHz   | Megahertz   |
| ml    | Milliliter  |
| MPIO  | Mikron-Sized Iron Oxide   |
| MRT   | Magnetresonanztomographie   |
| ms    | Millisekunde  |
| MSCs  | Mesenchymale Stammzellen  |
| MTT   | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid        |
| nm    | Nanometer   |
| Nr    | Nummer  |
| OECs  | Olfactory Ensheathing Cells                                       |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction   |
| P/S   | Penicillin / Streptomycin   |
| PBS   | Phosphate Buffered Saline   |
| RES   | Retikulo-Endothelialer System                                     |
| s     | Sekunde   |
| s. o. | siehe oben  |
| SPIO  | Superparamagnetic Iron-Oxide / Superparamagnetsiche Eisenpartikel |
| SVF   | Stromal Vascular Fraction   |
| T     | Tesla   |
| TE    | Time of Echo  |

|        |   |
|--------|---|
| TEM    | Transmissionselektronenmikroskopie  |
| Thk    | Thickness   |
| TR     | Repetitionszeit   |
| T2 FFE | T2 Fast Field Echo  |
| T2 TSE | T2 Turbo Spin Echo  |
| u. a.  | unter anderem   |
| USPIO  | Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide   |
| µm     | Mikrometer  |
| WST    | <i>water soluble terazolium</i>   |
| XTT    | 2, 3-bis (2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino) carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide) |
| z. B.  | zum Beispiel  |
| ZNS    | Zentralnervensystem   |

**Sonderzeichen:**

|    |              |
|----|--------------|
| °  | Grad         |
| °C | Grad Celsius |
| %  | Prozent      |
| &  | und          |



# 1 Einleitung

Die Regeneration von biologischen Geweben, insbesondere von Nervengewebe, ist auch mit den Mitteln der modernen Medizin nur sehr eingeschränkt möglich. Aus diesem Grund wird in der Biomedizin intensiv an der Ausweitung der Möglichkeiten zur reparativen Zelltherapien geforscht. Untersuchungen an embryonalen Stammzellen werden aufgrund moralischer Bedenken und der Angst vor möglichen Gefahren in der Humanmedizin mit großer Vorsicht begegnet. Sie erfüllen derzeit noch nicht alle Kriterien der Vermehrbarkeit, Entwicklungsfähigkeit, Gewebeverträglichkeit nach Transplantation und vor allen Dingen ethischer Unbedenklichkeit bei ihrer Gewinnung. Adulte Stammzellen dienen im erwachsenen Organismus der Regeneration spezifischer Gewebe. Sie verfügen noch über ein hohes Maß an Plastizität und können sich unter bestimmten Bedingungen in verschiedene Arten von Gewebe differenzieren. Als noch relativ junges Forschungsgebiet hat sich die gezielte Erzeugung und der Einsatz von Geweben auf der Basis von Stammzellen („Tissue Engineering“) als Teilgebiet der regenerativen Medizin in den letzten Jahren zu einer Disziplin mit enormem Potenzial entwickelt.

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) bieten aus mehreren Gründen einen vielversprechenden Ansatz für die reparative Zelltherapie. Sie sind vielseitig differenzierbar und im Vergleich zu anderen adulten Stammzellen einfach zu gewinnen. Vor dem Einsatz solcher Zellen, müssen der zu erwartende Erfolg und die möglichen Risiken für den lebenden Organismus einschätzbar sein. Hierbei existieren wichtige Fragestellungen hinsichtlich der Auffindung, Einwanderung und des Überlebens der Zellen im Wirtsorganismus.

Eine Möglichkeit Stammzellen nach einer Implantation in einem Organismus auf nicht invasive Art und Weise zu beobachten stellt eine Untersuchung mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) dar. Zur Darstellung der Stammzellen mittels MRT müssen diese mit einem MRT-Kontrastmittel markiert werden. Hierbei ist bisher nur unzureichend geklärt, ob eine Markierung mit MRT-Kontrastmittel zu einer Beeinflussung der Funktion, Migration oder des Differenzierungspotenzials der MSCs führt. In dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Dosis Kontrastmittel einerseits die Markierung der Zellen erhält und darüber hinaus die ungestörte Funktion der MSCs ermöglicht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Stammzellen**

#### **2.1.1 Geschichte der Stammzellen**

Die erste Beschreibung der Entwicklung vom Knochengewebe aus isolierten Zellen des Knochenmarks erfolgt bereits 1869 von GOUJON. Er zeigt, dass Knochentransplantate in einem anderen Gewebe eine Knochenneubildung aufweisen. Im Jahr 1906 postuliert MAXIMOV die Existenz von adulten multipotenten Stammzellen, die in die Hämatopoese involviert sind. TAVASSOLI und CROSBY (1968) können im Folgenden zeigen, dass „knochenfreies“ Knochenmark nach Implantation in ein anderes Gewebe, eine ektopische Knochenbildung induziert. Es werden zur dieser Zeit aber noch keine für die Differenzierung verantwortlichen Zellen identifiziert.

FRIEDENSTEIN und Kollegen (1976) isolieren als erste spindelförmige, nicht hämatopoetische Zellen aus dem Knochenmark, und beweisen, dass diese sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren können. Die ersten Anwendungen von Stammzellen beschreibt YOUNG (1998) bei Kaninchen mit Sehnenverletzungen. Eine perkutane Injektion mit Knochenmarkaspirat verbessert die Sehnenheilung.

Später beweisen PITTENGER und Mitarbeiter (1999), dass aus humanem Knochenmark isolierte Zellen *in vitro* undifferenziert bleiben können aber unter entsprechenden Voraussetzungen eine mesenchymale Entwicklungsrichtung vollziehen können.

#### **2.1.2 Einteilung der Stammzellen**

Stammzellen sind unreife, undifferenzierte Gewebivorläuferzellen, die sich ständig teilen und in adulte Stadien und in verschiedene Gewebetypen differenzieren können (BREHM et al. 2002). Sie werden in toti-, pluri- und multipotente Zellen unterteilt (VON ROTH 2009). *Totipotente Stammzellen* können sich in jede Zelle eines Organismus und zu extraembryonalem Gewebe (z. B. Placenta) entwickeln. Sie sind in der Lage einen kompletten neuen Organismus zu bilden. *Pluripotente Zellen* haben die Fähigkeit sich zu jeder Zellart zu differenzieren. Sie können kein extraembryonales Gewebe und keinen neuen Organismus

bilden. *Multipotente Stammzellen* sind weiter in der Entwicklung differenziert und können nur begrenzt neue Zellarten bilden (MASON et al. 2009).

Aufgrund des Ursprungs unterscheidet man *embryonale* und *adulte* Stammzellen.

*Embryonale Stammzellen* werden als pluripotent bezeichnet und aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen (MASON et al. 2009). Sie können sich in jedes Gewebe des Organismus entwickeln (THOMSON et al. 1998).

*Adulte Stammzellen* werden aus frühen Embryonenstadien (außer im Stadium der Blastozyste), dem Fetus oder aus einem reifen Organismus gewonnen. Adulte Stammzellen zeigen mehr multipotente als pluripotente Eigenschaften (MASON et al. 2009). Zu der Gruppe gehören unter anderem hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark, die für die Regeneration der Blutkörperchen und Immunzellen zuständig sind (ZANDER et al. 2001). Außer den hämatopoetischen Stammzellen werden adulte multipotente Stammzellen im Knochenmark, Fettgewebe (GRONTHOS et al. 2001), Amnionflüssigkeit (TSAI et al. 2004), peripherem Blut (ZVAIFLER et al. 2000), Nabelschnurblut (IGURA et al. 2004), fetaler Leber (CAMPAGNOLI et al. 2001), Leber (STRAIN et al. 2000), Pankreas (SERUP et al. 2001), Muskel (SEALE et al. 2001), Knochen und Knorpel (JORGENSEN et al. 2001), Zahnpulpa (GRONTHOS et al. 2000), Cornea (TSENG 1996) und Gehirn (SOHUR et al. 2006) nachgewiesen.

Adulte neurale Stammzellen gehören zu einer weiteren Gruppe von Stammzellen. Diese Zellen kommen in Zentralnervensystem vor allem in der ventrikulären und subventrikulären Zone sowie in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus vor (VESCOVI et al. 2001).

Die Vor- und Nachteile der adulten und embryonalen Stammzellen in Bezug auf potenziellen Einsatz zur Therapie stellt Tabelle 1 dar.

**Tabelle 1: Vor- und Nachteile der embryonalen vs. der adulten Stammzellen nach BREHM et al. 2002:**

|                   | <b>Embryonale Stammzellen</b>             | <b>Adulte Stammzellen</b>  |
|-------------------|---|--|
| <b>Vorteile</b>   | Hoch expandierbar                         | Einfach zu gewinnen  |
|                   | Pluripotenz                               | Keine ethischen Aspekte  |
|                   |   | Uni-, bi-, multi- oder pluripotent                                   |
|                   |   | Hoch kompatibel  |
|                   |   | Autologe Transplantation<br>Keine immunsuppressive Therapie<br>nötig |
| <b>Nachteile:</b> | Ethische Aspekte                          |  |
|                   | Schwer zu isolieren                       |  |
|                   | Gefahr der Abstoßung                      |  |
|                   | Immuntherapie notwendig                   |  |
|                   | Hohes Risiko der<br>Teratokarzinombildung |  |

### 2.1.2.1 Mesenchymale Stammzellen

Im Jahr 1991 verwenden CAPLAN und Mitarbeiter als erste den Begriff „mesenchymale Stammzellen (MSCs)“. „Als mesenchymale Stammzellen beschreibt man klonale, plastikadhärente, nicht hämatopoetische Zellen, die der Ursprung für mesodermale Zelllinien wie Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten sind“ (FRIEDENSTEIN et al. 1976). MSCs besitzen zusätzlich ein endodermales und neuroektodermales Potenzial, was bis jetzt nur in vitro nachgewiesen wurde (TAKASHIMA et al. 2007). Diese multipotenten Fähigkeiten machen die MSCs zu einem interessanten und vielversprechendem Therapieeinsatz in der reparativen Zelltherapie. Ihre Eigenschaften sind in Abb. 1 genauer dargestellt.



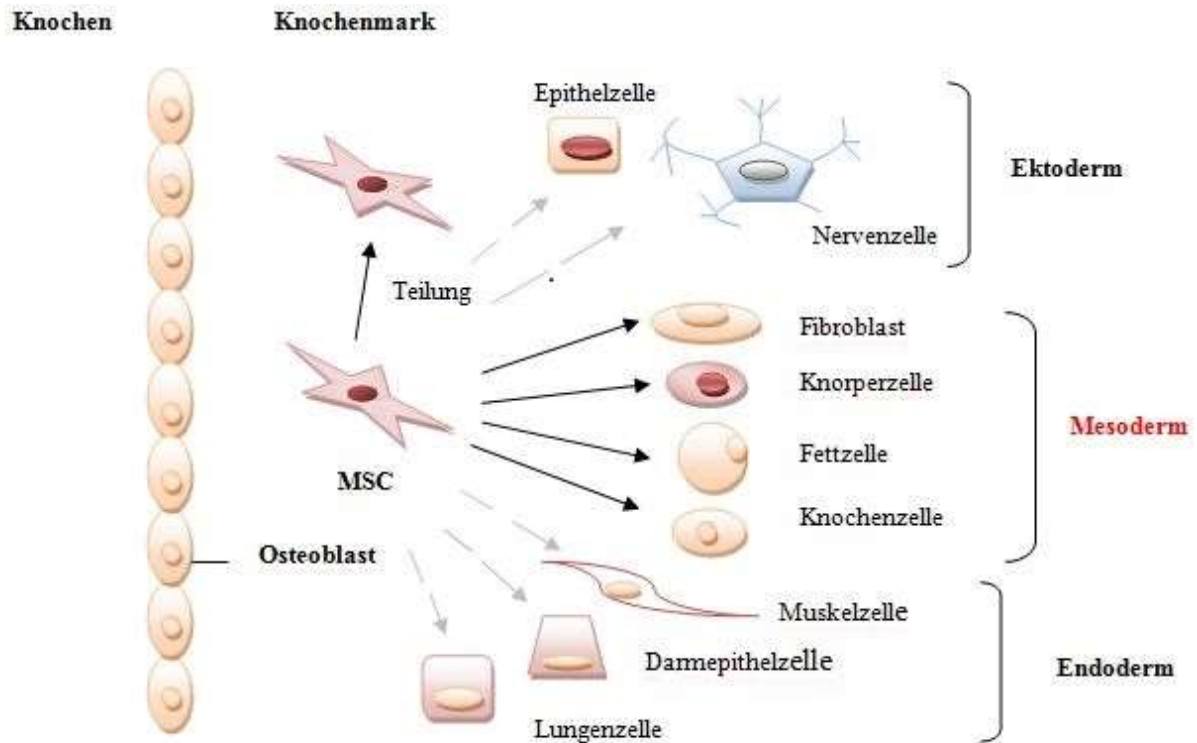


Abbildung 1: Multipotenz von MSCs nach Ucelli 2008

HAZEL und Mitarbeiter (2008) schlagen drei Kriterien zur Definierung der MSCs vor:

- 1) Adhärenz an Plastik
- 2) Multipotentes Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten
- 3) Expression der spezifischen Oberflächeantigene

MSCs zeigen in Zellkultur eine so genannte fibroblastische Morphologie, die durch unregelmäßig geformte Zellausläufer charakterisiert ist (DE BARRY et al. 2004; LIEBICH 1999). Sie werden außer im Knochenmark und Fett (ZUK et al. 2001), im peripheren Nabelschnurrblut, in der Gelenksynovia (DE BARI et al. 2001), im Periost (FUKUMOTO et al. 2003), in der Skelettmuskulatur (JANKOWSKI et al. 2002), in der Lunge (NOORT et al. 2002), in Zähnen (MIURA et al. 2003), in der Haut (YOUNG et al. 2001), in Pericyten (REILLY et al. 1998) und Blut (ZVAIFLER et al. 2000) nachgewiesen. Wie auch andere Stammzellen sind MSCs lebenslang im Gewebe vorhanden. Ihre Gesamtzahl ist jedoch mit dem Alter und Gesundheitszustand des Patienten invers korreliert und hängt vom Ursprungsgewebe ab (MAJORS et al. 1997). MSCs bilden innerhalb aller Zellen eine kleine

Population, z. B. im Knochenmark beträgt die Zahl zwischen 0,001 - 0,01 % der kernhaltigen Zellen (PITTENGER et al. 1999).

### **2.1.2.2 Rolle von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) im Organismus**

Mesenchymale Stammzellen spielen eine wichtige Rolle in allen reifen Geweben. Es wird vermutet, dass MSCs ein Reservoir von Reparaturzellen bilden, die schnell als Antwort auf Verletzungs- oder Krankheitssignal mobilisiert werden, und in verschiedene Zelllinien differenzieren können (DE BARRY et al. 2004).

Mesenchymale Stammzellen produzieren ein breites Spektrum von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die Einfluss auf die Zellen in der Umgebung haben (HAYNESWORTH et al. 1996). Die von MSCs sekretierten bioaktiven Substanzen können eine autokrine oder eine parakrine Wirkung auf die lokale Umgebung haben (CAPLAN & DENNIS 2006). Sie werden beispielweise im Fall einer hochgradigen Ischämie oder einer anderen Schädigung des Gewebes MSCs von der geschädigten Stelle im Körper durch Entzündungsmediatoren angelockt. Dort setzen die Stammzellen verschiedene bioaktive Substanzen frei, die Reparatur- und Regenerationsprozesse unterstützen. Die Apoptose wird gehemmt, wohingegen die Angiogenese und Zellteilung stimuliert werden (CAPLAN & DENNIS 2006). Dadurch entsteht u. a. weniger Narbengewebe.

Des Weiteren weisen MSCs eine antiinflammatorische und immunregulatorische Wirkung auf, indem sie antigenspezifische T-Zellproliferation und Zytotoxizität inhibieren. Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz in der Therapie von immunbedingten Erkrankungen (UCCELLI et al. 2008).

Aus diesen Gründen gewinnen MSCs immer größere Bedeutung in der regenerativen Medizin und im so genannten „*Tissue Engineering*“. Diverse Studien beschreiben einen potenziellen Einsatz von Stammzellen zur Therapie von Erkrankungen wie z. B. Rückenmarkstrauma, Herzinfarkt, Lungenfibrose, Knochen- und Knorpeldefekte sowohl in präklinischen Studien mit Tiermodellen als auch in der Human- und in Tiermedizin (FORTIER & TRAVIS 2011; SHAKE et al. 2002; WANG et al. 2002). Die Stammzelltransplantation stellt potenziell eine der besten Therapiemöglichkeiten bei Rückenmarkstraumata dar (OHTA et al. 2003).

### 2.1.2.3 Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe

ZUK und Mitarbeiter (2001) stellen fest, dass Fettgewebe eine zusätzliche Quelle von mesenchymalen Stammzellen ist. Es konnten aus humanen Lipoaspiraten Zellen isoliert werden, die *in vitro* ein osteogenes, adipogenes, myogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial zeigen. Es wird durch molekulare und biochemische Untersuchungen bestätigt, dass diese Zellen zur Stammzellenpopulation gehören.

Für aus dem Fettgewebe isolierte Stammzellen werden in der Fachliteratur unterschiedliche Bezeichnungen ausgegeben. Zur Beschreibung der aus dem Fettgewebe isolierten, plastikadherenten, multipotenten Zellpopulation finden sich Begriffe wie: „*stromal cells*“, „*adipose endothelial cells*“, „*adipose derived adult stromal cells (ADSC)*“, „*adipose stromal cells (ASCs)*“, „*adipose mesenchymal stem cells (AdMSC)*“, „*processed lipoaspirate (PLA) cells*“, „*adipos -derived adult stem cells (ADAS)*“ oder „*adipose-derived stem/stromal cells (ASCs)*“. Die internationale „*Fat Applied Technology Society*“ schlägt den Begriff **“adipose-derived stem cells (ASCs)** (BUNNEL et al. 2008) vor, der im Folgendem verwendet wird.

Die aus dem kaninen Fett isolierten plastikadhertenten Zellen können auch als multipotente MSCs angesehen werden, weil sie sich mindestens in vier verschiedene Richtungen (Knorpel, Knochen, Fett, Muskel) differenzieren. ASCs können für einen klinischen Einsatz einfach *in vitro* vermehrt werden und zeigen keine Chromosomenänderungen. Die aus dem Fettgewebe isolierten Stammzellen können im flüssigem Stickstoff gelagert werden (VIEIRA et al. 2010). ASCs erfüllen die wichtigsten Herausforderungen als Material für *Tissue engineering*. Sie können in großen Mengen einfach und nicht invasiv isoliert und in Kultur vermehrt werden. ASCs können autolog transplantiert werden und eine immunsuppressive Therapie ist in diesem Fall nicht nötig. Da es sich um adulte Stammzellen handelt, stellt der Einsatz keine ethischen und logistischen Probleme dar (NOHROUDI et al. 2010).

### 2.1.3 Stammzelltherapie: Art der Stammzellen und Applikation

Bei der Stammzelltherapie werden autologe oder allogene MSCs angewendet. Bei autologen Transplantation stammen die Zellen aus dem gleichen Organismus. Im Gegensatz dazu sind allogene Transplantate körperfremd und kommen von einem Spender derselben Art (DE BARRY et al. 2004).

Zur Therapie in der Humanmedizin werden aus ethischen Aspekten adulte Stammzellen verwendet, deren Einsatz mit weniger ethischen Problemen im Vergleich zu embryonalen Stammzellen, einhergeht. Besonders problematisch stellt sich die Gewinnung von embryonalen humanen Stammzellen dar, weil diese mit der Zerstörung menschlicher Embryonen verbunden ist (HÜSING et al. 2003). Außerdem besteht aufgrund der unkontrollierten Proliferations- und Differenzierungsmöglichkeiten der embryonalen Stammzellen die Gefahr der Tumorentstehung (SYKOVA & JENDELOVA 2007).

Die Stammzellen können lokal oder systemisch transplantiert werden. Bei lokaler Gabe werden Stammzellen direkt in das geschädigte Gewebe injiziert, z. B. eine lokale Injektion von aus dem Knochenmark isolierten MSCs direkt in die Rückenmarksläsion unterstützt bei Ratten die Heilung des Nervengewebes (WU et al. 2003). Bei Pferden werden MSCs direkt intraläsional in die verletzten Sehnen appliziert (HERTHEL 2001). Im Falle der Arthrose können die Stammzellen direkt in die Gelenkhöhle injiziert werden. Zur Behandlung der Knorpeldefekten ist eine Applikation von Stammzellen haltigen Gerüstsubstanz zu empfehlen (BURK et al. 2011).

Im Rahmen von der systemischen Transplantation werden die Stammzellen entweder intravenös oder intraarteriell appliziert (DE BARRY et al. 2004). Nach einer intravenösen Gabe können die Stammzellen zur Läsion migrieren und durch eine offene Blut-Hirn-Schranke sogar ins Gehirn- oder Rückenmarksgewebe wandern (SYKOVA & JENDELOVA 2006).

Im Gegensatz dazu beschreibt HOFFMANN (2005) keine deutliche Stammzellaufnahme durch geschädigtes Myokard nach intravenöser Applikation. Er schlägt vor, dass man die Stammzellen intraarteriell oder chirurgisch direkt in das Gewebe implantieren sollte, um einen optimalen therapeutischen Effekt zu erzeugen. Eine mögliche Stammzellaufnahme durch die betroffenen Organe hängt davon ab, ob eine chronische oder akute Schädigung vorliegt. Bei akuten Myokarderkrankungen ist die Stammzellaufnahme durch die betroffenen Organe höher als bei einem chronischen Geschehen (PENICKA et al. 2007).

Bei Läsionen des Zentralnervensystems schlagen OHTA und Mitarbeiter (2004) eine Stammzellgabe in den Liquor cerebrospinalis vor. Diese Injektion ist für das Rückenmarksgewebe eine schonende Implantationsmethode. Die Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs) heften sich an die Pia mater an und können durch die verletzte Hirnhaut in das Rückenmark eindringen (OHTA et al. 2004).

In einer Studie von KERKIS und Mitarbeitern (2008) stellt bei der Golden Retriever Muskeldystrophie (GRMD) eine systemische intraarterielle Stammzellinjektion ein besserer Implantationsweg als eine lokale intramuskuläre Injektion dar.

McCOLGAN und Kollegen (2011) fassen die bisherigen Stammzell-Tracking Studien aus der Humanmedizin (n = 19) zusammen. Signifikante Faktoren für die Zellaufnahme durch geschädigte Organe sind Zahl und Reinheit der injizierten Stammzellen. Reine Stammzellen werden anhand der für Stammzellen typischen Marker wie CD34+ und CD133+ in einem ersten Schritt isoliert. Die Zellzahl zeigt eine negative lineare Korrelation zur Aufnahme in Organe. Im Gegensatz dazu weist die Zellreinheit eine positive lineare Korrelation zur Aufnahme durch die Organe auf. Es wird daher vorgeschlagen bei Stammzelltherapie lieber weniger aber dafür nur hochselektierte Stammzellen zu applizieren.

### **2.1.3.1 Reaktion nach Stammzellimplantation**

Es wird beschrieben, dass Stammzellen nicht oder nur in einem sehr geringem Maße immunogen sind, weil sie keine Expression der MHC Klasse II zeigen (MAJUMDAR et al. 2003). MSCs zeigen auch eine niedrige Expression von MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Klasse I (LE BLANC et al. 2003). Beide Eigenschaften haben eine große Bedeutung für das Immunsystem des Empfängers. Es wird angenommen, dass die MSCs sich im geschädigten Gewebe in den gewünschten Phänotyp differenzieren und das geschädigte Gewebe somit repariert wird (DE BARRY et al. 2004). Die Stammzellen integrieren sich im Wirtsmilieu und antworten auf intrinsische Signale. Des Weiteren scheiden die Stammzellen bioaktive Faktoren aus und beeinflussen dadurch Reparatur- und Regenerationsprozesse. Sie besitzen dadurch eine immunmodulierende und immunsuppressive Wirkung. Die Apoptose und Entstehung von Narbengewebe wird gehemmt und die Angiogenese induziert. Weiter werden die Zellteilung und die Zelldifferenzierung gefördert (SYKOVA & JENDELOVA 2007).

Die immunmodulierenden und immunsuppressiven Eigenschaften stellen eine Hoffnung bei der Therapie von immunmedierten Erkrankungen bei Menschen dar (UCCELLI et al. 2008).

#### 2.1.4 Allgemeiner Einsatz von Stammzellen in der Neurologie

Für den Einsatz von Stammzellen in der Neurologie sind vielfältige Möglichkeiten beschrieben worden. Sie finden Einsatz in Studien bei neurodegenerativen Erkrankungen, Gehirnfarkten und auch bei Gehirn- und Rückenmarkstraumata (WU et al. 2003, STRAUER et al. 2002, MAZZINI et al. 2006). Die meisten Untersuchungen werden jedoch in Rahmen von präklinischen Studien mit Tiermodellen durchgeführt. In der Literatur sind nur einzelne Fallberichte aus der Humanmedizin über Einsatzversuche von Stammzellen bei neurologischen Erkrankungen beschrieben.

Eine neuroprotektive Wirkung von Stammzellen durch den sogenannten *by stander* Mechanismus beschreibt UCCELLI und Mitarbeiter (2008). MSCs können durch Zytokinproduktion die Neuronen und Oligodendrozyten vor einer Apoptose retten. Weiterhin können sie einen antientzündlichen und antiproliferativen Einfluss auf Astrozyten und Mikrogliazellen ausüben. MSCs haben theoretisch das Potenzial, Proliferation und Reifung von neuralen Prekursorzellen zu beeinflussen.

SYKOVA (2006) beschreibt in einer Studie aus der Humanmedizin bei 20 Patienten nach einem akuten oder chronischen Rückenmarkstrauma und darauffolgende MSCs Implantation eine Verbesserung der motorischen und sensorischen Funktion. Eine weitere Studie aus der Humanmedizin beschreibt, dass 4 von 7 Patienten mit amyotropher Lateralsklerose nach autologer intraspinaler MSCs Applikation eine deutliche Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung über 36 Monate zeigen (MAZZINI et al. 2006). Bei schwerem Morbus Parkinson bringt eine Transplantation der embryonalen Dopaminneuronen bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) im Gegensatz zu älteren Patienten (> 80 Jahre) eine klinische Verbesserung (FREED et al. 2001). MANCARDI und Mitarbeiter (2008) zeigen, dass die Stammzelltherapie eine Möglichkeit der Therapie bei Patienten mit Multipler Sklerose darstellt, besonders wenn die Standardtherapie versagt.

Weitere in Literatur beschriebene Studien werden mit Versuchstieren durchgeführt.

OHTA und Mitarbeiter (2003) transplantieren bei Ratten nach Setzen einer definierten Rückenmarksläsion mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in den vierten Ventrikel der Ratte. Die behandelten Ratten zeigen eine verbesserte Motorik im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich zeigt sich in der pathohistologischen Untersuchung eine verminderte Höhlenentstehung im Rückenmark.

Es wird keine Differenzierung in neurale Zellen (Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten) nachgewiesen. Man nimmt an, dass die MSCs durch Produktion von trophischen Mediatoren die Regeneration des Rückenmarks unterstützen. ERB und Mitarbeiter (2011) berichten über den Einsatz von Stammzellen bei einem akuten Rückenmarkstrauma bei Hunden. Neun Hunde mit Bandscheibenvorfall und eine Katze nach Wirbelfraktur ohne Tiefensensibilität erhalten intrathekal aus dem Humerus isolierte MSCs. Im Durchschnitt ist nach 2,25 Tagen bei 90 % der Patienten die Tiefensensibilität feststellbar.

LIM und Kollegen (2007) und RYU und Mitarbeiter (2009) beweisen eine neuroprotektive Wirkung von Stammzellen bei der Behandlung von Rückenmarkstraumata bei Hunden. Die Studie von LIM et al. stellt eine experimentelle Untersuchung dar, in der die Hunde nach 8 Wochen nach dem Trauma euthanasiert werden und außer einer klinischen Evaluation, einer MRT-Untersuchung und Elektrodiagnostik erhalten. Das Rückenmark der untersuchten Hunde wird einer pathohistologischen Analyse unterzogen. In der histopathologischen Untersuchung zeigt sich eine geringere Höhlenbildung im Rückenmarksparenchym, sowie ein höherer Myelinisierungsgrad bei Patienten, die MSCs aus dem Nabelschnurblut oder MSCs und rmhGCFS (*recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor*) erhalten haben. Es kann jedoch kein genauer Regenerationsmechanismus beschrieben werden. Mittels MRT-Untersuchung kann nur die Ausprägung der Rückenmarksschäden dargestellt werden. Die applizierten Stammzellen an sich werden in der Studie nicht nachgewiesen, eine Markierung mit Kontrastmittel findet nicht statt.

RYU und Mitarbeiter (2009) zeigen, dass eine ASCs-Injektion in das Rückenmark eine Woche nach einem Rückenmarkstrauma bei 5 Hunden zu einer klinischen Verbesserung im Gegensatz zur Kontrollgruppe (eine PBS-Injektion (n = 3); keine Therapie (n = 3)) führt. Die Nervenleitgeschwindigkeit bei der mit ASCs therapierten Tieren war signifikant höher. In der pathohistologischen Untersuchung vom Rückenmark nach 9 Wochen zeigen sich geringgradige Hinweise auf eine Differenzierung in Oligodendrozyten, Astrozyten sowie Neuronen.

## **2.1.5 Weiterer Einsatz von mesenchymalen Zellen in der Human- und Veterinärmedizin**

### Humanmedizin:

Hämatopoetische Stammzellen werden routinemäßig zur Behandlung von Leukämie eingesetzt (TABBARA et al. 2002). Die allogene und autologe Knochenmarktransplantation wird seit 25 Jahren klinisch in der Humanmedizin eingesetzt (ZANDER et al. 2001).

Auf den Gebieten der Kardiologie und Orthopädie sind einzelne Fälle von Stammzelltherapieversuchen in der Humanmedizin beschrieben.

In der Humankardiologie gibt es unterschiedliche Studien: MSCs werden bei Patienten nach Herzinfarkt in das geschädigte Myokardgewebe lokal transplantiert. Dadurch kann eine bessere Funktion des Myokards und dessen Perfusion erreicht werden (STAMM et al. 2003; AL KHALDI et al. 2003). ORLIC und Mitarbeiter (2001) stellen die These auf, dass MSCs eine positive Wirkung beim Vorliegen von Koronararterienerkrankungen besitzen, denn sie können Myocard de novo bilden.

Des Weiteren sind einige Einsatzmöglichkeiten in der Orthopädie beschrieben:

QUARTO und Kollegen (2001) zeigen in seiner Studie, dass Patienten mit einem hochgradigem Knochendefekt nach einer lokalen Stammzelltherapie eine bessere und schnellere Knochenheilung zeigen. PONTICIELLO und Mitarbeiter (2003) bestätigen in seiner Studie, dass Implantation von hMSCs in Knorpeldefekten zu einer Knorpelbildung und zur vollständigen Füllung der Defekte führt. Bei Osteogenesis imperfecta - einer Knochenerkrankung, die mit Veränderungen des Kollagens Typ I und dadurch einer abnorm hohen Knochenbrüchigkeit einhergeht, bringt eine intravenöse Injektion mit unmanipulierten Knochenmarkzellen eine deutliche Verbesserung der Knochenstruktur und eine Verringerung der Frakturrate (HOROWITZ et al. 1999).

### Stammzellen in der Veterinärmedizin:

Die Stammzelltherapie wird in der Tiermedizin auf unterschiedlichen Ebenen eingesetzt wie z. B. zu therapeutischen Zwecken, besonders beim Pferd und Hund. Sie stellt eine bahnbrechende Möglichkeit für den Artenschutz und den Erhalt bedrohter Tierarten im Rahmen internationaler Zuchtprogramme dar. Hier handelt sich um Techniken wie *testis xenografting* oder *spermatogonial stem cell transplantation*. Weiterhin werden viele Klein-



und Großtierarten in präklinischen Studien in der Humanmedizin eingesetzt (FORTIER & TRAVIS 2011).

In der Tiermedizin findet die Stammzelltherapie ihren Einsatz im Bereich von Erkrankungen des Bewegungsapparates beim Pferd besonders bei Sehnenverletzungen wie z. B. Läsionen der oberflächlichen Beugesehne oder seltener zur Behandlung von Arthrosen (BURK et al. 2011). Bei Sportpferden werden MSCs mit guten Erfolgen zur lokalen Therapie der Fesselträgerverletzung eingesetzt (HERTHEL 2001). Weitere Studien zeigen eine Erfolgsrate von 84,5 % nach der MSCs-Therapie des Fesselträgers und der oberflächlichen Beugesehne (BURK & BREHM 2011). PACCINI und Mitarbeiter (2007) stellen eine Therapieerfolgsrate von 90 % bei 10 Galopprennpferden mit oberflächlicher Beugesehnenverletzung nach der Applikation von MSCs mindestens nach 2 Jahren fest. Alle Pferde in der Kontrollgruppe zeigen in der Zeit ein Rezidiv. Experimentelle Studien beweisen, dass biomechanische, histologische und biochemische Eigenschaften einer behandelten Sehne deutlich besser sind als bei einer unbehandelten Sehne (SCHNABEL et al. 2009).

Im Bereich der Kleintiermedizin liegt der Forschungsschwerpunkt in den Fachgebieten Orthopädie und Neurologie (BRUDER et al. 1998; ABDEL-HAMID et al. 2004). BLACK und Mitarbeiter (2007) zeigen den Einsatz autologer MSCs zur Behandlung der Arthrose bei Hunden. Arthrose charakterisiert sich durch eine Degeneration des Gelenkknorpels, mit einer Abnahme von Matrix und Fissurformation, zum Teil mit vollständigem Schwund der Knorpeloberfläche. In einer doppelt-geblindeten Placebo kontrollierten Studie werden Hunde mit Coxarthrose und ausgeprägten klinischen Symptomen, wie Lahmheit, eingeschränkte Bewegung und Schmerzen mit einer MSCs Injektion in das Hüftgelenk behandelt. Die Kontrollgruppe erhält eine Placeboinjektion. Die mit MSCs therapierten Tiere zeigen im Vergleich zu Kontrollgruppe nach 30, 60 und 90 Tagen eine durch den Tierarzt und Besitzer dokumentierte Besserung der klinischen Symptome.

Eine weitere Studie von BLACK und Kollegen (2008) beweist einen positiven Einfluss von MSCs bei Gonarthrose bei Hunden. MURPHY und Mitarbeiter (2003) beschreiben eine vermehrte Regeneration der Menisken, eine verminderte Degeneration des Gelenkknorpels, aber auch eine Osteophytenneufornation bei Ziegen mit Arthrosen nach lokaler MSCs-Injektion.

Die Stammzelltherapie stellt eine große Hoffnung für die Therapie der Muskelerkrankungen wie z. B. der Duchenne Muskeldystrophie bei Menschen dar. Die Golden Retriever Muskeldystrophie (GRMD) stellt ein adäquates Tiermodell für diese Erkrankung dar. Bis jetzt

werden Studien mit Stammzellen aus Zahnpulpa (KERKIS et al. 2008) und gefäßassoziierten Stammzellen (Mesangioblasten) mit positiven Ergebnissen zur Behandlung der GRMD durchgeführt (DE ANGELIS et al. 1999; SAMPAOLESI et al. 2006). Hunde, die mit Mesangioblastenzellen mittels einer Injektion in die Femoralvene behandelt werden, zeigen eine Dystrophinexpression. Andere Golden Retriever, die mit Stammzellen aus der Zahnpulpa mit einer entweder intraarteriellen oder intramuskulären Injektion behandelt werden, zeigen eine minimale Dystrophinexpression. Eine weitere Studie von ROUGER und Mitarbeiter (2011) beweist, dass eine intraarterielle Injektion der allogenen Stammzellen aus den Muskeln bei 3 Golden Retriever mit GRMD zu einer Dystrophinexpression und einer Stabilisierung der pathologischen Befunde und klinischen Funktionen führt. DELL'AGNOLA (2004) stellt jedoch in eigener Studie dar, dass transplantierte humane Stammzellen aufgrund der immunmodulierenden Wirkung zu einer klinischen Besserung bei Golden Retriever mit GRMD führen. In dieser Untersuchung kann eine Dystrophinexpression nicht nachgewiesen werden.

Obwohl Stammzellen potenziell auf vielen Gebieten sowohl in der Human- als auch Tiermedizin eingesetzt werden können, fehlen Langzeitstudien, welche die Sicherheit dieser Behandlungsart bestätigen. Deshalb wird der Einsatz von Stammzellen oft nur in einzelnen Fällen beschrieben (DJOUAD et al. 2009).

## **2.2 Molekulare Bildgebung**

Die oben beschriebenen Studien unterstreichen das große therapeutische Potenzial der Stammzellen. Bisher ist nicht genau bekannt, was mit den injizierten Zellen sowohl bei Tieren als auch Menschen genau passiert, wie sie sich in einem Organismus verhalten, oder wie lange sie im Körper bleiben. Eine Möglichkeit diese Zellen in einem lebenden Organismus zu beobachten stellt die molekulare Bildgebung dar.

„Molekulare Bildgebungsmethoden ermöglichen die räumliche und zeitliche Beschreibung des zu untersuchenden Prozesses auf eine nicht-invasive Weise“ (KRUTTWIG 2009).

Es werden bisher verschiedene bildgebende Verfahren zur Darstellung von Zellen beschrieben wie z. B. die Szintigraphie (DING et al. 2004), die Magnetresonanztomographie (MODO et al. 2005), die Biolumineszenz (CHAUDHARI et al. 2005), die Multiphotonenmikroskopie (MIZRAHI et al. 2006), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (WU et al. 2006) und die Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie (SPECT)

(ZHOU et al. 2005). Die Szintigraphie sowie die zwei zuletzt genannten Methoden gehören zur nuklearmedizinischen Bildgebung. Bei diesen Verfahren wird eine schwach radioaktiv markierte Substanz (Radiopharmakon) verwendet. Der Nachteil von nuklearen Markierungsmethoden ist die kurze Halbwertszeit der Isotope. Die markierten Zellen können nur über einen Zeitraum von wenigen Tagen verfolgt werden. Eine weitere Einschränkung stellt die ionisierende Strahlung dar: radioaktive Marker beeinflussen die Zellfunktion und die Zellteilung (McCOLGAN et al. 2011). Aus obengenannten Gründen werden nicht nukleare bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) bevorzugt. Mittels MRT-Untersuchung können nicht nur das Verhalten einzelner Stammzellen in vitro untersucht werden, sondern diese Untersuchung kann ohne negativer Auswirkung in vivo bei Tieren und Menschen eingesetzt werden. Aus diesem Grund widmet sich die vorliegende Arbeit der Untersuchung der Zellen mittels Magnetresonanztomographie. Die MRT stellt eine nicht invasive Technik dar, implantierte Stammzellen und deren Migration, Wachstum und potenzielle Nebenwirkungen und das umliegende Gewebe zu beobachten. Zur genaueren Darstellung der Zellen müssen diese mit einem MRT-Kontrastmittel markiert werden (SYKOVA & JENDELOVA 2007).

## **2.2.1 Magnetresonanztomographie**

### **2.2.1.1 Physikalische Grundlagen**

„Die Eigenschaft eines Atoms sich um die eigene Achse zu drehen wird als Kernspin oder Eigendrehimpuls der Kerne bezeichnet. Da sich die Ladung der Kerne mitbewegt, wird elektrischer Strom erzeugt und es entsteht ein Magnetfeld, das eine Dipolcharakteristik mit der Symmetrieachse entlang der Drehachse aufweist“ (SCHICK 2005). Das Wasserstoffproton ( $H^+$ ) spielt die größte Rolle in der Bildgebung, da es ein elementarer Bestandteil von Wasser und Fett ist, daher im Körper häufig vorkommt und im Vergleich zu anderen Ionen ein großes magnetisches Moment erzeugt (NITZ 2007).

Das magnetische Feld jedes Wasserstoffprotons hat zunächst eine ungerichtete Orientierung, so dass sich die Ladungen gegenseitig aufheben und die Summe der Vektorrichtungen der Magnetfeldern in einem Körper null beträgt (POOYA et al. 2004).

Im Magnetfeld des Tomographen richten sich die Protonen jedoch entweder parallel oder antiparallel aus. Bei einer Feldstärke von 1 Tesla und 37 °C beträgt das Verhältnis der

parallelen zu den antiparallelen Vektoren 1000 007 zu 1000 000. Die parallele Ausrichtung ist energetisch günstiger (EDELMAN et al. 2006). Um die Magnetisierung nachzuweisen, müssen die Protonenfelder aus ihrer Ausrichtung entlang des Hauptmagnetfeldes des Tomographen ( $B_0$ ) ausgelenkt werden (REISER 2002).  $B_0$  ist das statische Magnetfeld in einem Magnetresonanztomograph.

Als Magnetisierung ( $M$ ) wird die Summe der Vektoren der magnetischen Momente in einem Körper bezeichnet. Die Einheit von  $B_0$  ist Tesla oder Gauss. 1 Tesla entspricht 10 000 Gauss. Die Stärke von 1 Tesla entspricht etwa 20 000fachen Feldstärke des Erdmagnetfeldes (WESTBROOK, KAUT, ROTH & TALBOT 2011). Die Feldstärke eines Ganzkörpermagnetresonanztomographen liegt meist zwischen 0,2 T und 3 T (SCHICK 2005). Der Magnetisierungsvektor  $M$  kann in 2 Teilkomponenten eingeteilt werden: Längs- bzw. longitudinale Magnetisierung  $M_l$  und Quer- bzw. transversale Magnetisierung  $M_t$  zu  $B_0$  (REISER 2002).

Die transversale Magnetisierung führt im äußeren statischen Magnetfeld eine Rotationsbewegung (Präzession) aus, mit einer Frequenz, die als Larmorfrequenz bezeichnet wird. Die Larmorfrequenz hängt von der untersuchten Kernart und der Magnetfeldstärke ab. Für Wasserstoffprotonen beträgt die Larmorfrequenz ca. 42,6 MHz/Tesla und ist proportional zur Feldstärke (SCHICK 2005).

### **2.2.1.2 Resonanzeffekt**

Durch einen Hochfrequenz-Sender kann die Längsmagnetsierung in eine Quermagnetsierung umgewandelt werden. Es entsteht ein Hochfrequenz-Magnetfeld  $B_1$  senkrecht zu dem statischen  $B_0$  in dem untersuchten Gewebe (BROWN & SEMELKE 2010).

Wenn die eingestrahlte Hochfrequenz identisch mit der Larmorfrequenz ist, entsteht ein so genannter Resonanzeffekt. Der Magnetisierungsvektor  $M$  wird in die Querausrichtung verlagert und die Protonen präzessieren mit der Larmorfrequenz. Als Präzession wird eine Richtungsänderung der Achse eines rotierenden Körpers verstanden, wenn darauf ein Drehmoment durch äußere Kräfte ausgeübt wird (SCHICK 2005).

### 2.2.1.3 Relaxation, Repetitionszeit, Echozeit

Als Relaxation beschreibt man den Vorgang, bei dem die Spins nach dem Ende des hochfrequenten Pulses in ihren Gleichgewichtszustand zurückkehren. Dabei wird Energie in Form eines elektromagnetischen Signals frei. Dieses Signal kann empfangen werden. Dabei ist das empfangene Signal deutlich schwächer als der ursprüngliche Impuls (LAUBENBERGER 1999).

Es wird zwischen 2 Relaxationsprozessen unterschieden: das Wiedererlangen der Längsmagnetisierung, die durch die Längs- oder Spin-Gitter-Relaxationszeit (T1) charakterisiert wird und der Relaxation der Quermagnetisierung, die durch die Quer- oder Spin-Spin-Relaxationszeit (T2) charakterisiert wird (REISER 2002).

Als Repetitionszeit (TR) beschreibt man die Zeit, die zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anregungen derselben Schicht vergeht (WEISHAUPT et al. 2009).

Die Echozeit (TE) nennt man die Zeitspanne zwischen der Anregung bis zur Messung des MR-Signals (WEISHAUPT et al. 2009).

#### 2.2.1.3.1 Längs- und Querrelaxation (T1- und T2-Zeit)

##### Längsrelaxation (T1-Zeit)

Die longitudinale Magnetisierung kann als eine Funktion der gewebespezifischen Relaxationszeit beschrieben werden. Diese Zeit gibt an, mit welcher Geschwindigkeit sich eine gedrehte Magnetisierung wieder parallel zum Hauptmagnetfeld ausrichtet. Sie wird als T1-Relaxationszeit bezeichnet (NITZ 2007). Die longitudinale Relaxation ist mit einer Energieabgabe an die Umgebung verbunden und wird aus diesem Grund auch Spin-Gitter-Relaxation genannt. Die nach einem HF-Impuls entstandene Längsmagnetisierung ist abhängig von dem sogenannten Auslenkungswinkel. Nach einem  $90^\circ$  Impuls verschwindet die Längsmagnetisierung. Wenn der Winkel größer als  $90^\circ$  ist (z.B. ein  $180^\circ$  Inversions-HF Impuls) beträgt die longitudinale Magnetisierung  $-M_0$ . Als „*Inversion recovery*“ beschreibt man den Wiederanstieg der longitudinalen Magnetisierung nach einem Inversions-Impuls (EDELMAN et al. 2006). Nach einer „Invertierung“ (Umkehr) der Magnetisierung liegt nur eine Längsmagnetisierung vor, da keine Quermagnetisierung vorhanden ist. Wenn der Umkehrpunkt erreicht ist, beträgt der Vektor der Magnetisierung null (NITZ 2007).

### **Querrelaxation (T2-Zeit)**

Die transversale Magnetisierung besteht aus vielen individuellen magnetischen Momenten der Wasserstoffprotonen, die sich in gleiche Richtung bewegen. Es kommt zu einer Dipol-Dipol-Interaktion zwischen den benachbarten Nuklei. Der Spin eines einzelnen Wasserstoffkerns der zufällig parallel ausgerichtet zum angelegten externen Magnetfeld ist, besitzt ein magnetisches Moment, welches sich mit dem externen Feld überlagert. Dies beeinflusst das Magnetfeld der umgebenden Wasserstoffprotonen. Die rotierenden Moleküle führen zu Feldfluktuationen, was eine langsame Dephasierung, das heißt, Verlust der Phase verursacht. Die Zeit, in der dieser Dephasierungseffekt stattfindet, nennt man T2-Relaxationszeit (WEISHAUPT et al. 2009). Die transversale Relaxation kann als der Verlust der transversalen Magnetisierung durch die Spins, die außer der Phase geraten, beschrieben werden (NITZ 2007). Es wird keine Energie an die Umgebung abgegeben, die Spins tauschen vielmehr die Energie untereinander aus (NITZ 2007).

Jedoch auch der Magnetresonanztomograph und der untersuchte Körper selber verursachen starke Inhomogenitäten des äußeren Magnetfelds  $B_0$ , was die Dephasierung zusätzlich verstärkt. Das Ausmaß des Einflusses dieser Inhomogenitäten kann mit einem zusätzlich angewandeten  $180^\circ$  Impuls vermindert werden (WEISHAUPT et al. 2009).

Die Vorgänge der T1- und T2- Relaxation finden gleichzeitig statt und sind voneinander unabhängig.

Das MRT-Signal zerfällt in den ersten 100 - 300 ms aufgrund der T2-Relaxation, lange bevor sich die Längsmagnetisierung aufgrund der T1-Relaxation wieder aufgebaut hat (0,5 - 5 s) (WEISHAUPT et al. 2009).

#### **2.2.1.4 Gradientenecho-Sequenz**

Gradientenechosequenzen werden auch abhängig vom Hersteller des Tomographen als Gradientenecho (GRE), GRASS oder Fast-Field-Echo (FFE) bezeichnet. Bei der Sequenz werden anstatt eines typischen Hochfrequenzimpulses Gradientenspulen verwendet um das Echo zu erzeugen. Dabei wird ein Frequenzcodiergerät mit einer negativen Polarität eingeschaltet, was eine Dephasierung der Spins verursacht. Im Anschluss erfolgt eine Umschaltung auf eine positive Polarität. In diesem Moment kommt es zur Rephasierung und zum Echo. Bei der Sequenz können kurze Repetitionszeiten (TR) erreicht werden. Der

Hauptvorteil dieser Sequenz besteht in einer sehr schnellen Bildakquisition (WEISHAUPT et al. 2009).

Bei sehr schnellen Gradientenecho-Sequenzen mit kurzer TR kann es vorkommen, dass vor der nächsten Anregung noch ein Restsignal vorhanden ist. Dieses verbliebene Signal muss absichtlich zerstört werden. Dieser Prozess wird als „Spoiling“ bezeichnet. Bei Sequenzen, die das „Spoiling“ nutzen wird T1-Wichtung betont (WEISHAUPT et al. 2009).

Bei Gradientenecho-Sequenzen werden Feldinhomogenitäten nicht ausgeglichen, da ein zusätzlich angewandter  $180^\circ$  Impuls (s. o.) fehlt. Das Signal zerfällt während der Zeitkonstante T2. Der resultierende T2\*-Kontrast kann durch TE beeinflusst werden. Bei sehr kurzer TE erreicht man eine optimale T1-Gewichtung und der T2\*-Kontrast wird minimiert (NITZ 2007).

Wenn T2\*-Kontrast gewünscht ist, wird TE verlängert. T2\*-gewichtete Bilder können bei der Detektion von paramagnetischen Substanzen wie z. B. von Blutprodukten oder Kalkablagerungen helfen, da sie aufgrund des fehlenden  $180^\circ$ -Impulses und der längeren TE für Feldinhomogenitäten sehr sensibel ist (WEISHAUPT et al. 2009).

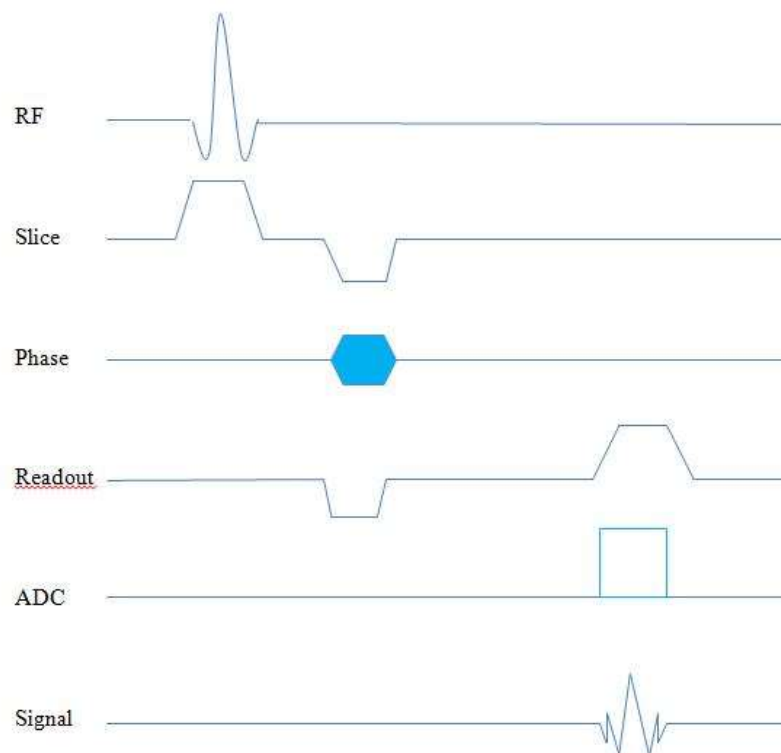


Abbildung 2: Pulssequenz Diagramm nach McROBBIE 2006

### 2.2.1.5 Kontrast

Der Bildkontrast, d. h. die Helligkeitsunterschiede in einem MRT-Bild, werden durch drei Parameter beeinflusst: durch die Protonendichte, das heißt die Anzahl der anregbaren Spins pro Volumeneinheit, durch Relaxationszeiten und Anregung und Aufnahme des Signals. Wenn der Bildkontrast hauptsächlich von T1 bestimmt wird, werden die Bilder als T1-gewichtet bezeichnet (WEISHAUPT et al. 2009). Bei T2-gewichteten Bildern hängt der Kontrast vor allem von der Zeitkonstante T2 ab (EDELMAN et al. 2006). In einem T1-gewichteten Bild werden die Gewebe mit kurzer T1-Relaxationszeit hyperintens dargestellt. Diese Art vom Gewebe relaxiert schnell und gibt nach einer erneuten Anregung ein hohes Signal ab. Im Gegensatz dazu werden die Gewebe mit einer langen T1-Relaxationszeit hypointens dargestellt (EDELMAN et al. 2006).

Die Echozeit (TE) repräsentiert die Zeit von der Anregung bis zur Messung des MR-Signals. Eine kurze Echozeit ist für eine geringe T2-Gewichtung verantwortlich. Gewebe mit kurzer T2-Relaxationszeit erscheinen auf T2-gewichteten Bildern hypointens, während Gewebe mit einer langen T2-Relaxationszeit hyperintens dargestellt werden. Im zweiten Fall ist noch ausreichend Transversalmagnetisierung vorhanden um ein Signal an der Spule zu induzieren (WEISHAUPT et al. 2009).

**Tabelle 2: nach Weishaupt (2009): Absolute Werte von T1 und T2 (in ms) für verschiedene Gewebe**

| <b>Gewebe</b>   | <b>T1 (0,5 T)</b> | <b>T1 (1,5 T)</b> | <b>T2</b> |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Liquor          | 1800              | 2400              | 160       |
| Weißer Hirnsatz | 500               | 780               | 90        |
| Grauer Hirnsatz | 650               | 920               | 100       |
| Fettgewebe      | 210               | 260               | 80        |

### 2.2.1.6 Nomenklatur in der Magnetresonanztomographie

Zur Beschreibung der Befunde in der Magnetresonanztomographie aufgrund Signalintensitätsunterschieden werden die Begriffe: hypo-, iso- und hyperintens verwendet. Zwei Strukturen, die eine ähnliche Helligkeit aufweisen, werden als isointens bezeichnet. Als



hypointens bezeichnet man eine Struktur, die sich dunkler als das andere Gewebe präsentiert. Hyperintense Gewebe oder Läsionen stellen sich heller als ihre umliegende Strukturen dar (GAVIN et al. 2009).

### **2.2.2 Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie**

Als Kontrastmittel (KM) bezeichnet man Pharmazeutika, die die Signalintensitätsdifferenz zur Verbesserung der diagnostischen Informationen erhöhen. In der Diagnostik von Tumoren, Entzündungen, Ischämie und Traumata ist der Einsatz von MR-Kontrastmittel von großer Bedeutung. Die KM spielen auch eine große Rolle bei Untersuchung der Organperfusion und Organfunktion (REISER & SEMMLER 2002, LOHR 2007).

Man unterscheidet direkt oder indirekt wirkende Kontrastmittel. Bei direkter Wirkung wird die Protonendichte eines Gewebes geändert. Bei der indirekten Wirkung kommt es zur Veränderung des lokalen Magnetfeldes und dadurch zur Veränderung der T1- und/oder T2-Relaxationszeiten. Nicht das Kontrastmittel selbst wird dargestellt, sondern der Einfluss des KM auf das Relaxationsverhalten der Protonen in dessen Umgebung (REISER & SEMMLER 2002). Bei Veränderung des lokalen Magnetfeldes kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den unpaarten Elektronspins des KM und den umliegenden Wasserstoffkernen der Fett-, Wasser- und Eiweißmoleküle (WEISHAUPT et al. 2009).

Man unterscheidet paramagnetische, superparamagnetische und ferromagnetische KM. Paramagnetische KM bestehen aus Atomen oder Molekülen, die ungepaarte Elektronenorbitale in der äußeren Elektronenschale und dadurch ein magnetisches Moment besitzen. Viele Metallionen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{CO}^{2+}$ ,  $\text{CO}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$  und  $\text{Ni}^{3+}$  weisen diese Eigenschaft auf (WEISHAUPT et al. 2009). Zu den paramagnetischen KM gehören Gadolinium-Verbindungen. Diese Substanzen verkürzen besonders die T1-Zeit. Sie entziehen den angeregten Spins die Energie schneller als dies ohne KM passieren würde. Aus diesem Grund nimmt das Signal im MR-Bild zu. Diese KM werden als positive KM bezeichnet (REISER & SEMMLER 2009).

Superparamagnetische Kontrastmittel besitzen besonders ausgeprägte paramagnetische Eigenschaften. Da paramagnetische Ionen in einem Kristallgitter eingeordnet sind, kommt es zur Vervielfachung der magnetischen Momente. Superparamagnetische Kontrastmittel verkürzen T2-Zeit, weil sie lokale Feldinhomogenitäten verursachen. Es kommt zu einer

starken Dephasierung und Signalabnahme, besonders auf T2-gewichteten Bildern. Deswegen werden diese Substanzen als negative Kontrastmittel bezeichnet (WEISHAUPT et al. 2009).

Ferromagnetische KM bestehen aus Atomverbänden mit magnetischen Momenten, die über viele Atome gekoppelt sind. Die Kontrastmittel besitzen auch ohne äußeres Magnetfeld ein magnetisches Moment. Diese Kontrastmittel gehören auch zu negativen KM (WEISHAUPT et al. 2009).

Aufgrund der Art wie KM sich in einem Körper verteilen, unterscheidet man extrazelluläre, intravaskuläre, Hepatozyten-, Retikulo-Endotheliales-Systeme (RES)-, Lymphknoten-, Tumor- und antigenspezifische KM und Kompartimentfüller (WEISHAUPT et al. 2009).

Extrazelluläre Kontrastmittel sind wasserlöslich und verteilen sich im extrazellulären Raum des Körpers. Die meisten in der Klinik verwendete KM gehören zu dieser Gruppe, wie z. B. Gd-DOTA (Meglumin-Gadoterat), Handelsname: Dotarem<sup>®</sup> (GUERBET GmbH, Deutschland). Bei intravenöser Gabe verursachen sie eine Verkürzung der T1-Relaxationszeit und kommen bei T1-gewichteten Sequenzen zum Einsatz. Es kommt zur Signalzunahme aufgrund Gewebepfusion oder aufgrund einer unterbrochenen Kapillarschranke (Hirn, Auge, Rückenmark, Hoden). Es kommt zur schnellen Diffusion des KM ins Gewebe und zum Konzentrationsausgleich zwischen vaskulärem und interstitiellem Raum. Dotarem<sup>®</sup> wird in der T1 gewichteten Sequenzen in MRT-Untersuchung hyperintens dargestellt (REISER & SEMMLER 2002).

Intravaskuläre KM stellen Moleküle dar, die aufgrund ihrer Größe nicht aus dem Gefäßsystem diffundieren können. Bei Tumoren, Infektionen oder Trauma kommt es zu zur Zerstörung der Kapillarbarriere und dem Austritt vom KM. Zu dieser Gruppe gehören Gadolinium-Komplexe, die an z. B. Dextran gebunden sind oder Eisenoxydpartikel, die eine Kohlenhydrathülle besitzen. Diese KM werden häufiger bei der MR-Angiographie (Gefäßdarstellung) verwendet. Hepatozytenspezifische KM reichern sich in gesunden Hepatozyten an (REISER & SEMMLER 2002).

RES-spezifische KM werden durch das RES in der Leber und weniger ausgeprägt auch in der Milz phagozytiert. Aufgrund superparamagnetischer Eigenschaften kommt es zur einen T2-Verkürzung. Die Zellen, die Endorem<sup>®</sup> enthalten werden in der MRT-Untersuchung hypointens. Dadurch wird das gesunde Lebergewebe mit RES-Zellen dunkel (hypointens) und Neoplasien hell (hyperintens) dargestellt. T1-Verkürzung im vaskulären Kompartiment führt zu Signalzunahme. Zu dieser Gruppe zählt Endorem<sup>®</sup> (WEISHAUPT et al. 2009).

Zu der Gruppe der lymphknotenspezifischen KM gehört Sinerem<sup>®</sup>, der ultrakleine superparamagnetische Eisenoxydpartikel enthält. Sinerem<sup>®</sup> wird zur Diagnose von Lymphknotentumoren angewandt (LOHR 2007).

In der klinischen Anwendung werden die paramagnetischen und superparamagnetischen Substanzen aufgrund ihrer potenziellen Toxizität entweder mit Dextran oder Carboxydextran ummantelt oder in Komplexe gebunden (REIMER et al. 2004).

### 2.2.2.1 Endorem

Endorem<sup>®</sup> (GUERBET GmbH, Deutschland) ist ein MRT-Kontrastmittel, das zum Nachweis von Lebertumoren mittels MRT entwickelt wurde. Die erste Zulassung erfolgte im Jahr 1996. Endorem<sup>®</sup> enthält superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO). Im Kern besitzt Endorem<sup>®</sup>  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  oder  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , die von Dextran ummantelt sind (LOHR 2007). Dextran stabilisiert die Partikel und verhindert deren Aggregation (SYKOVA & JENDELOVA 2007). Dank der Kristallkonfiguration des festen Eisenoxids behält das Endorem<sup>®</sup> seine superparamagnetischen Eigenschaften bei. Es bilden sich Störungen des Magnetfelds um jedes Partikel und führen zu einem Signalabfall in den Geweben, die das Kontrastmittel enthalten (GUERBET Produktinformation). Daher werden diese Zellen in T2 gewichteten Sequenzen hypointens dargestellt.



Abbildung 3: Endoremmolekül nach Sykova, Jendelowa

Die Größe der Eisenkristalle liegt zwischen 4,3 bis 5,6 nm, wobei die ganze Partikel insgesamt 150 nm messen (BONNEMAIN 1996).

Endorem<sup>®</sup> wird langsam intravenös verabreicht und wird bevorzugt durch die Leber aufgenommen. Zwischen 30 Minuten und 6 Stunden liegt der maximale Aufnahmezeitraum. Das KM wird aus den Speicherorganen innerhalb von einigen Tagen eliminiert. Das Eisen wird normal im Körper im Verlauf von ca. 2 - 4 Wochen metabolisiert und in Hämoglobin eingebaut. Als Nebenwirkungen können anaphylaktoide Reaktionen, Kopfschmerzen, Blutdruckschwankung, Dyspnoe, Erbrechen und Rückenschmerzen auftreten. Unter den empfohlenen klinischen Bedingungen wurde ein gutes Verträglichkeitsprofil bei Tieren und Menschen bezüglich der Auswirkung auf das Herzkreislaufsystem, die Nieren und die Lunge bestätigt (GUERBET, Produktinformation). In den USA ist das Präparat unter dem Handelsnamen Feridex<sup>®</sup> (BAYER HEALTHCARE, USA) bekannt.

### **2.2.3 Labeling (Markierung) von Stammzellen**

Studien mit markierten Stammzellen werden bei neurologischen, kardiovaskulären, orthopädischen und bei Erkrankungen des Pankreas beschrieben. Auch bei zell-mediierten Tumorthérapien spielt Zellmarkierung eine große Rolle (AKINS et al. 2008).

Für die Zelltherapie stellt die Markierung von MSCs einen wichtigen Aspekt in Hinsicht auf korrekte Implantation der Zellen dar. Mit Hilfe der MRT-Untersuchung kann der Implantationsort verifiziert werden. Es wird vermutet, dass die MRT gestützte MSCs Injektion in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen wird (BULTE 2009).

Um die Stammzellen im MRT optimal darstellen zu können, müssen sie mit einem Mittel markiert werden, das den Kontrast von injizierten Zellen verstärkt. Dadurch wird die Unterscheidung von Wirtszellen ermöglicht. Die Kontrastmittel können entweder an der Zelloberfläche gebunden sein oder in der Zelle im Zytoplasma vorhanden sein. Für die extrazelluläre Markierung können immun-magnetische Microbeads verwendet werden. In diesem Fall sind die Microbeads mit einem Antikörper verbunden, der sich an spezielle Oberflächenantigene gewünschter Zellen heften kann. Da sie an die Zelloberfläche gebunden sind, beeinflussen sie Zellenlebensfähigkeit nicht. Die Inkubation in der Zellkultur ist nicht erforderlich (SYKOVA & JENDELOVA 2007).

Intrazelluläre Kontrastmittel enthalten Eisenpartikel wie MPIO (Mikron Sized Iron Oxide Particles), SPIO (Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles) oder USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles). MPIO besitzen ein Durchmesser von ca. 1 µm oder grösser, SPIO von ca. 50 - 150 nm und USPIO von 30 - 50 nm (WEISSLEDER et al. 1990,

SHAPIRO et al. 2005, THOREK & TSOURKAS 2008). Zu den SPIO-Kontrastmitteln zählt Endorem<sup>®</sup>. Endorem<sup>®</sup> kann von Zellen durch eine spontane Endozytose aufgenommen werden (SYKOVA, JENDELOVA 2007; KÜSTERMANN et al. 2007). Es kommt zur spontanen Aufnahme von sowohl positiv als auch negativ geladenen SPIO. Die Kontrastpartikel werden nicht nur durch die phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, sondern auch durch andere Zellen aufgenommen. Diese Eigenschaft wird zur Markierung von MSCs benutzt (BULTE 2009). Die SPIO-markierten Stammzellen zeigen eine unveränderte Lebensfähigkeit, ähnliche Proliferation im Vergleich zu der nicht markierten Kontrollgruppe und differenzieren in adipogene und osteogene Zellen. Die chondrogene Differenzierung wurde jedoch gehemmt (KOSTURA 2004). Im Gegensatz dazu zeigt ARBAB et al. (2004) eine normale chondrogene Differenzierung nach Markierung mit SPIO-Partikeln.

Ferucarbotran z. B. Resovist<sup>®</sup> (BAYER SCHERING PHARMA AG, Germany) enthält auch SPIO, die mit Carboxydextran ummantelt sind und werden zur Markierung von Stammzellen angewandt (KEDZIOREK & KRAITCHMANN 2010).

Zu den intrazellulären Kontrastmitteln die USPIO enthalten, zählt z. B. Sinerem<sup>®</sup> (GUERBET GmbH, Deutschland). Die Eisenpartikel sind kleiner als 50 nm und benötigen Transfektionsreagentien, um durch die Zelle aufgenommen zu werden. Die Transfektionsreagentien transportieren die Kontrastpartikel in die Zelle aufgrund elektrostatischer Interaktionen (BULTE 2009, KEDZIOREK & KRAITCHMANN 2010). Der Nachteil von den Transfektionsreagentien ist eine toxische Wirkung auf die Zelle bei höheren Konzentrationen. Bei zu niedriger Konzentration ist der Transport in die Zelle nicht ausreichend (SYKOVA & JENDELOVA 2006). Zu den seltener angewandten Transportmethoden von Kontrastmittelpartikeln in die Zelle zählt Elektroporation (WALCZAK et al. 2005). Bei dieser Methode wird eine kleine pulsierende elektrische Spannung verwendet (KEDZIOREK & KRAITCHMANN 2010).

### **2.2.3.1 Präklinische Studien mit markierten Stammzellen**

1992 beschreiben NORMAN und Mitarbeiter als erste den Einsatz der MRT zur Darstellung von mit superparamagnetischen Eisenpartikeln markierten Zelltransplantaten bei Ratten. In der Studie werden Eisenpartikel mit einem Antikörper an die Zelloberfläche gebunden. Mit einem 0,14 Tesla MRT-Gerät werden die Zellen nach 3 Wochen von dem Wirtsgewebe unterschieden. In Rahmen einer weiteren Studie bei Ratten mit kortikalen Gehirnläsionen

werden mit Endorem<sup>®</sup>-markierte humane und autologe MSCs implantiert. Eine Gruppe erhält eine Injektion in die kontralaterale Hemisphäre und die andere in die Femoralvene. Mittels einem 4,7 Tesla Spektrometer (BRUKER) werden die Ratten einmal pro Woche über einen Zeitraum von 3 bis 7 Wochen untersucht. Eine Woche nach der Implantation von MSCs können die markierten Zellen im Läsionsbereich als hypointenses Signal detektiert werden. Mittels Berliner Blaufärbung und PCR-Methoden wird bestätigt, dass es sich um die injizierten Stammzellen im Bereich der Läsionsstelle handelt. Es wird gezeigt, dass diese Zellen eine Migration zur Läsion zeigen (JENDELOVA et al. 2003, JENDELOVA et al. 2004).

In einer weiteren Studie werden Endorem<sup>®</sup>-markierte MSCs bei Ratten nach einem Rückenmarkstrauma intravenös injiziert. Nach 4 Wochen werden die Zellen mittels MRT-Untersuchung im Bereich der Läsion nachvollzogen. Die mit MSCs therapierten Ratten zeigen einen verbesserten Neurostatus im Vergleich mit den Kontrollratten (URDZIKOVA et al. 2006).

SYKOVA und JENDELOVA (2006) beschreiben den Einsatz von Endorem<sup>®</sup> und magnetischen *microbeads* zur Markierung der embryonalen und mesenchymalen Stammzellen bei Ratten mit kortikalen und spinalen Läsionen. Die Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen wandern nach intravenöser oder intracerebraler Transplantation zur Läsionsstelle. Innerhalb der ersten Woche migrieren die markierten Zellen in Richtung der Läsion. Die Zellen sind mindestens 30 Tage lang als hypointenses Signal mittels einer T2 gewichteten Sequenz darstellbar. Endorem<sup>®</sup> eignet sich zur Markierung von MSCs von Ratten, humanen MSCs, ESC von Mäusen und *olfactory ensheathing cells* (OECs) (JENDELOVA et al. 2003 und 2004).

NOHROUDI und Kollegen (2010) berichten über den Einsatz von mit MPIO markierten MSCs bei Ratten mit Gehirntumoren. Die markierten MSCs zeigen nach der Implantation in die kontralaterale Hemisphäre eine Migration in die Richtung der neoplastischen Veränderung. MPIO weisen ein sehr hohes Detektionspotenzial auf. Auch Zellen, die nur geringe Mengen an Eisenpartikel enthalten, sind in der MRT-Untersuchung darstellbar. Eine größere MPIOs - Menge hat einen deutlichen Einfluss auf das Migrationspotenzial und das Überlebenspotenzial von den markierten Zellen durch die Wirkung auf das Aktinzytoskelett (NOHROUDI et al. 2010)

KÜSTERMANN und Mitarbeiter (2008) vergleichen die Effizienz und Ausschleusung von mehreren Kontrastmitteln und den toxischen Effekt auf embryonale Stammzellen nach der

Markierung mit den SPIO (Endorem<sup>®</sup>) mit und ohne Transfektionsreagentien, den USPIO (Sinerem<sup>®</sup>) mit Transfektionsreagentien und den MPIOS (BANGS LABORATORIES Inc., USA). Die Markierungseffizienz und das Abgeben des Kontrastmittels durch die Zellen wird unter Einsatz eines 7,0 Tesla BRUKER Biospec in Agarphantomen untersucht. Die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen geben deutlich größere Mengen vom Kontrastmittel im Vergleich zu USPIO und MPIOS ab. Diese „Leakage“ von Endorem<sup>®</sup> ist schon innerhalb der ersten 24 Stunden feststellbar. Es wird kein toxischer Effekt auf die Proliferation durch Eisenpartikel beobachtet. Bei einer höheren Konzentration von Transfektionsreagentien wird ein negativer Einfluss auf die Proliferation festgestellt. Endorem<sup>®</sup> und Sinerem<sup>®</sup> werden in den Lysosomen gespeichert, die in der gesamten Zelle verteilt sind. MPIOS zeigen sich aufgrund der Toxizität und Größe der Partikel weniger für die Markierung von Zellen geeignet (KÜSTERMANN et al. 2008).

In Rahmen einer weiteren Studie wird bei zwei gesunden Hunden eine Injektion von mit Ferucarbotran (Resovist<sup>®</sup>) markierten Stammzellen in Arteria femoralis durchgeführt. Einen Tag nach der Applikation wird in einer 3 Tesla MRT-Untersuchung ein hypointenses Signal im Bereich der Nierenrinde feststellbar. Die Hypointensität ist noch über folgende 8 Tage zu sehen. Bei beiden Hunden verursacht die allogene MSCs Injektion eine glomeruläre Atrophie, eine tubulare Nekrose, eine Mineralisation und eine Fibrose in der histopathologisch untersuchten Niere. Die Nierenwerte in der klinischen Chemie bleiben jedoch unverändert (YOO et al. 2010).

### **2.2.3.2 Klinische Studien mit markierten Stammzellen**

Der erste Einsatz von mit SPIO-markierten dendritischen Zellen zur Immuntherapie bei Menschen mit einem Grad III Melanom wird im 2004 durch de VRIES (2004) beschrieben. Mit Hilfe eines 3 Tesla MRT können die markierten Zellen verfolgt werden. Bei 4 von 8 Patienten wird festgestellt, dass die Zellen unter Ultraschallkontrolle fälschlich in das umliegende Gewebe statt der Lymphknoten injiziert wurden und so kein therapeutischer Erfolg erreicht werden kann. Der Autor stellt die These auf, dass eine akkurate Zellapplikation bei der Zelltherapie mittels einer MRT-Untersuchung verifiziert werden muss. ZHOU (2006) zeigt unter Einsatz eines 3 Tesla MRT, dass mit Eisenpartikeln markierte neurale Zellen bei einem Mann nach Gehirntrauma über Zeit von 7 Wochen darstellbar sind. Eine weitere *Tracking Studie* wird bei Menschen mit einem insulinresistenten Diabetes

mellitus durchgeführt. Die Patienten nach der Transplantation von mit SPIO markierten Inselzellen brauchen keine Insulintherapie mehr. Die SPIO-Partikel scheinen keinen negativen Effekt auf die markierten Zellen auszuüben und sind in der MRT-Untersuchung darstellbar (TOSO et al. 2008).

### **2.2.3.3 Einschränkung von MRT-Tracking Studien**

MRT-*Tracking* Studien weisen Limitationen auf. Nach der Applikation von Zellen, ist in der MRT-Untersuchung eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen nicht möglich. Weiterhin können aus den abgestorbenen Zellen stammenden SPIO-Partikel durch Makrophagen aufgenommen werden und auf diese Art weiter im Körper verteilt werden. In vitro Studien haben gezeigt, dass mit SPIO markierten Zellen das Kontrastmittel spontan in das Medium abgeben. Dieses Phänomen wäre natürlich auch in vivo möglich. Falls die implantierten Zellen sich weiter im Gewebe teilen, sinkt auch Eisenpartikelgehalt pro Zelle. Das kann dazu führen, dass die Zellen nicht mehr detektierbar sind (BULTE 2009). Bei einem traumatischen Geschehen, das mit einer sekundären Blutung einhergeht, ist es sehr schwierig zwischen mit SPIO markierten Zellen und Blutderivaten zu unterscheiden. Blut und Blutprodukte stellen sich in der MRT ebenfalls hypointens dar (BULTE 2009). Auch Luft verursacht auch ein hypointenses Signal (KÜSTERMANN et al. 2008).

Zur Überprüfung der klinischen Sicherheit sind sowohl kurz- als auch langfristige Toxizitätsstudien notwendig (BERNSEN et al. 2010).

## **2.3 Zielsetzung der Studie**

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es zu überprüfen, ob kanine Stammzellen spontan das superparamagnetische MRT Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> (GUERBET GmbH, Deutschland) aufnehmen können und in welchem Anteil der Zelle sich die Endorem<sup>®</sup>-Partikel nach der Aufnahme in der Zelle befinden. Weiterhin wird untersucht, ob die Markierung die Zellteilung, das Zytoskelett und die Differenzierungsfähigkeit negativ beeinflusst. Des Weiteren wird bestimmt, wie viel Prozent von den Zellen tatsächlich nach ein, zwei und drei Wochen nach der Markierung noch Endorem<sup>®</sup> enthalten und wie lange diese markierten Stammzellen mit Hilfe eines Magnetresonanztomographen mit der Feldstärke 1 Tesla



dargestellt werden können. Es soll bestimmt werden, welche Sequenz sich besser zur Darstellung der markierten Zellen eignet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Liste der Chemikalien

Tabelle 3: Liste der Chemikalien

| NAME                                       | FIRMA; SITZ                                     |
|--|---|
| Accutase                                   | PAA, Pasching, Österreich                       |
| Agarose molecular grade                    | Bioline, USA                                    |
| Aluminiumsulfat-18-Hydrat                  | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Ascorbinsäure                              | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| β-Glycerophosphat                          | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Bleizitrat                                 | Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Deutschland    |
| Bovines Serum Albumin                      | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Caco-Dylat Puffer                          | Merck Schuhardt, Hohenbrunn, Deutschland        |
| CaCl <sub>2</sub> Hydrat                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Collagenase                                | Biochrom AG, Berlin, Deutschland                |
| Dexamethason                               | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| DMEM low glucose                           | Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland |
| DMP (2,4,6-Tris dimethylaminomethylphenol) | Serva, Heidelberg, Deutschland                  |
| DMSO                                       | AppliChem, Darmstadt, Deutschland               |
| EDTA                                       | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Endorem <sup>®</sup>                       | Guerbet, Sulzbach, Deutschland                  |
| Eosin                                      | Chromagesellschaft, Münster, Deutschland        |
| Epon                                       | Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland  |
| Essigsäure                                 | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Ethanol                                    | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Fetales Bovines Serum (FBS)                | PAA, Pasching, Österreich                       |
| Formalin                                   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                    |
| Glutaraldehyd                              | Agar Sceintific, Wetzlar, Deutschland           |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Glycidether 100               | Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland  |
| Hämatoxylin                   | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland              |
| Hoechst Farbstoff 33342       | Invitrogen, Deutschland                         |
| HCl                           | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Indometacin                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| ITS                           | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Kaisergelatine                | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Kaliumhexacyanoferrat         | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| MTT                           | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| MNA (Methylnodicanhydrid)     | Serva, Heidelberg, Deutschland                  |
| Natrium-Carbonat              | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Natriumpyruvat                | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| OsO <sub>4</sub>              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland               |
| Paraformaldehyd               | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Paraffin                      | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland               |
| PBS                           | Gibco life technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin       | AppliChem, Darmstadt, Deutschland               |
| Pikirinsäure                  | Fluka Analytical, Steinheim, Deutschland        |
| Phalloidin                    | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Prolin                        | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Pro Long Gold                 | Invitrogen, Deutschland                         |
| Red Oil                       | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Silbernitrat                  | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| TGF $\beta$                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland           |
| Triton X                      | Serva, Heidelberg, Deutschland                  |
| Uranylacetat                  | Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Deutschland    |
| Xylol                         | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |

### 3.1.2 Liste der Materialien und Geräte

**Tabelle 4: Liste der Materialien und Geräte**

|   |  |
|---|--|
| Chamberslide System                     | Thermo Fischer, Schwerte, Deutschland              |
| CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell 150  | Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland          |
| C3 Spule                                | Philips Medical System, Hamburg,<br>Deutschland    |
| Deckgläschen 15 mm                      | Menzel GmbH, Braunschweig,<br>Deutschland          |
| Deckgläschen 24-60 mm                   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| View Forum R6.3V1L7 SP1 2010            | Philips Medical System, Hamburg,<br>Deutschland    |
| 15 und 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                   |
| Fluoreszenzmikroskop Observer 2.1       | Zeiss; Oberkochen, Deutschland                     |
| Filter 70 µm                            | BD Falcon, Belgien                                 |
| Glaspipetten                            | Hirschmann, Eberstadt, Deutschland                 |
| Gyroscan Gerät                          | Phillips Medical System, Hamburg,<br>Deutschland   |
| Lichtmikroskop Type 090135006           | Leica Microsystems CMS, Wetzlar,<br>Deutschland    |
| Life cell imaging Apotome Observer 2.1  | Zeiss; Oberkochen, Deutschland                     |
| MACS Separations Column                 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,<br>Deutschland |
| Microplate reader Tecan Sunrise         | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz               |
| Mikrotom HM400                          | Microm GmbH, Walldorf, Deutschland                 |
| MiniMACS                                | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,<br>Deutschland |
| TEM-Mikroskop EM 109                    | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                     |
| Neubauerzählkammer                      | Marienfeld, Lauda-Königshofen,<br>Deutschland      |
| Objektträger                            | Carl Roth, KG, Karlsruhe, Deutschland              |
| Petrischale                             | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                   |

|  |   |
|--|---|
| Ultramikrotom Ultracut                                       | Reichert, München, Deutschland                            |
| Wasserbad  | Gesellschaft für Labortechnik , Burgwedel,<br>Deutschland |
| 6 Well Platte  | Greiner, bio-one, Frickenhausen,<br>Deutschland           |
| 24 Well Platte   | Greiner, bio-one, Frickenhausen,<br>Deutschland           |
| 96 Well Platte   | Greiner, bio-one, Frickenhausen,<br>Deutschland           |
| Zentrifuge Megafuge 11R                                      | Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland                 |
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> und 25 cm <sup>2</sup> | Greiner bio-one, Frickenhausen,<br>Deutschland            |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Gewinnung der Stammzellen aus kaninem Fettgewebe

Die zur Untersuchung vorliegenden Stammzellen werden aus Hundefettgewebe (dem Unterhautfett oder Bauchfett) isoliert. Es wird Fettgewebe verwendet, das bei Operationen (elektiven Eingriffen) in der Klinik für Kleintiere - Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur besseren Übersicht im Operationssitus reseziert und verworfen wurde. Proben von an tumorerkranken Tieren werden ausgeschlossen. Im Rahmen der vorliegenden Studie werden Stammzellen aus dem Fettgewebe aus 8 Proben isoliert. Eine Probe wird aufgrund einer Tumorerkrankung aus der Studie ausgeschlossen.

Die Stammzellen aus dem Fettgewebe werden nach dem Protokoll von REICH und Mitarbeiter (2012) isoliert. Ein ca. 1 x 1 x 1 cm Fettgewebestück wird jeweils zum Transport in eine PBS-Lösung mit 1 % Penicillin/Streptomycin verbracht. Die weitere Bearbeitung erfolgt direkt nach der Fettentnahme in der Zellkultur. Das Fettgewebe wird in ein 15 ml Falcon Zentrifugenröhrchen umgesetzt, das bis 10 ml mit einer PBS-Lösung aufgefüllt wird. Danach erfolgt eine Zentrifugation 5 Minuten bei 260 g (g = Erdbeschleunigung). Das Fettgewebe wird dann mit einer sterilen Skalpellklinge zerkleinert und in ein neues Falcon Zentrifugenröhrchen gebracht. Im Anschluss erfolgt eine 2 malige Zentrifugation bei 260 g über den Zeitraum von 5 Minuten. Die PBS-Lösung sowie Zellsuspension werden abgesaugt

und verworfen. Das Fettgewebe wird nun mittels Collagenase I Lösung mit Bovinem Serum Albumin (BSA) (1 mg Collagenase I/1 ml PBS und 10 mg BSA/1 ml PBS) in einem Wärmeschrank über ca. 30 Minuten bei der Temperatur von 37 °Celsius verdaut. Danach wird das verdaute Fettgewebe bei 300 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Nicht verdautes Fett und der Überstand werden verworfen. Das Pellet wird mit PBS-Lösung aufsuspendiert, durch ein 70 µm Filter in ein neues Falcon gepresst und mit einer PBS-Lösung bis 15 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wird bei 260 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Im Anschluss wird das Pellet in 1 ml DMEM und 10 % FBS (Fetales Bovines Serum) aufsuspendiert. Es wird eine Zellzahl pro 1 ml bestimmt. Die Zellen werden mit 250.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in einer gewünschten Flasche ausplattiert.

### **3.2.2 Inkubation von Stammzellen**

Die isolierten Zellen werden am Anfang in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 5 ml Medium und danach in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflächen in 15 ml Medium inkubiert. Das Standardmedium enthält DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Stammzellen werden bei 37 °C und 4 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Der Medienwechsel erfolgt zweimal pro Woche. Das verbrauchte Medium wird mittels einer Pipette abgesaugt und die Stammzellen werden mit PBS gespült. Ein frisches Medium wird angesetzt. Wenn die Stammzellen mehr als 80 % des Flaschenbodens bedecken, werden sie abgelöst und für die weiteren Versuche passagiert. Die Zellen vom Hd 127/10 und 128/10 werden im flüssigen Stickstoff gelagert und vor den weiteren Versuchen aufgetaut. Die anderen Proben werden direkt nach der Isolation weiter verwendet.

### **3.2.3 Ablösen von Stammzellen von dem Flaschenboden**

Zum Ablösen der Stammzellen wird Accutase verwendet. Das Medium wird zuerst mit einer Glaspipette abgesaugt. Die Zellen werden mit PBS gespült. Für das Ablösen werden für eine 25 cm<sup>2</sup> Fläche 3ml und für eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 6 ml Accutase benutzt. Es erfolgt eine Inkubation mit Accutase während ca. 3 - 4 Minuten im Brutschrank. Die abgelösten Zellen werden in ein Falcon Zentrifugenröhrchen umgesetzt und mit einem FBS-haltigem

Inkubationsmedium gefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Stammzellen werden gezählt.

### **3.2.4 Zählen von Stammzellen**

Die Zellzahl wird mit Hilfe von einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wird eine Zellmenge pro 1 ml berechnet. Nach dem Ablösen werden die Zellen in 1 ml Medium aufsuspendiert. Von der Lösung werden 10 - 15 µl in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Es werden 2 große Eckquadrate gezählt. Ein Eckquadrat besteht aus 16 kleinen Quadraten. Es wird ein Mittelwert der Zellen in großen Eckquadraten bestimmt. Die Zellzahl pro 1 ml wird anhand des Mittelwertes folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

### **3.2.5 In vitro Untersuchung**

Die Stammzellen werden nach erfolgreicher Isolation und Anzucht mit Endorem<sup>®</sup> markiert. Es werden mehrere Untersuchungen durchgeführt, um den Erfolg der Markierung zu überprüfen. Des Weiteren wird der Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf die Proliferation, Differenzierung, sowie der Ausbildung der Zellorganellen und des Zytoskeletts bestimmt. Zusätzlich wird im zeitlichen Verlauf die Anzahl der markierten und nicht markierten Zellen berechnet. Die Stammzellen werden zusätzlich zu drei Zeitpunkten im MRT untersucht, um Signalveränderungen im zeitlichen Verlauf zu beobachten.

#### **3.2.5.1 Stammzellenmarkierung mit Endorem<sup>®</sup>**

##### **3.2.5.1.1 Vorversuche:**

In Rahmen der Vorversuche wurde eine optimale Markierungskonzentration von Endorem<sup>®</sup> zur Markierung der kaninen Stammzellen aus dem Fettgewebe bestimmt. Die Stammzellen

werden von 2 unterschiedlichen Hunden jeweils mit 10  $\mu\text{l}$  (SPIO = 158  $\mu\text{g/ml}$ ; Fe = 112  $\mu\text{g/ml}$ ), 28,35  $\mu\text{l}$  (SPIO = 448  $\mu\text{g/ml}$ ; Fe = 319,2  $\mu\text{g/ml}$ ) und 40  $\mu\text{l}$  (SPIO = 632,4  $\mu\text{g/ml}$ ; Fe = 448  $\mu\text{g/ml}$ ) Endorem<sup>®</sup> über 24 Stunden und danach weiter ohne Endorem<sup>®</sup> inkubiert. Es erfolgt eine Verifizierung der Zellbeladung mit der Berliner Blau Färbung. Bei einer Endorem<sup>®</sup>-Konzentration von 28,35  $\mu\text{l}$  wird jede Zelle markiert. Weiterhin scheint bei dieser Konzentration die Zellteilung im *Life Cell Imaging* (Axio Observer 2.1 ZEISS) über den Zeitraum von 24 Stunden unbeeinflusst zu bleiben. Aus diesen Gründen wird in der vorliegenden Studie diese Konzentration verwendet.



Abbildung 4: Endorem<sup>®</sup>-Flasche

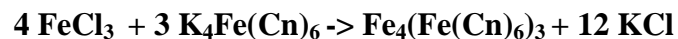
### 3.2.5.1.2 Versuche:

Die abgelösten Stammzellen werden neu für weitere Versuche ausplattiert. Nach 3 Tagen erfolgt eine Zellmarkierung mit Endorem<sup>®</sup> (Guerbet). Das Standardmedium wird mit Endorem<sup>®</sup> gemischt (28,35  $\mu\text{l}$  Endorem<sup>®</sup> auf 1 ml Medium). Die Stammzellen werden mit Medium und mit Endorem<sup>®</sup> über 24 Stunden inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und verworfen. Die Stammzellen werden mit PBS gespült und weiter nur mit dem Standardmedium weiter in der Zellkultur inkubiert.



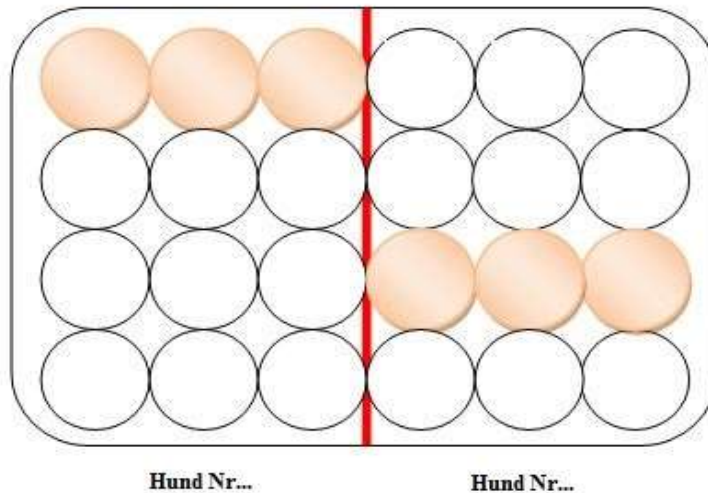
### 3.2.5.2 Berliner Blau Färbung

Um den Erfolg der Markierung zu überprüfen, wird eine Berliner Blau Färbung durchgeführt. Mit Hilfe von dieser Färbung können die aufgenommenen Eisenpartikel (Endorem<sup>®</sup>) nachgewiesen werden. Die Berliner Blau Färbung stellt eine histochemische Methode zur Detektion von dreiwertigem Eisen dar, die schon von Perls 1867 eingeführt wurde. Die chemische Reaktion folgt der Formel (MULISCH & WELSCH 2010):



Die abgelösten Zellen werden in vier 24-Wellplatten passagiert. Es werden Zellen von 2 unterschiedlichen Hunden in der gleichen Platte inkubiert, wie in der Abb. 5 dargestellt. Die Zellen werden nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung in der Platte Nummer 1: 3 Tage lang, in der Platte Nummer 2: 1 Woche, in der Platte Nummer 3: 2 Wochen, in der Platte Nummer 4: 3 Wochen mit Standardmedium inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgt jeweils eine Berliner Blau Färbung.

Berliner Blau Lösung wird frisch angesetzt. 3 ml 2 % Kaliumhexacyanoferrat (II) wird mit gleicher Menge 1 % HCl vermischt. Die Stammzellen werden nach der Entfernung des Mediums und Spülung mit Paraformaldehyd über 12 Minuten fixiert. Nach einer Spülung mit bidestilliertem Wasser wird die Berliner Blau Lösung auf die Zellen gebracht. Nach 20 Minuten wird die Lösung entfernt und die Zellen werden erneut zweimalig mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wird eine Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung auf die Zellen gebracht. Auf den Präparaten wird das dreiwertige Eisen blau und Zellkerne rot dargestellt.



**Abbildung 5: 24 Wellplatte mit Endorem<sup>®</sup>-markierten MSCs für Berliner Blau Färbung**

Die Präparate werden lichtmikroskopisch (Axiophot ZEISS) bei einer Vergrößerung von 12,5 ausgewertet. Es werden pro Vergrößerung 3 Fotos mit einer Camera (DFC320 LEICA) angefertigt.

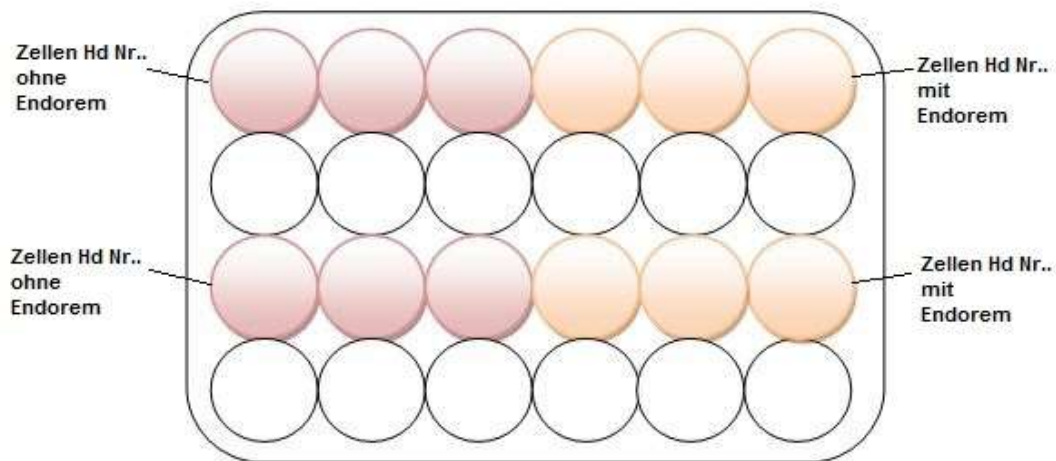
### 3.2.5.3 Phalloidinfärbung

Die Phalloidinfärbung wird durchgeführt, um den Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf das Zytoskelett der markierten Zellen zu untersuchen und mit nicht markierten Stammzellen vergleichen zu können. Phalloidin gehört zu Phallotoxinen und wird aus dem giftigen Pilz *Amanita phalloides* isoliert. Diese Substanz hat die besondere Eigenschaft, an F-Aktinfilamenten zu binden, wodurch die Aktinfilamente stabilisiert werden. Das ermöglicht eine Untersuchung der Aktinverteilung in den Zellen. Phalloidin wird mit einem fluoreszierenden Marker konjugiert und nach der Bindung an die Aktinfilamente, kann sie in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (SIGMA ALDRICH GmbH, Deutschland, Produktinformation).

Die Stammzellen werden in einer 24 Well Platte (6 Wells pro Hund) mit einer Dichte von 3800 Zellen pro Well auf Deckglässchen ausplattiert. 3 Wells pro Hund werden mit Endorem<sup>®</sup> markiert. Die restlichen 3 (Kontrollgruppe) werden ohne Endorem<sup>®</sup> inkubiert. Nach 7 Tagen werden die Glasplättchen mit den Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und es

erfolgt eine Permeabilisierung der Zellmembran mit einer 1 % Tritonlösung. Danach wird eine Färbung mit Phalloidin über 30 Minuten in dunkler Umgebung durchgeführt. Um Zellkerne darstellen zu können, werden die Zellen mit einem Höchst<sup>®</sup> Farbstoff gefärbt. Die fertigen Präparate werden mittels eines Eindeckmittels Pro Long Gold<sup>®</sup> eingedeckt.

Das Phalloidin färbt die Aktinfilamente grün an und die Kerne werden durch den Hoechstfarbstoff<sup>®</sup> blau gefärbt. Die Präparate werden mit Hilfe von einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer 2.1 ZEISS) untersucht. Die Aktinfilamente von markierten und nichtmarkierten Zellen werden mit einander verglichen und fotografiert (100- und 400-er Vergrößerung).



**Abbildung 6: 24 Wellplatte mit Endorem<sup>®</sup>-markierten MSCs und Kontrollgruppe für Phalloidin-Färbung**

### 3.2.5.4 MACS<sup>®</sup>-Zellsortierung

Die MACS<sup>®</sup>-Zellsortierung (MILTENYI BIOTEC GmbH, Deutschland) wurde zur magnetischen Zellselektion entwickelt. Zellen, die vorher mit Antikörpern und daran gebundenen Microbeads markiert wurden, können von den restlichen Zellen getrennt werden. Ein MACS<sup>®</sup>-System enthält eine MACS<sup>®</sup>-Säule, die zusammen mit einem MiniMACS<sup>®</sup>-Separator ein starkes Magnetfeld erzeugt. In der vorliegenden Studie werden keine Antikörper-Mikrobeads-Konjugate zur Trennung von den Zellen verwendet. Die mit supraparamagnetischen Partikeln (Endorem<sup>®</sup>) markierten Zellen bleiben jedoch aufgrund der Wirkung von magnetischen Kräften in der MACS<sup>®</sup>-Säule. Im Gegensatz dazu fließen die

nicht markierten Zellen durch die MACS<sup>®</sup>-Säule. MACS<sup>®</sup>-Sortierung wird durchgeführt, um den prozentuellen Gehalt von mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen im zeitlichen Verlauf bestimmen zu können. Die Zellen werden mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 3 25 cm<sup>2</sup> Flaschen ausplattiert und im Standardmedium inkubiert. Ein, zwei und drei Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung erfolgt die Zellsortierung. Nach Ablösen der Zellen werden sie bei 110 g 5 Minuten zentrifugiert. Das weitere Vorgehen wird laut der Gebrauchsanleitung fortgesetzt. Das Pellet wird in 500 µl eines MACS<sup>®</sup>-Puffers gelöst. Das MACS<sup>®</sup>-Puffer wird mit 0,017 g EDTA (E6758), 0,15 g BSA und 30 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> angesetzt. Die MACS<sup>®</sup>-Säule wird mit 500 µl Puffer gespült. Danach wird die Zellsuspension in die MACS<sup>®</sup>-Säule gebracht. Nach dem Durchlaufen von Zellen wird die Säule dreimal nachgespült. Die Zellen werden in ein 15 ml Falconröhrchen aufgefangen. Hierbei handelt es sich um die nicht markierte Zellfraktion. Nach der Entfernung der Säule aus dem MiniMACS<sup>®</sup>-Separator wird sie auf ein neues Falcon aufgesetzt und mit 1 ml Puffer gespült. Die Zellen gehören zur markierten Fraktion. Beide Fraktionen werden bei 110 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach werden die Zellen mit Hilfe der Neubauerzählkammer ausgezählt. Es wird der prozentuale Anteil der markierten und nicht markierten Zellen bestimmt.



**Abbildung 7: Mini MACS-System der Firma Miletnyi Biotec**

### 3.2.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Um die Verteilung von Endorem<sup>®</sup> genau in jeder einzelnen Zelle darstellen zu können, wird eine ultrstrukturelle Untersuchung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) werden die Zellen von 4 Hunden mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einem Chamber Slide System ausplattiert. Nach der Markierung mit Endorem<sup>®</sup> werden die Zellen in dem Standardmedium eine und drei Wochen (Proben Hd 127/10 und Hd 128/10) und zwei und drei Wochen (Proben Hd 131/12 und 132/12) inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Fixierung der Zellen mit Yellow-Fix (siehe Seite 42) über den Zeitraum von 45 Minuten. Danach werden die Zellen dreimal für 10 Minuten in Cacodylatpuffer gewaschen. Nach dreimaliger Spülung mit PBS wird von den Chamber Slides das Gerüst entfernt. Danach werden die Zellen in einer 1 % Osmium-Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer 10 Minuten nachfixiert und dreimal mit 0,1 M Cacodylat Puffer gewaschen. Weiter wird die Probe in aufsteigender Alkoholreihe (50, 70, 80, 96, 3 x 100 %) entwässert. Danach erfolgen die Schritte der Epon einbettung. Zunächst wird der Objektträger mit den Zellen für 1 Stunde in einer 1:1 Epon-Ethanollösung bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt eine weitere Inkubation 1 Stunde mit 3:1 Epon -Ethanollösung. Im Anschluss wird eine reine Eponlösung zunächst für eine Stunde und dann über die Nacht auf die Zellen gegeben und im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird weiter reines Epon auf die Zellen gebracht. Danach erfolgt eine Aushärtung des Kunstoffs bei 60 °C in einem Wärmeschrank für 48 Stunden. Nach dieser Zeit werden Semidünn-Schnitte (1 µm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms der Firma Reichert Ultracut angefertigt und danach nach Richardson gefärbt. Danach werden Ultradünn-Schnitte (70 - 90 nm) vorbereitet. Im nächsten Schritt werden die Eponschnitte nach Kontrastierung mit 0,2 % Bleizitrat und 0,5 % Uranylacetat auf ein Kupfernetz aufgezogen. Die fertigen Präparate werden mithilfe der Elektronmikroskopie, TEM 109 der Firma Zeiss untersucht. Es werden Bilder mit einer Digitalkamera (DFC320 LEICA) aufgenommen.

#### Herstellung von Epon (SOMMER 1993):

|  |        |
|--|--------|
| Glycidether 100                                      | 500 ml |
| DDSA (Dodecanylbernsteinsäureanhydrid) - Weichmacher | 100 g  |

|  |        |
|--|--------|
| MNA (Methylnodicanhydrid) - Härter                           | 100 ml |
| DMP (2, 4, 6-Tris dimethylaminomethylphenol) - Beschleuniger | 100 ml |

Herstellung von Yellow Fix:

2 % Paraformaldehyd

0,1 m Na - Cacodylatpuffer

0,02 % Pikrinsäure

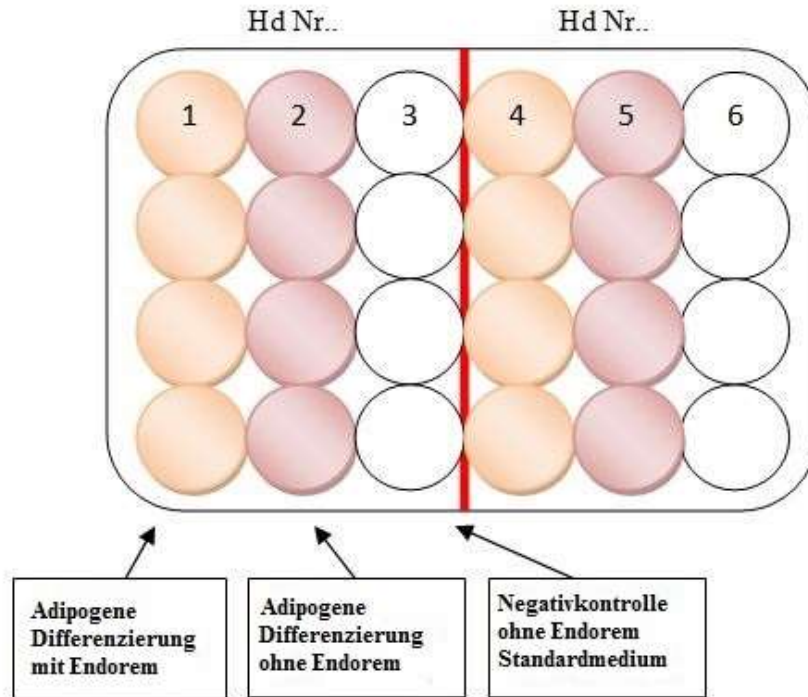
2 % Glutaraldehyd

### **3.2.5.6 Untersuchung der Multipotenz der Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen**

Um den Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf die Multipotenzfähigkeit der Zellen zu untersuchen, werden die Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen einer osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung unterzogen. Gleichzeitig werden Stammzellen ohne Endorem<sup>®</sup> differenziert und mit der ersten Gruppe verglichen. In einer Kontrollgruppe (Negativkontrolle) werden die Zellen ohne Differenzierungsmedium kultiviert, um eine spontane Differenzierung auszuschliessen.

#### **3.2.5.6.1 Adipogene Differenzierung, Red Oil Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung**

Für die adipogene Differenzierung werden die Stammzellen mit einer Dichte von 8000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 24 Wellplatte auf Deckgläser (15 mm Durchmesser) ausplattiert, wie auf der Schemazeichnung dargestellt ist.



**ZU/Abbildung 8: 24 Wellplatte für die adipogene Differenzierung**

Die Stammzellen werden wie folgt ca. 2 Wochen inkubiert:

Reihe Nr.1 und 4: die Stammzellen mit Endorem<sup>®</sup> markiert und mit dem adipogenem Medium versetzt

Reihe Nr.2 und 5: die Stammzellen ohne Endorem<sup>®</sup> und mit adipogenem Medium kultiviert

Reihe Nr.3 und 6: die Stammzellen ohne Endorem<sup>®</sup> und mit Standardmedium kultiviert (Negativkontrolle)

Das adipogene Medium enthält in 10 ml:

DMEM 1 g/l Glucose: 8840 µl

FBS: 1000 µl

P/S: 100 µl

Dexamethasone: 10 µl

ITS 50 µl

und immer frisch zu dem Medium angesetzt:

Indomethacin (10 mg/ml) 3,6 µl in 500 µl

IBMX (10 mg/ml) 5,5 µl in 500 µl

Nach ca. 2 Wochen werden die Zellen auf Deckgläschen mit 4 % Formalinlösung fixiert.

Danach erfolgt die Färbung mit der Red Oil O Lösung für 15 Minuten in dunkler Umgebung.

Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser werden die Zellen mit Hämatoxin nach Meyer ca. 10 Sekunden gegengefärbt. Anschließend werden die Zellen in warmen Leitungswasser 5-10 Minuten gebläut und danach mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Präparate werden in Kaisers-Gelatine eingebettet.

Oil Red O Lösung:

*Die Stammlösung (100 ml):*

100 ml 99 % Isopropanol auf 60 °C erwärmen

0,5 g Oil Red dazu geben

24 Stunden auf dem Rüttler stehen lassen

Lösung filtrieren

*Die Gebrauchslösung (50 ml):*

30 ml frisch filtrierte Stammlösung

mit 20 ml destilliertem Wasser vermischen

Lösung filtrieren

Hämatoxin nach Meyer:

1000 ml Aqua dest

1 g Hämatoxin

200 mg Natriumjodat

50 g Kalialaun

50 g Chlorhydrat

1 g Zitronensäure

Die Oil Red Färbung dient zum Nachweis von Neutralfetten in den Zellen. Die Zellkerne werden blau-violett, Kernkörperchen dunkel blau, Fettvakuolen rot und Zytoplasma blass blau-violett gefärbt.



### 3.2.5.6.2 Osteogene Differenzierung, von Kossa Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung werden die Stammzellen von den Hunden 133/12 und 134/12 mit einer Dichte von 8000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 24 Wellplatte auf Deckgläser (Durchmesser von 15 mm) ausplattiert, wie auf der Schemazeichnung dargestellt:

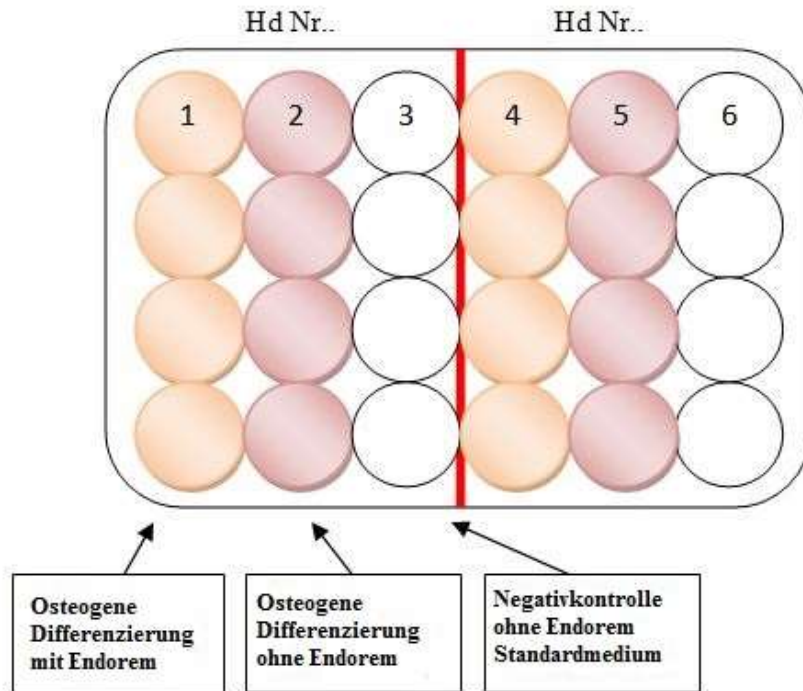


Abbildung 9: 24 Well Platte für die osteogene Differenzierung

Die Stammzellen werden wie folgt ca. 3 Wochen inkubiert:

Reihe Nr.1 und 4: die Stammzellen mit Endorem<sup>®</sup>-markiert und mit dem osteogenem

Medium Reihe Nr.2 und 5: die Stammzellen ohne Endorem<sup>®</sup> und mit osteogenem Medium

Reihe Nr.3 und 6: die Stammzellen ohne Endorem<sup>®</sup> und mit Standardmedium

(Negativkontrolle)

Das osteogene Medium enthält in 10ml:

DMEM 1 g/l Glucose 7779 µl

FBS 1000 µl

P/S 100 µl

|  |              |
|--|--------------|
| Dexamethason 1 mM                            | 1 $\mu$ l    |
| $\beta$ -Glycerolphosphat 100 mM             | 1000 $\mu$ l |
| Ascorbinsäure 5 mM                           | 120 $\mu$ l  |
| CaCl <sub>2</sub> in DMEM (8,674 mg in 1 ml) | 1000 $\mu$ l |

Nach ca. 3 Wochen Inkubationszeit werden die Zellen mit 4 % Formalin für 10 Minuten fixiert. Nach dem Spülen mit bidestilliertem Wasser werden die Zellen mit einer 5 % Silbernitrat lösung für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit bidestilliertem Wasser wird auf die Zellen eine 5 % Natrium-Carbonat-Formaldehydlösung für 5 Minuten aufgebracht. Nach dem wiederholten Spülen erfolgt eine Inkubation mit Farmers Reducer Lösung für 30 Sekunden. Anschließend wird eine Gegenfärbung mit der Kernechtrotlösung durchgeführt. Die Präparate werden mit Kaiser's Gelatine eingedeckt.

Die Von-Kossa-Färbung dient zum Nachweis des Calciums in dem Extrazellulärmatrix des Knochengewebes, was als schwarze Areale dargestellt werden kann. Die Kerne werden rot gefärbt und das Zytoplasma gelb bis rot.

### **3.2.5.6.3 Chondrogene Differenzierung, Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung**

Für die chondrogene Differenzierung werden 500 000 Stammzellen pro 15 ml Falcon Röhrchen verwendet und zunächst im Standardmedium inkubiert.

Insgesamt werden 3 Falcon Röhrchen pro Tier vorbereitet. Es werden 2 Proben mit Stammzellen auf Knorpelbildung untersucht.

Nachdem sich ein Zellpellet gebildet hat, werden die Stammzellen gewaschen und wie folgt ca. 4 Wochen inkubiert. Die Stammzellen im Falcon Röhrchen Nr. 1 werden mit Endorem<sup>®</sup> markiert. Die Stammzellen vom Hund Nr. 131 werden mit dem Fischkollagen und vom Hd. Nr. 133 mit *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) inkubiert. Das Medium wird 2-mal wöchentlich gewechselt.

Nach ca. 4 Wochen werden die Pellets mit PBS gewaschen und in 4 % Formalinlösung für eine Stunde fixiert. Danach werden die Pellets in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschliessend werden die Pallets mit Xylol für eine Stunde behandelt. Danach werden sie in Paraffin fixiert, geschnitten und auf einen Objektträger verbracht.

Zum Nachweis der sauren Mucopolysaccharide wird eine Alcianblau-Färbung verwendet.

Die Objektträger werden in absteigender Alkoholreihe und danach in 3 % Essigsäure inkubiert. Die Präparate werden mit Alcianblau über 30 Minuten gefärbt. Nach einer Wasserspülung erfolgt eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat über 5 Minuten. Nun werden die Präparate mit Wasser gespült, entwässert und eingedeckt. Die sauren Mucopolisaccharide werden blau, Kerne rot und der Hintergrund rosa gefärbt.

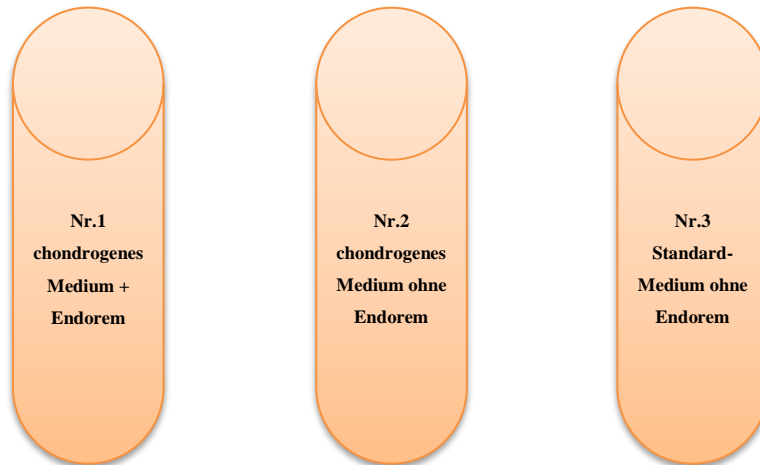


Abbildung 10: 15ml Falconröhrchen für die chondrogene Differenzierung

Das chondrogene Medium enthält in 10ml:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| DMEM 1 g/l Glucose   | 8779 µl |
| P/S                  | 100 µl  |
| Dexamethason 1 mM    | 1 µl    |
| ITS                  | 100 µl  |
| Natriumpyruvat 27 mM | 333 µl  |
| Ascorbinsäure 5 mM   | 333 µl  |
| Prolin10mM           | 333 µl  |

**und:**

TGF-β 5 µl auf 495 µl Medium

**oder:**

Fischkollagen 5mg

### 3.2.5.7 MTT-Test

Der MTT-Test wird zur Bestimmung der Zellzytotoxizität und Zellproliferation benutzt. Die Stammzellen werden mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) behandelt. Der MTT Test gehört zu den kolorimetrischen Assays und wurde von MOSMANN (1983) beschrieben. MTT ist ein Tetrazoliumsalm, das eine gelbe Farbe besitzt und membrangängig ist. Der gelbe Farbstoff wird durch die Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien durch Dehydrogenasen reduziert. Es entstehen dadurch lilafarbige Formazan-Kristalle, die nicht mehr membrandurchgängig sind. Da diese Reduktion nur in den Zellen mit funktionierenden Mitochondrien stattfindet, korreliert die Formazanmenge direkt mit Zellzahl. Nach Lyse der Zelle und Solubilisierung der Kristalle kann der Farbstoff durch kolorimetrische Messung quantifiziert werden. Der Anzahl an teilenden Zellen ist direkt proportional zur Zahl der gebildeten Formazankristalle. Anhand einer Absorptionsmessung der Lilafärbung, kann man den Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe und so zum Beispiel die Lebensfähigkeit der Zellen nach Behandlung mit einer potenziellen toxischen Substanz bestimmen (BERRIDGE et al. 1996; BERNSEN et al. 2009).

In der vorliegenden Studie wird der Einfluss vom Endorem<sup>®</sup> auf das Überleben und Proliferationsfähigkeit von Zellen untersucht.

Die Stammzellen von Hd 133/12 und 134/12 werden in zwei 24 Wellplatten mit einer Dichte von 28 500 Zellen/Well (6 Wells/Hund) ausplattiert. Nach der 24 stündigen Inkubation mit Standardmedium wird die Hälfte der Zellen mit Endorem<sup>®</sup> markiert. Die Zellen mit und ohne Endorem<sup>®</sup> werden weitere 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wird das alte Medium abgesaugt. Eine Platte wird mit 0,5 mg/ml MTT-Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> 4 Stunden inkubiert. Danach wird das MTT-Medium abgesaugt. Es kommen danach 200 µl DMSO Lösung auf die Zellen für 10 Minuten. Es entsteht eine Lila-Färbung. Die lilafarbene Lösung wird in eine 96 Well Platte pipettiert und es wird die Absorption bei 570 nm mit Hilfe eines Spektrometers (Tecan Sunrise<sup>®</sup> TECAN Deutschland GmbH) gemessen. Die Werte entsprechen dem Zeitpunkt 24 Stunden nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung.

Nach weiteren 24 Stunden wird das gleiche Verfahren mit der anderen Platte durchgeführt. Die Absorptionsmessung entspricht dem Zeitpunkt 48 Stunden nach der Markierung.

### 3.2.6 MRT Untersuchung

#### 3.2.6.1 Vorbereitung des Agarosegels

Es wird eine flüssige 0,6 % Agaroselösung mit 1,5 g Agarosepulver und 250 ml PBS vorbereitet. In eine Kunststoff-Petrischale (Durchmesser von 14 cm) wird ein Gel (Dicke von 1,8 cm) mit 5 grossen Löchern (Durchmesser von 0,8 cm) und einem kleinen Loch (Durchmesser von 0,3 cm) zur Orientierung gegossen (in Abb. 12 dargestellt).

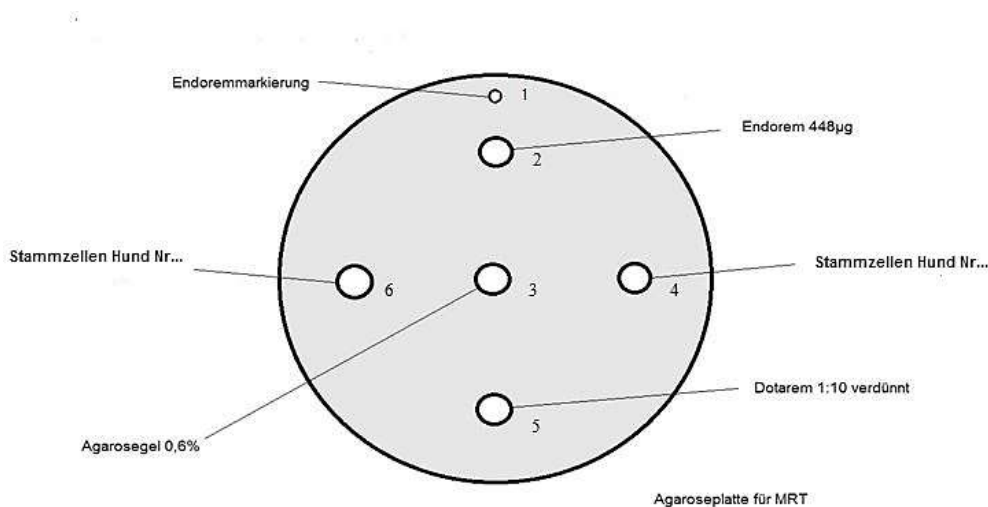


Abbildung 11: Agaroseplatte

Beschriftung:

- 1 Agarose mit Endorem<sup>®</sup> (zur Orientierung)
- 2 Agarose mit Endorem<sup>®</sup> (28,35 µl Endorem<sup>®</sup> auf 1000 µl Agarose)
- 3 Agarose 0,6 % (Kontrollprobe)
- 4 Stammzellen Hd Nr.. in 0,6 % Agarosegel
- 5 Dotarem<sup>®</sup> mit Agarose: 1:10 oder 1:100 verdünnt
- 6 Stammzellen Hd Nr.. in 0,6 % Agarosegel

Agaroseplatten mit 2 Proben die Stammzellen enthalten (mit Ausnahme von Probe 130/11) werden gleichzeitig untersucht:

Untersuchung Nr. 1: Hund 127/10 und 128/10

Untersuchung Nr. 2: Hund 130/11

Untersuchung Nr. 3: Hund 131/11 und 132/11

Untersuchung Nr. 4: Hund 133/12 und 134/12

Die Stammzellen jedes Hundes werden nach einer, zwei und drei Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung mittels Accutase abgelöst. Die Stammzellen werden jeweils in 0,5 ml flüssige 0,6 % Agaroselösung gebracht und gemischt. Die Löcher Nr. 4 und 6 werden mit der Zelllösung gefüllt. Die Agarose wird bei Raumtemperatur nach wenigen Minuten fest.

### 3.2.6.2 Durchführung der MRT-Untersuchung

Die MRT-Untersuchung von der oben beschriebenen Agaroseplatten wird mit Hilfe eines Magnetresonanztomographen (Gyroscan Intera, 1 Tesla, Philips Medical System GmbH, Deutschland) eine, zwei und drei Wochen post Endorem<sup>®</sup>-Markierung durchgeführt. Für die Untersuchung wird eine Oberflächenspule (C3) der Firma Philips Medical System verwendet. Es werden dorsalorientierte T2 FFE (Gradientenecho) und T2 TSE (Spinecho) Sequenzen verwendet.



Abbildung 12: MRT System der Firma Philips Medical System (Hamburg)



**Abbildung 13: C3 Spule der Firma Philips Medical System (Hamburg)**

Sequenzparameter:

T2 FFE dorsal:

FOV 140 mm  
 TR 200 ms  
 TE 21 ms  
 17 slices  
 Thk 1,5 mm/ -0,9 mm  
 Flip 30°

T2 TSE dorsal:

FOV 200 mm  
 TR 6000 ms  
 TE 71 ms  
 14 slices  
 Th 1,6/-1 mm

Die Bearbeitung der Scans und die weiteren Messungen der Signalintensität erfolgen mittels der Software View Forum R6.3V1L7 SP1 2010 (PHILIPS MEDICAL SYSTEMS DMC GmbH Deutschland). Es wird die Signalintensität in der T2 TSE und T2 FFE Sequenz berechnet und als Histogramm/Diagramm dargestellt. Zur Bestimmung der Signalintensität wird in den Bereich jeder Probe eine sogenannte „Region of interest“ (ROI) plaziert, die eine standardisierte Größe von 24 mm<sup>2</sup> besitzt. Es wird mit Hilfe der gemessenen Intensitätswerte eine graphische Darstellung der Signalintensitäten und deren Häufigkeit möglich gemacht. Gleichzeitig werden Werte für maximale, minimale und mittlere Signalintensität sowie die Standardabweichung festgehalten.



**Abbildung 14: Software View Forum R6.3V1L7 SP1 2010 (Philips Medical System GmbH, Deutschland)**

### **3.2.7 Statistische Auswertung**

Die Befunde dieser Studie werden statistisch ausgewertet und dokumentiert. Die Abnahme der Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen in der MACS-Untersuchung wird auf einen signifikanten Einfluss des zeitlichen Verlaufes mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Die Veränderungen der prozentualen Anzahl der Stammzellen mit  $\geq 10$  Eisenpartikeln in Berliner Blau Untersuchung 3,7, 14 und 21 Tage nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung werden ebenfalls mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse auf signifikanten Einfluss der Zeit untersucht. Für beide Untersuchungen wird versucht, mittels der Berechnung des 95 %-Konfidenz-Intervalls Referenzwerte zu bestimmen.

Die Ergebnisse der MRT-Untersuchung werden mit Hilfe der 2-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Sequenz und der Zeit analysiert. Weiterhin werden Korrelationen zwischen den Werten der MRT-Untersuchung für die Sequenz T2 TSE und T2 FFE für eine, zwei und drei Wochen und die MACS-Untersuchung zu gleichen Zeitpunkten berechnet.



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Kultivierung der kaninen Stammzellen**

Die kaninenn Stammzellen können ohne Probleme aus dem Fettgewebe isoliert werden. Einen Tag nach dem Ausplattieren sind vereinzelte Zellen mit fibroblastischer Morphologie auf dem Flaschenboden sichtbar. Nach drei Tagen sind bereits mehrere Zellkolonien zu sehen. Die Zellen bilden während des Wachstums eine typische gestromte Anordnung.

### **4.2 Untersuchung der Aufnahme des Endorems<sup>®</sup> durch die kaninen Stammzellen mittels Berliner Blau Färbung**

Die kaninenn Stammzellen nehmen das MRT-Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> spontan durch Endozytose auf. Die Endorem<sup>®</sup>-Konzentration von Fe 319,2 µg/ml (448 µg/ml SPIO) reicht aus, um die meisten Zellen innerhalb von der 24-stündigen Inkubationszeit zu markieren.

Drei Tage nach der Markierung liegt die Konfluenz bei ca. 60 - 90 % (mit Ausnahme des Hundes 131/11). Des Weiteren enthält nach dieser Zeit fast jede Stammzelle Eisenpartikel, die sich mittels Berliner Blau Färbung darstellen lassen. Das bedeutet, dass die Stammzellen die Eisenpartikel aufgenommen haben und sich anschließend weiter teilen können. Der Gehalt von Eisenpartikeln pro Zelle ist unterschiedlich. In der vorliegenden Studie werden Stammzellen mit  $\geq 10$  Eisenpartikeln als markiert definiert. Manche Zellen enthalten nur vereinzelte Eisenpartikel (z. B. viele Zellen bei Hund 130/11: Abb. 17) im Zytoplasma um den Zellkern herum, im Gegensatz zu anderen (z. B. Zellen beim Hd. 134/12: Abb. 19), die hochgradig Eisenpartikel aufgenommen haben. Im weiteren Verlauf über 3 Wochen zeigt sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Partikel. Es sind Zellen mit einer gleichmäßigen Aufteilung der Partikel pro Zelle zu sehen (Proben 128/10: Abb. 16 und 130/11: Abb. 17). Es sind Proben mit Zellen vorhanden, die einen hochgradigen Eisenpartikelgehalt aufweisen (Probe 133/12 nach 3 Tagen: Abb.18) oder Proben, die nur vereinzelt und häufig unter 10 Partikel enthalten (Probe 133/12 nach 1 Woche: Abb. 21).

Die Stammzellen, die nur eine geringgradige Menge an Eisen aufweisen, zeigen eine unveränderte Morphologie: die Zellen bleiben spindelförmig und schlank (Abb. 21). Die Stammzellen, die eine hochgradige Menge Eisen aufgenommen haben, sind nicht mehr spindelförmig und lang, sondern zeigen eher ein dreieckiges bis kugelförmiges Aussehen und

der ganze intrazytoplasmatische Raum um den Zellkern ist mit Eisen gefüllt (Probe 128 /10: Abb. 16).

Die folgenden Präparate sind aufgrund schlechter Qualität nach Berliner Blau Färbung nur eingeschränkt auswertbar: Zeitpunkt 3 Tage: 131/11, Zeitpunkt 7 Tage 131/11, Zeitpunkt 14 Tage 128/11, 131/11 und 132/11, Zeitpunkt 3 Wochen: 131/11 und 132/11. Bei Hund 131/11 haben sich die Zellen im Laufe der Fixation und Färbung zum Teil bei jedem Präparat vom Wellboden abgelöst. Das Präparat Hd 128/11 zeigt eine unzureichende Färbung. Die dargestellt Stammzellen sind sehr blass. Die Zellengrenzen sind verwaschen. Die Zählung ist dadurch erschwert.

Man kann beobachten, dass im zeitlichen Verlauf, die markierten Stammzellen bei den meisten Proben (mit Ausnahme der Probe 128/10 und 130/11) zum Zeitpunkt 3 Wochen weniger Eisenpartikel enthalten als im Vergleich zum Zeitpunkt 3 Tage. Bei der Zellteilung werden die Eisenpartikel nicht gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben. Die Abnahme der Eisenpartikel in Stammzellen im zeitlichen Verlauf ist statistisch nicht relevant ( $p = 0,204$ ). Ebenfalls ist eine Bestimmung der Referenzwerte für Eisenpartikelzahl in einer einzelnen Zelle für die Zeitpunkte 3, 7, 14 und 21 Tage mittels 95 %-Konfidenzintervallen aufgrund einer starken Streuung nicht möglich.

Abb. 15 stellt den prozentualen Anteil von Stammzellen mit  $\geq 10$  Eisenpartikeln im zeitlichen Verlauf dar.

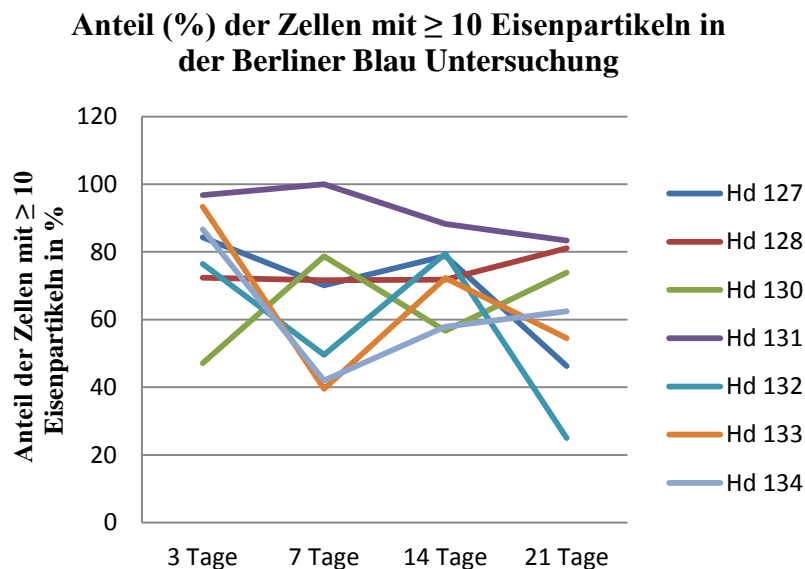
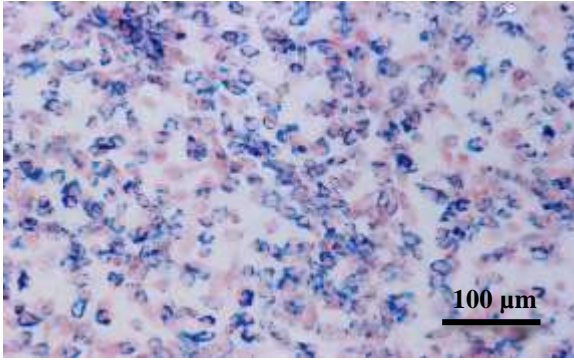
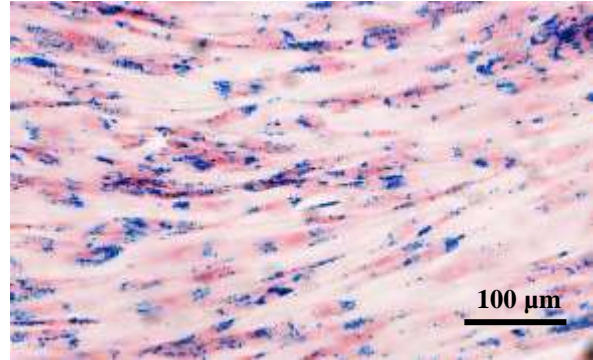


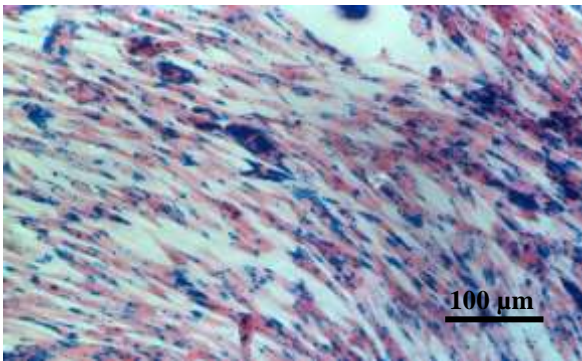
Abbildung 15: prozentualer Anteil der Zellen mit  $\geq 10$  Partikeln in der Berliner Blau Untersuchung



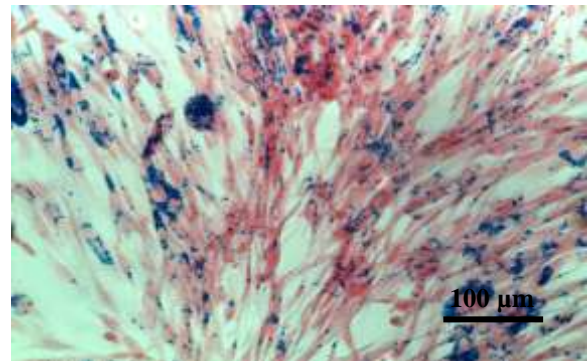
**Abbildung 16: Hund 128/10 Berliner Blau Färbung  
3 Tage nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



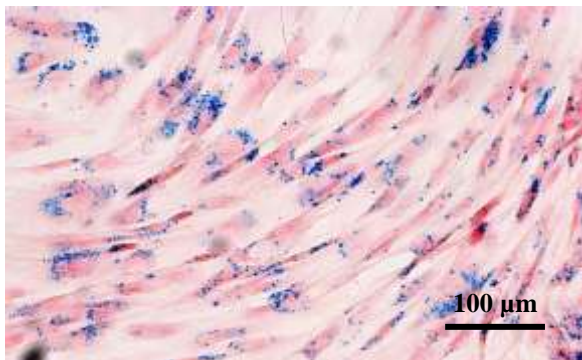
**Abbildung 17: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung  
3 Tage nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



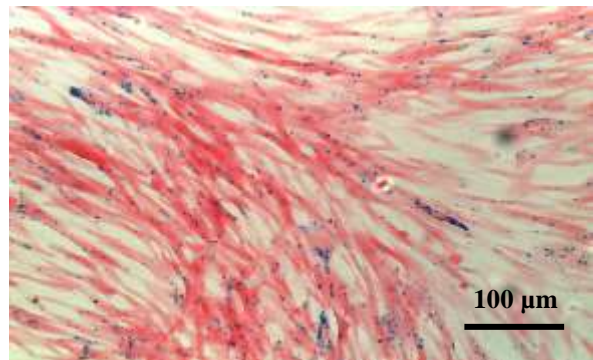
**Abbildung 18: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung  
3 Tage nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



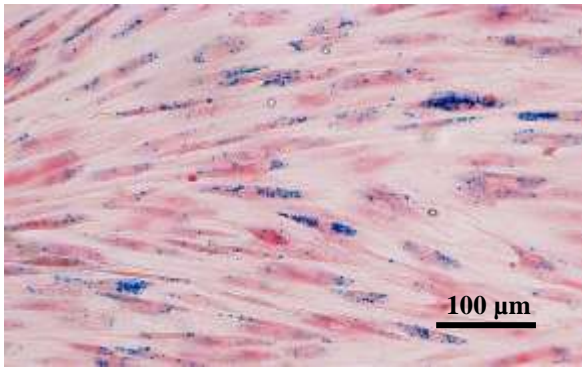
**Abbildung 19: Hund 134/12 Berliner Blau Färbung  
3 Tage Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



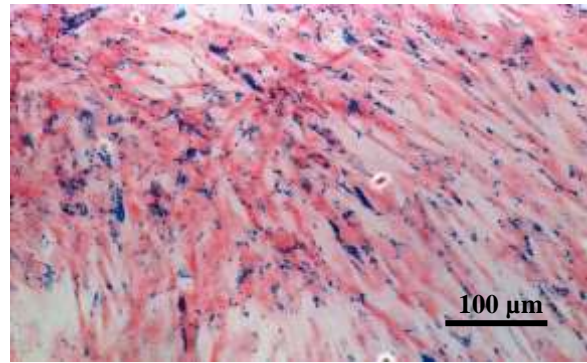
**Abbildung 20: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung  
7 Tage nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



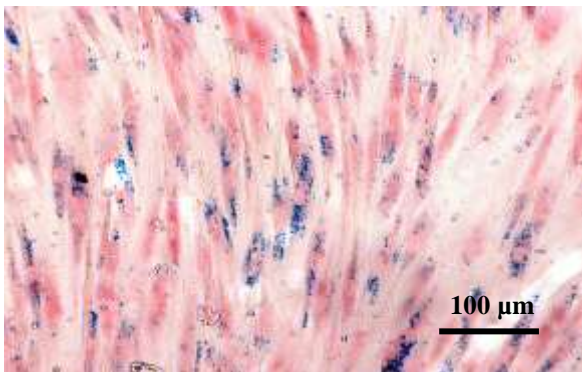
**Abbildung 21: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung  
7 Tage Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



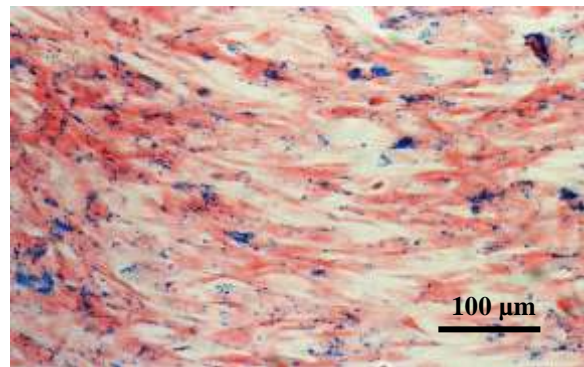
**Abbildung 22: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung  
14 Tage nach Endorem®-Markierung**



**Abbildung 23: Hund 133/11 Berliner Blau Färbung  
14 Tage nach Endorem®-Markierung**



**Abbildung 24: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung  
21 Tage nach Endorem®-Markierung**



**Abbildung 25: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung  
21 Tage nach Endorem®-Markierung**

### **4.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie können die Eisenpartikel und deren Lokalisation in den Zellen auf ultrastrukturellem Niveau dargestellt werden. Es werden die Proben mit Endorem®-markierten Zellen vom Hund 131/11 und Hund 132/11 nach 2 und 3 Wochen und Zellen vom Hund 127/10 und 128/10 ohne und mit Endorem® nach 1 und 3 Wochen nach der Inkubation mit Endorem® untersucht.

Stammzellen nehmen Eisenpartikel aus dem Medium durch Phagozytose auf. Das Moment der Phagozytose ist auf der Abb. 32. dargestellt. Die Eisenpartikel werden von den Zellausläufern umgeben und in die Zelle eingeschlossen. Nach der Aufnahme der Eisenpartikel befinden sie sich entweder frei im Zytoplasma als unregelmäßige Cluster oder sind in die Organellen integriert. Zwei größere schwarze Endorem®-Cluster in der Nähe des Zellkerns sind in der Abb. 29 sichtbar. In der Vergrößerung von der Abb. 29 (Abb. 30) bilden



sie längliche Ansammlungen mit unregelmäßigen Rändern und liegen frei im Zytoplasma zwischen zahlreichen Lysosomen. Große Endorem<sup>®</sup>-Ansammlung im Zytoplasma sind auf den Abb. 33 dargestellt. In der Vergrößerung ist erkennbar, dass die Endorem<sup>®</sup>-Partikel ein kleines Konglomerat bilden (Länge ca. 0,6 µm und Breite 0,3 µm). Aufgrund der unregelmäßigen Ränder ist zu vermuten, dass die SPIO-Partikel nicht von einer Membran umgeben sind und frei im Zytoplasma liegen. Cluster, die im Zytoplasma sehr nah am Golgi Apparat und am Zellkern liegen werden auf dem Bild 34 dargestellt. Die Endorem<sup>®</sup>-Einschlüsse kann man auch in der Zellperipherie sehen (Abb. 35).

Man kann sagen, dass nach einer und zwei Wochen die meisten Endorem<sup>®</sup>-Partikel frei in der Zelle im Zytoplasma liegen. Im Gegensatz dazu sind nach drei Wochen zahlreiche Eisenpartikel in den Organellen eingebaut. Es handelt sich um Lysosomen (Abb. 36, 38) und Lysosomen im Endstadium (Residualkörper Abb. 39). Auf dem Bild 38 sind zahlreiche Lysosomen von unterschiedlicher Größe von 0,3 bis 1,3 µm abgebildet. Optisch sind mehr Lysosomen in den markierten Zellen als in den Kontrollzellen sichtbar. In der Vergrößerung in der Abbildung 40 sieht man Endorem<sup>®</sup> innerhalb eines Residualkörpers.

Es sind auch vereinzelt unregelmäßige Cluster von Eisenpartikeln im Zytoplasma (Abb. 41) vorhanden, aber weniger als nach einer und zwei Wochen. Bei markierten und nicht markierten Zellen nach 3 Wochen ist ein sehr stark dilatiertes endoplasmatisches Retikulum zu sehen (Abb. 37).

In der Kontrolluntersuchung sind zahlreiche diffus verteilte elektronendichte (schwarze) Punkte und Strukturen in jeder Zelle sichtbar. Es ist wichtig, diese Strukturen von Endorem<sup>®</sup>-Ansammlungen zu unterscheiden (Abb. 26). In der Kontrolluntersuchung sind auch in Lysosomen zum Teil schwarze Einschlüsse enthalten, was physiologisch ist und in den Zellen ohne Endorem<sup>®</sup>-Markierung vorkommt (Abb. 26, 27, 28). Die Abb. 33 (Hd 131/11 2 Wochen Endorem<sup>®</sup>-Markierung) zeigt über die gesamte Zelle diffus verteilte kleine elektronendichte (schwarze) Pünktchen im Zytoplasma. Es ist nicht möglich zu sagen, ob es sich um Eisenpartikel handelt, da in der Negativkontrolle ähnliche Strukturen zu sehen sind

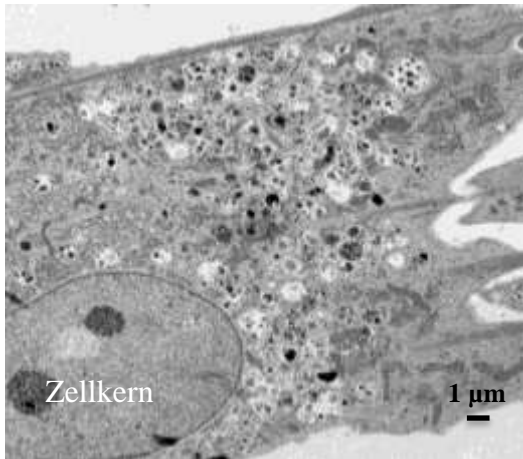


Abbildung 26: TEM Negativkontrolle

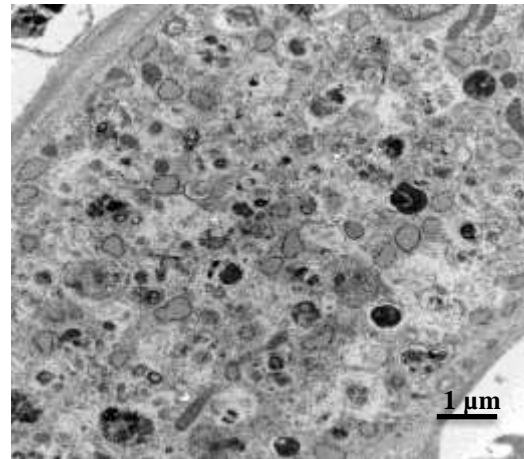


Abbildung 27: TEM Negativkontrolle

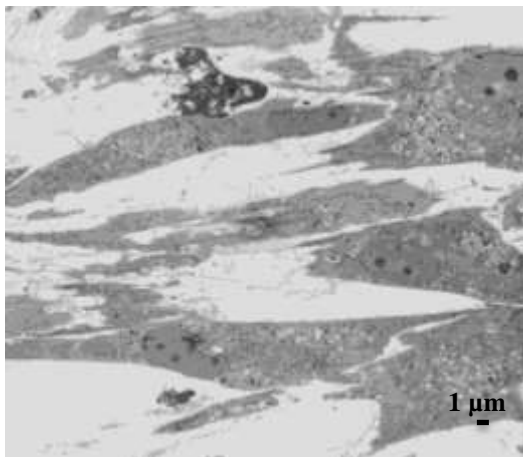


Abbildung 28: TEM Negativ Kontrolle Hd 127/10

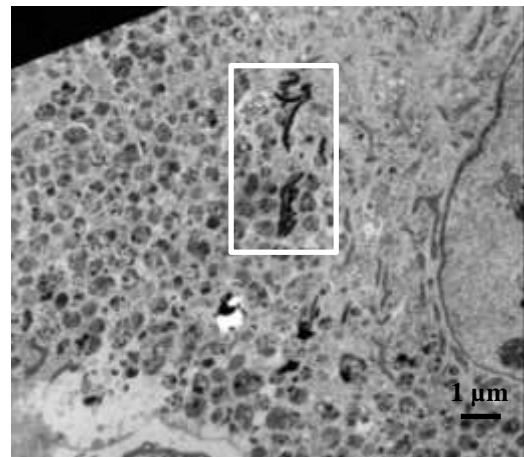


Abbildung 29: TEM Hd 127/10 1 Woche nach Endorem®-Markierung

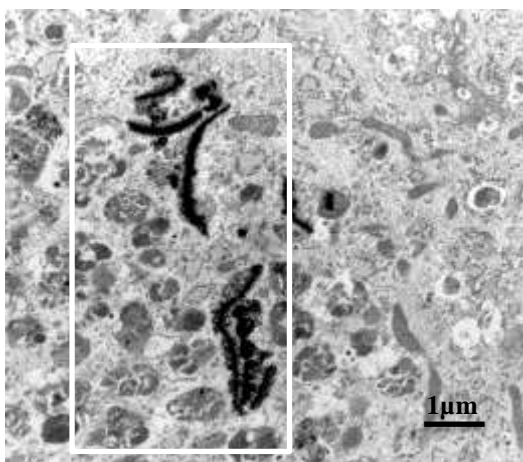


Abbildung 30: Vergrößerung von Abbildung 29

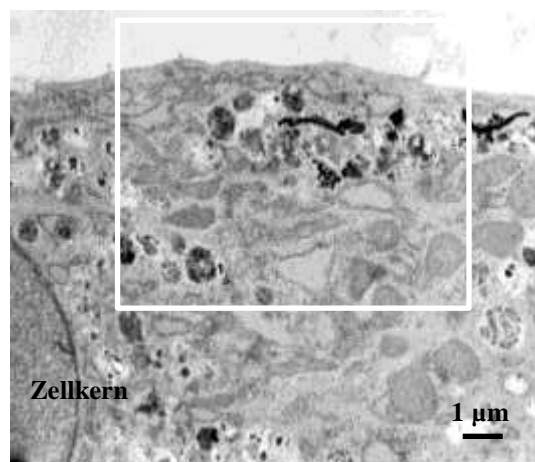


Abbildung 31: TEM Hd Nr 127/10 1 Woche nach Endorem®-Markierung

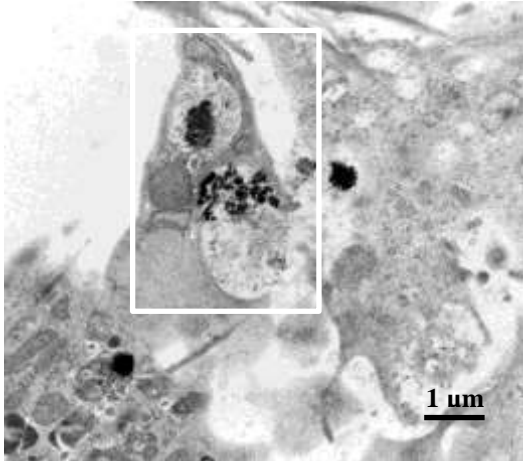


Abbildung 32: TEM Hd 128/10 1 Woche nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung

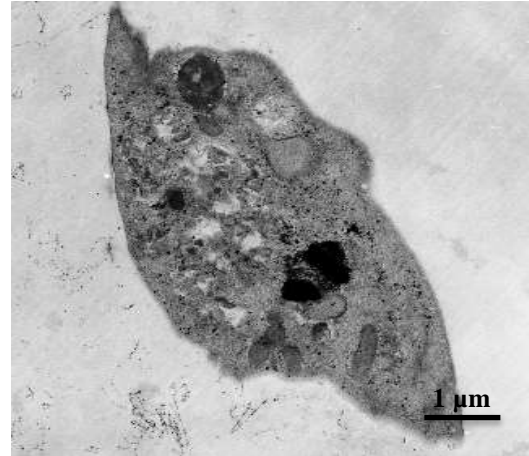


Abbildung 33: TEM Hd 131/11 nach 2 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung

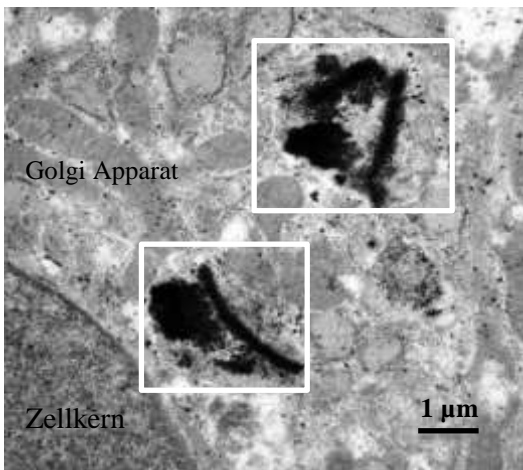


Abbildung 34: TEM Hd 132/12 2 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung

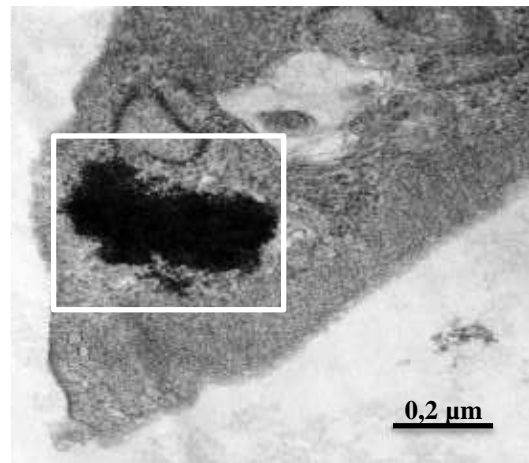


Abbildung 35: TEM Hd 131/12 2 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung

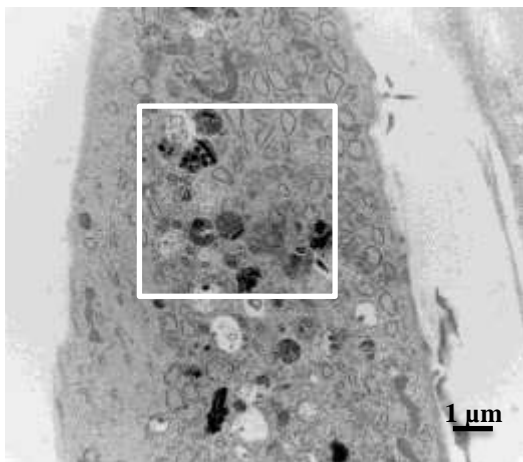


Abbildung 36: TEM Hd 128/10 3 Wochen nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung

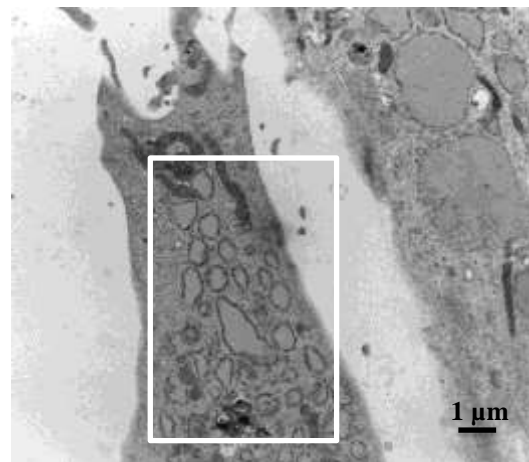


Abbildung 37: TEM Hd 127/10 3 Wochen nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung

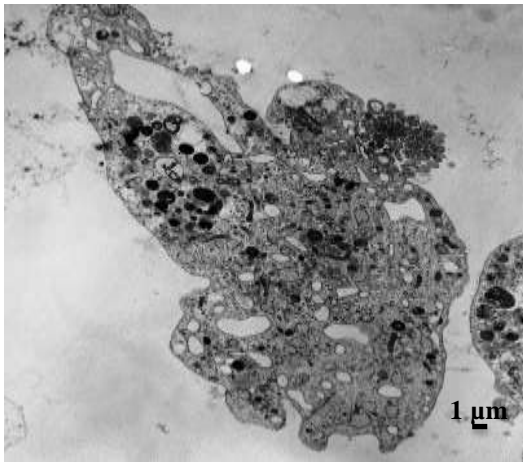


Abbildung 38: TEM Hd 131/12 3 Wochen nach der Endorem®-Markierung

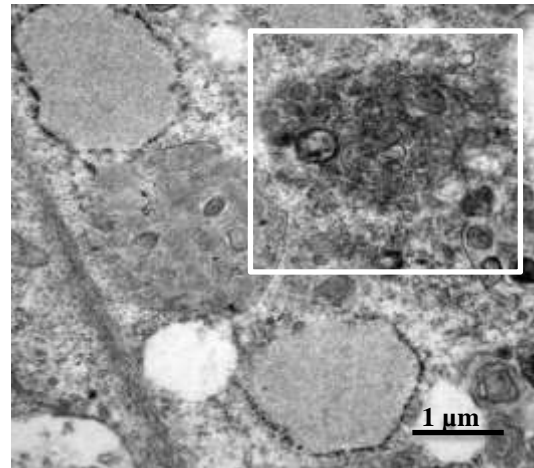


Abbildung 39: TEM Hd 131/12 3 Wochen nach der Endorem®-Markierung

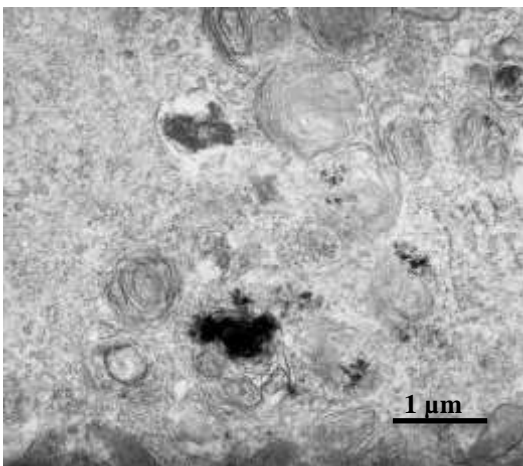


Abbildung 40: TEM Hd 132/12 3 Wochen nach Endorem®-Markierung (Vergrößerung)

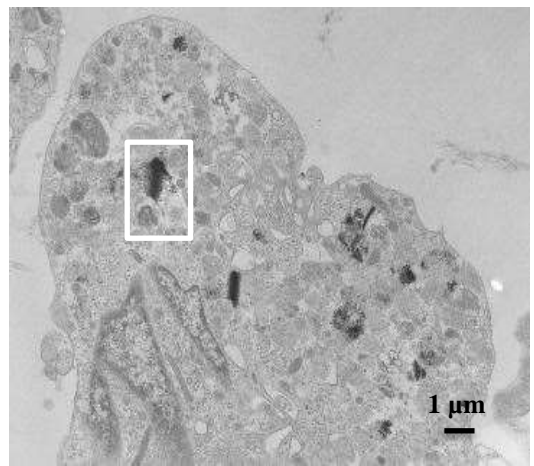


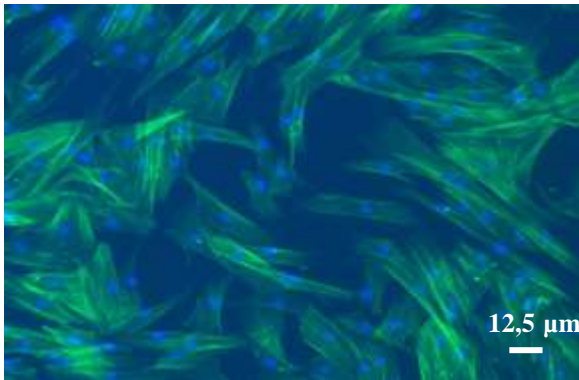
Abbildung 41: TEM Hd 132/12 3 Wochen nach Endorem®-Markierung

#### 4.4 Untersuchung des Endorem®-Einflusses auf das Zytoskelett

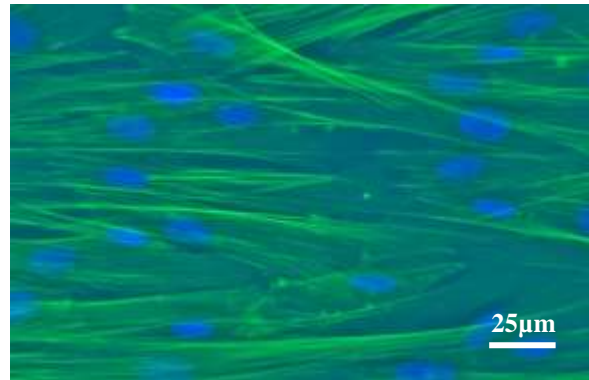
Mittels Phalloidin färbung werden Zytoskelettelemente von markierten und nichtmarkierten Zellen miteinander verglichen. Die markierten und nicht markierten Zellen sind gestreckt. In jeder Zelle ist ein blauer Kern erkennbar. Die Aktinfilamente werden als grüne, feine Linie dargestellt. Sie laufen in jeder Zelle parallel zu einander und deren Struktur ist sowohl in mit Endorem®-markierten als auch in nicht markierten Zellen auf gesamter Länge nachvollziehbar. In den mit Endorem®-markierten Zellen sind keine Endorem®-Partikel erkennbar. Man kann markierte von nicht-markierten Zellen nicht unterscheiden.



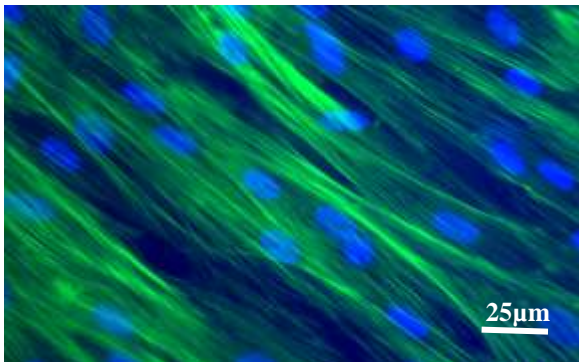
Da es keine Unterschiede zwischen dem Zytoskelett der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten und nicht markierten Zellen gibt, konnte es gezeigt werden, dass eine Endorem<sup>®</sup>-Markierung in der Konzentration von Fe = 319,2 µg/ml (SPIO = 448 µg/ml) keinen Einfluss auf das Zytoskelett der Stammzellen hat. Die folgenden ausgewählten Bilder stellen die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten und nicht markierten Stammzellen in der Fluoreszenzmikroskopie dar.



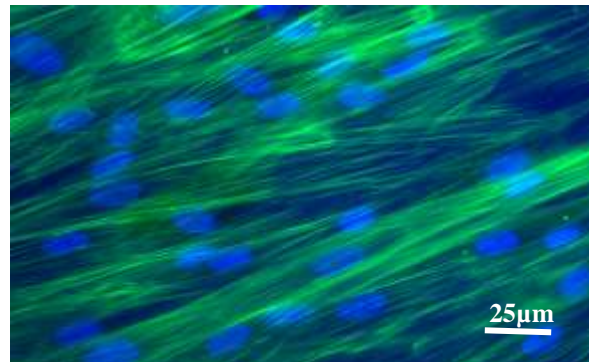
**Abbildung 42: Phalloidinfärbung Hd 130/11 nach 7 Tagen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



**Abbildung 43: Phalloidinfärbung Hd 130/11 nach 7 Tagen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**



**Abbildung 44: Phalloidinfärbung Hd 131/11 nach 7 Tagen bei Zellen ohne Endorem<sup>®</sup>**



**Abbildung 45: Phalloidinfärbung Hd 131/11 nach 7 Tagen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**

#### 4.5 Bestimmung des prozentuellen Anteils der markierten und nicht markierten Zellen nach 1, 2 und 3 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung mittels MACS-Untersuchung

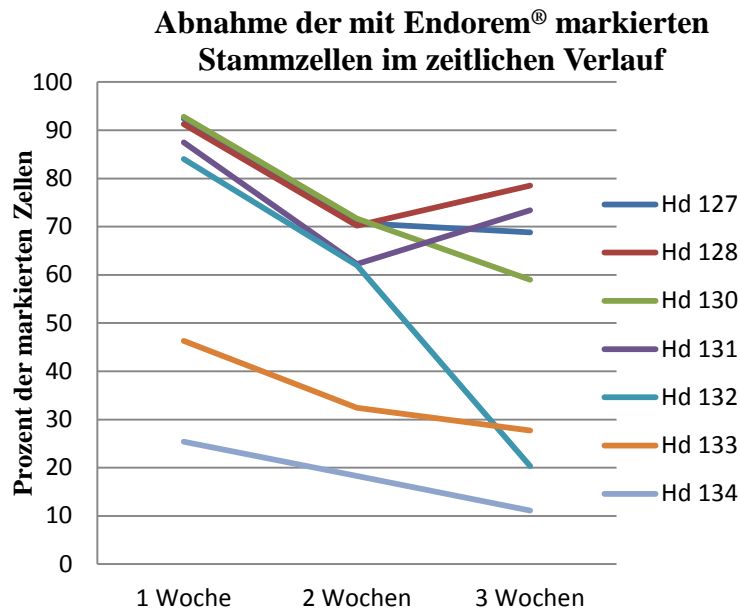
In diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil der markierten kaninen Stammzellen im zeitlichen Verlauf sinkt. Diese Abnahme der markierten Zellen ist statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0007$ ).

Eine Referenzwertbestimmung für die Anzahl der markierten Zellen für den Zeitpunkt 1, 2 und 3 Wochen ist nicht möglich. Ein Konfidenzintervall lässt sich aufgrund starker Streuung der Daten und kleiner Stichprobe nicht angeben.

Die Tabelle 5 und das Diagramm auf der Abbildung 46 stellt einen prozentuellen Anteil der markierten Zellen 1, 2 und 3 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung in der MACS-Untersuchung dar.

**Tabelle 5: Prozentueller Anteil der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen nach 1, 2, 3 Wochen (Angabe in %) in der MACS-Untersuchung**

| Hund Nummer | Nach 1 Woche | Nach 2 Wochen | Nach 3 Wochen |
|-------------|--------------|---------------|---------------|
| <b>127</b>  | 92,36        | 70,71         | 68,79         |
| <b>128</b>  | 91,28        | 70,2          | 78,53         |
| <b>130</b>  | 92,78        | 71,64         | 59            |
| <b>131</b>  | 87,5         | 62,27         | 73,4          |
| <b>132</b>  | 84,04        | 61,97         | 20,33         |
| <b>133</b>  | 46,3         | 32,4          | 27,7          |
| <b>134</b>  | 25,4         | 18,3          | 11,1          |

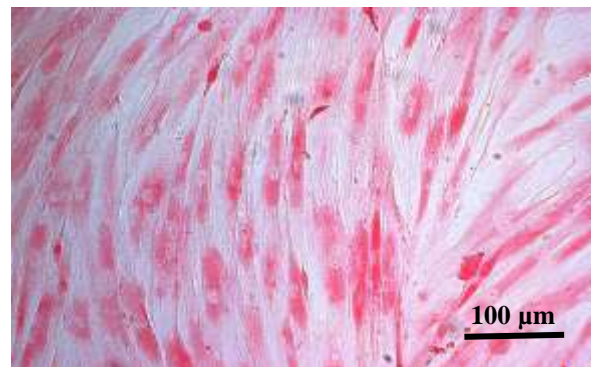


**Abbildung 46: Abnahme der mit Endorem®-markierten Zellen im zeitlichen Verlauf**

Um zu überprüfen, ob es sich bei der nicht markierten Fraktion nach der MACS-Separation, tatsächlich um Zellen ohne Eisenpartikel handelt, wurden die nicht markierten Zellen von Hund 130/11 nach der MACS-Separierung kultiviert und am Folgetag mittels Berliner Blau Färbung wurde verifiziert, ob sie Eisenpartikel enthalten. Es konnten keine blau gefärbten Eisenpartikel bei 2 Proben von Hund 130/11 nachvollzogen werden



**Abbildung 47: Berliner Blau Färbung nach der MACS-Sortierung (Zellenfraktion ohne Eisenpartikel)**



**Abbildung 48: Berliner Blau Färbung nach der MACS-Sortierung (Zellenfraktion ohne Eisenpartikel)**

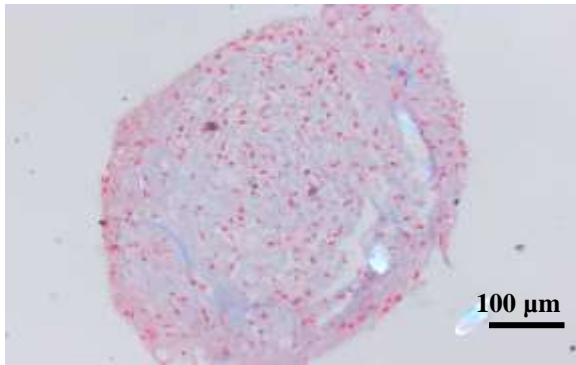
## **4.6 Untersuchung der Multipotenz der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninenn ASCs anhand des adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotenzials**

### **4.6.1 Chondrogene Differenzierung**

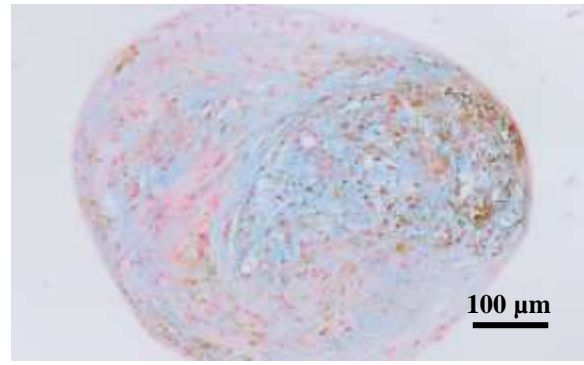
Die Stammzellen vom Hd 131/11 ohne Endorem<sup>®</sup> die mit einem Differenzierungsmedium inkubiert werden, zeigen eine deutliche blaue Anfärbung des gesamten Interstitium, was deutlich für saure Mucopolysaccharide spricht. Im Gegensatz dazu zeigen die Proben von Stammzellen, die mit Endorem<sup>®</sup> markiert wurden, einen geringgradigen Anteil der blau gefärbten Areale im Interstitium. Das spricht für eine eingeschränkte Differenzierung in die chondrogene Richtung. In der Negativkontrolle sieht man eine mittel- bis hochgradige blaue Anfärbung des Interstitiums, was bei einer Inkubation im Standardmedium, nicht zu erwarten sein sollte. Zusätzlich sind die Zellkonglomerate von einem rosa gefärbten Saum umgeben.

In dem Präparat vom Hund 133/12 mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen sind saure Mucopolisaccharide in größerem Ausmaß vorhanden. Das Interstitium wird nicht vollständig blau angefärbt. Zusätzlich sieht man eine braune Anfärbung der Zellen, was für eine Akkumulation vom Endorem<sup>®</sup> spricht. In diesem Fall konnte eine Knorpelbildung festgestellt werden. Auf dem Präparat vom gleichen Hund mit Zellen ohne Endorem<sup>®</sup> sieht man eine fast vollständige blaue Anfärbung des Interstitiums, was ebenfalls für eine Knorpelbildung spricht. Die Negativkontrolle zeigt wie beim Hund 131/11 eine blaue Färbung des Interstitiums.

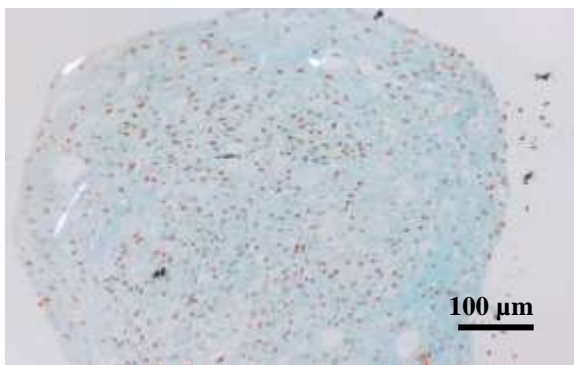
Zusammenfassend kann man sagen, dass die Endorem<sup>®</sup>-Markierung bei Stammzellen vom Hund 131/11 und 133/12 einen negativen Einfluss auf die Knorpelbildung hat. Die chondrogene Differenzierung beim Hund 131/11 hat nur in einem geringgradigen Ausmaß stattgefunden. Bei den Stammzellen vom Hund 133/12 ist eine mittelgradige Knorpelbildung nachgewiesen worden, jedoch deutlich weniger als bei Stammzellen, die nicht markiert wurden.



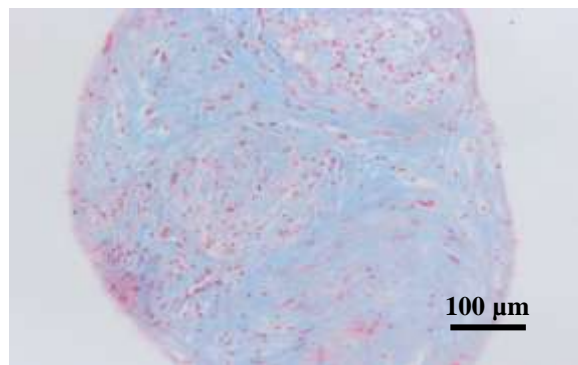
**Abbildung 49: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen nach Endorem®-Markierung**



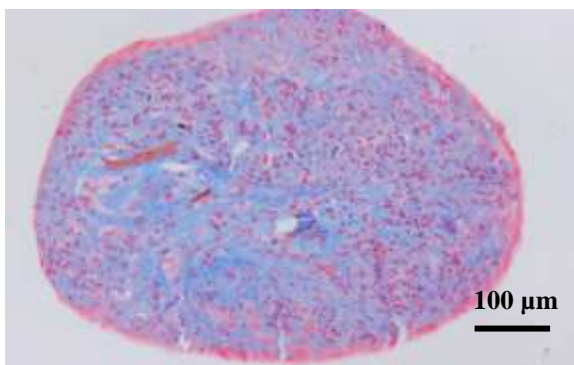
**Abbildung 50: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen nach Endorem®-Markierung**



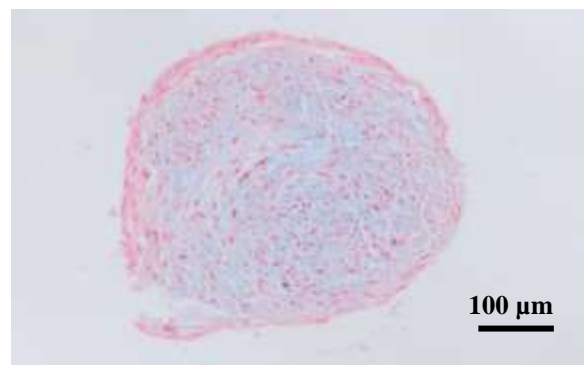
**Abbildung 51: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 52: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 53: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen Negativkontrolle**



**Abbildung 54: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen Negativkontrolle**

#### 4.6.2 Adipogene Differenzierung

Sowohl die Zellen mit Endorem<sup>®</sup> als auch ohne Endorem<sup>®</sup>, die mit dem Differenzierungsmedium inkubiert wurden, zeigen eine deutlich höhere Anzahl von Fettvakuolen als Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe sind nur vereinzelte Fettvakuolen sichtbar. Vereinzelte Fettvakuolen kommen physiologisch fast in jeder Zelle vor.

Es wurde ein Mittelwert von Fettvakuolen pro Zelle für Zellen mit und ohne Endorem<sup>®</sup>, die der adipogenen Differenzierung unterzogen wurden und auch für die Negativkontrolle errechnet. Bei der Probe Hd 131/12 wurde ein Mittelwert der Fettvakuolenzahl in 32 Zellen mit Endorem<sup>®</sup>, 30 Zellen ohne Endorem<sup>®</sup> und 53 Zellen in der Negativkontrolle bestimmt. Bei der Probe Hd 132/12 wurde ein Mittelwert der Fettvakuolenzahl in 29 Zellen mit Endorem<sup>®</sup>, 34 Zellen ohne Endorem<sup>®</sup> und 131 Zellen in der Negativkontrolle berechnet. Die Ergebnisse werden in Abb. 55 graphisch dargestellt. Die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen beider Hunde enthalten mehr Fettvakuolen (Hd 131/11: 30,81 und Hd 132/11: 60,55) als die Zellen ohne Eisenpartikel (Hd 131/11: 24,2 und Hd 132/11: 25,76). Die beiden Negativkontrollen von Hd 131/11 und 132/11 zeigen eine deutlich geringere Fettvakuolenanzahl pro Zelle (Hd 131/11: Mittelwert = 6,03 und Hd 132/11: Mittelwert = 1,07). Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Anzahl der Fettvakuolen pro Zellen eine vermehrte Veränderung der Zellmorphologie stattfindet. Zellen mit einer ausgeprägten Fettvakuolenanzahl sind eher rundlich und zeigen keine typische spindelförmige Morphologie, was man deutlich bei Zellen vom Hund 132/11 mit Endorem<sup>®</sup> beobachten kann. Diese Morphologie ähnelt der eines Adipozyten. Stammzellen mit einem moderaten Fettvakuolenanteil sind schlank und lang gestreckt und zeigen ein typisches spindelförmiges Aussehen.

Es kann kein negativer Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf die adipogene Differenzierung der Stammzellen von Hund Nr.131/11 und 132/11 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigen die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen von beiden Hunden eine höhere Fettvakuolenanzahl pro Zelle als die nicht markierten Zellen, die auch der adipogener Differenzierung unterzogen worden sind. Aufgrund der Probenzahl (n=2) sind diese Ergebnisse statistisch nicht belegt.



### Fettvakuolenzahl pro Zelle

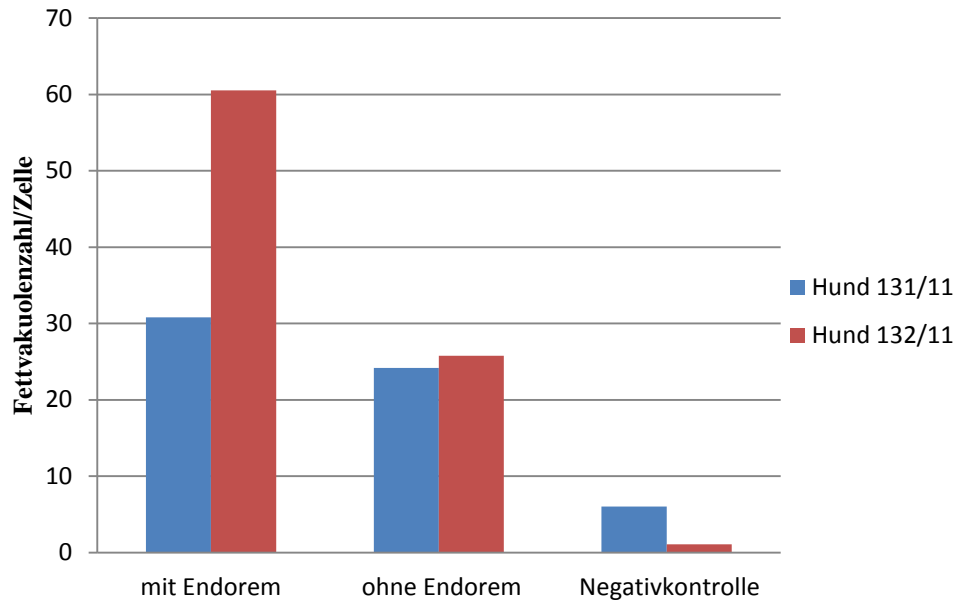


Abbildung 55: Fettvakuolenzahl (Mittelwert) pro Zelle beim Hund 131/11 und 132/11

Der Nachweis der adipogenen Differenzierung und die Negativkontrolle werden auf den folgenden Bildern dargestellt.

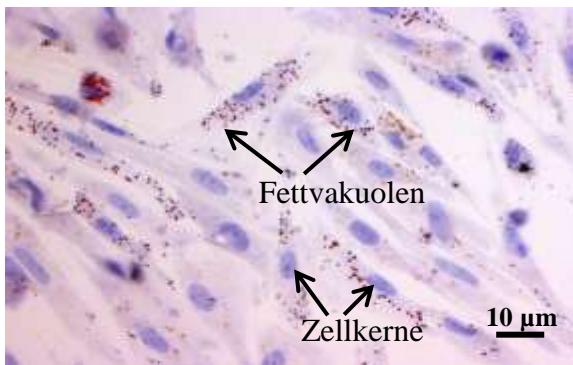


Abbildung 56: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen nach Endorem®-Markierung

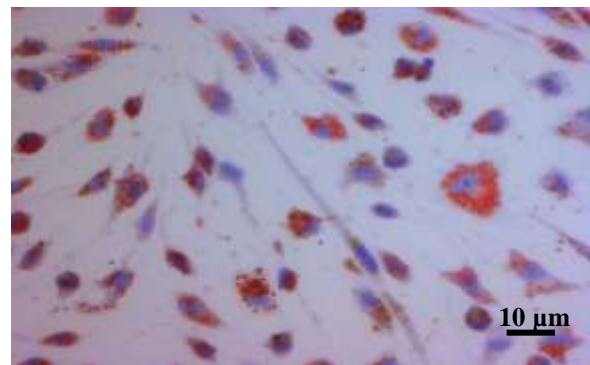
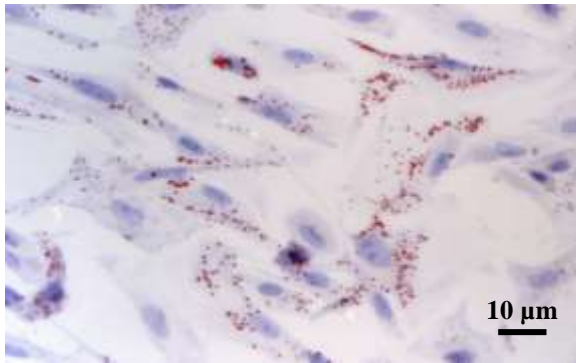
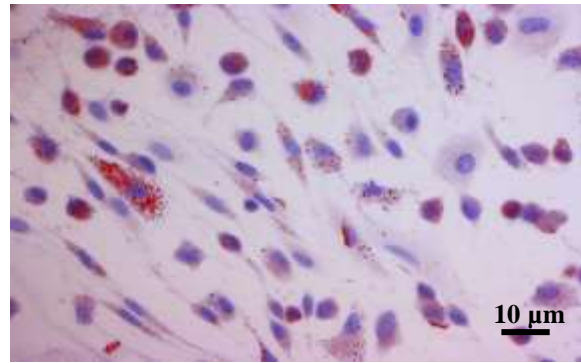


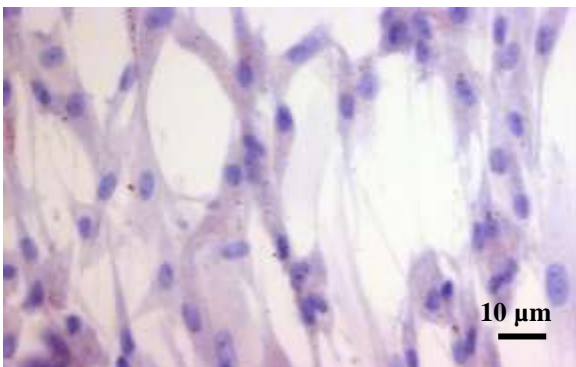
Abbildung 57: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen nach Endorem®-Markierung



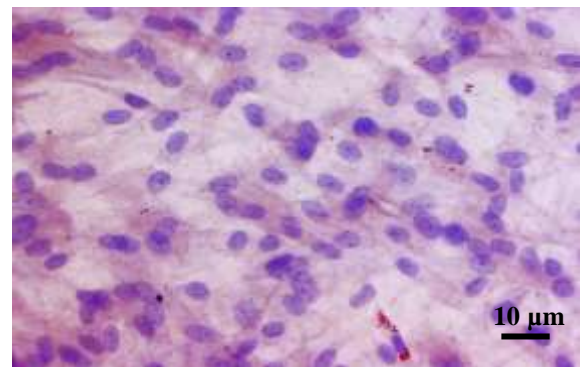
**Abbildung 58: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 59: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 60: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen Zellen Negativkontrolle**



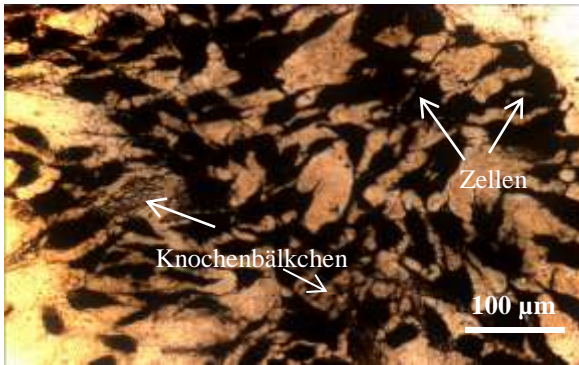
**Abbildung 61: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen Zellen Negativkontrolle**

#### **4.6.3 Osteogene Differenzierung**

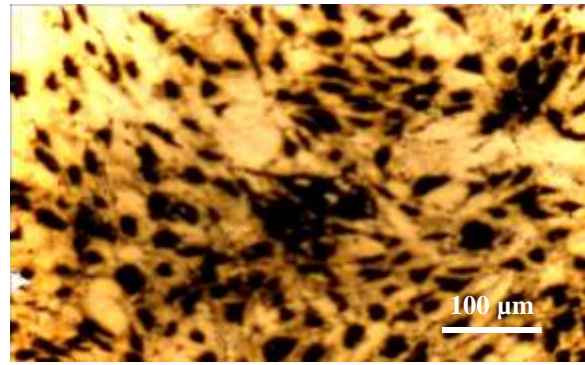
Bei der Untersuchung von Zellen von Hund 133/12 und 134/12 sowohl mit als auch ohne Endorem® können schwarze Präzipitate in der Extrazellulärmatrix und eine schwarze Färbung der Zellen selbst festgestellt werden. Diese schwarzen Präzipitate deuten auf eine Entstehung von Knochenbälkchen hin. In der Kontrolluntersuchung wurden keine Hinweise auf Mineralisation der Extrazellulärmatrix und Zellen selbst festgestellt.

Da sowohl die Zellen als auch zum Teil die extrazelluläre Matrix schwarz gefärbt sind, ist es schwierig das Ausmaß der osteogenen Differenzierung zu beurteilen.

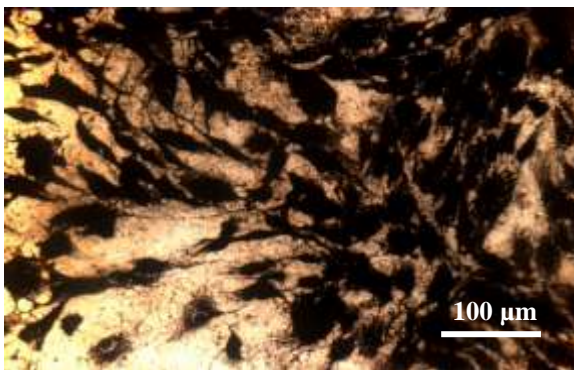




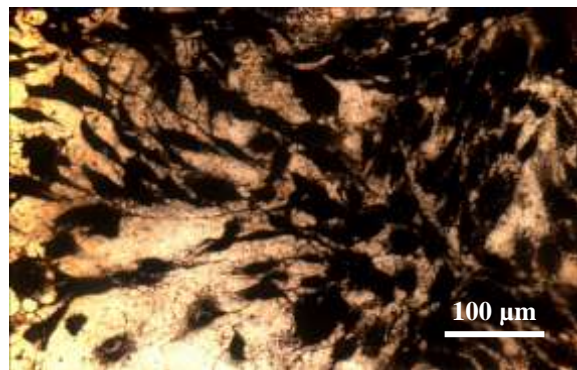
**Abbildung 62: Hund 133/12 Von Kossa Färbung nach Endorem®-Markierung**



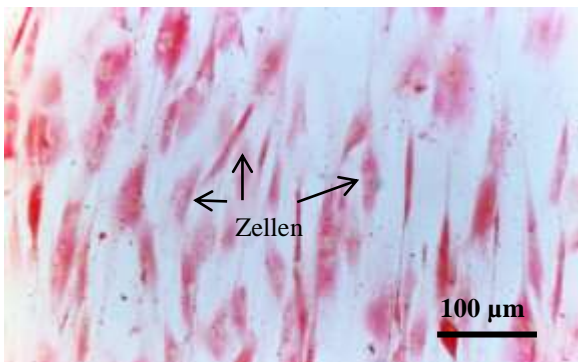
**Abbildung 63: Hund 134/12 Von Kossa Färbung nach Endorem®-Markierung**



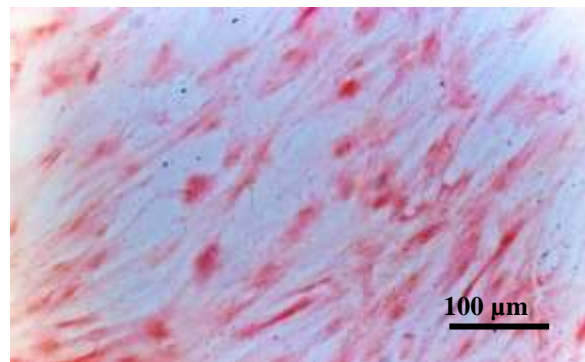
**Abbildung 64: Hund 133/12 Von Kossa Färbung bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 65: Hund 134/12 Von Kossa Färbung bei Zellen ohne Endorem®**



**Abbildung 66: Hund 133/12 Von Kossa Färbung Negativkontrolle**



**Abbildung 67: Hund 134/12 Von Kossa Färbung Negativkontrolle**

## 4.7 MTT-Test

Der MTT-Test wird zur Bestimmung der Zellzytotoxizität und Zellproliferation benutzt.

Die folgenden Tabellen enthalten die Werte der Absorbionsmessungen zum Zeitpunkt 0 (24 Stunden nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung und nach 24 Stunden (d. h. 48 Stunden nach der Markierung), die mit Hilfe eines Photometers Tecan Sunrise<sup>®</sup> gemessen werden. Der Anstieg der Absorption spricht für eine höhere Zellzahl. Das bedeutet, dass eine Zellteilung stattgefunden hat.

Bei der Analyse der Ergebnisse ist zu sehen, dass in allen Proben von Hund 133/12 und 134/12 mit und ohne Endorem<sup>®</sup> zum Zeitpunkt 24 Stunden (48 Stunden nach der Markierung) eine Proliferation der Stammzellen stattgefunden hat und die Werte deutlich höher sind als zum Zeitpunkt 0. Die Absorbionsmessungen für die Zellen von Hund 133/12 ohne Endorem<sup>®</sup> zeigen zum Zeitpunkt 0 folgende Werte: 0,079; 0,076 und 0,071. Nach 24 Stunden ist ein deutlicher Anstieg der Werte zu beobachten: 0,613; 0,480 und 0,539. Bei den Zellen des gleichen Hundes nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung betragen die Absorptionswerte zum Zeitpunkt 0 (24 Stunden nach der Markierung) 0,096; 0,096 und 0,071. Nach 24 Stunden (48 Stunden nach der Markierung) ist die Absorbionsmessung deutlich angestiegen und liegt bei: 0,786; 0,723 und 0,712. Die Absorbionsmessung von Zellen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung zeigt sogar höhere Werte als bei Zellen ohne Endorem<sup>®</sup>. Das beweist, dass die Zellen nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung sich weiter teilen und dass Endorem<sup>®</sup> keinen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate der Stammzellen bei diesem Hund hat.

Die Absorbionsmessung von Stammzellen von Hund 134/12 ohne Endorem<sup>®</sup>-Markierung zeigen zum Zeitpunkt 0 (24 Stunden nach der Markierung) folgende Werte: 0,087; 0,080 und 0,091. Nach 24 Stunden (48 Stunden nach der Markierung) ist ein Anstieg der Werte zu verzeichnen: 0,501; 0,520 und 0,486. Die Absorbionsmessung der Stammzellen des gleichen Hundes nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung weist folgende Werte auf: 0,068; 0,052 und 0,065. Nach 24 Stunden ist ebenfalls in diesem Fall die Absorption angestiegen, was für eine Proliferation der Zellen spricht. Die Werte liegen zu dem Zeitpunkt 24 Stunden (48 Stunden nach der Markierung) bei: 0,506; 0,396 und 0,416 und sind nur minimal kleiner als diese von nicht mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen. In diesem Fall scheint die Endorem<sup>®</sup>-Markierung keinen negativen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen zu haben.

Abbildung 68 zeigt eine graphische Darstellung der obengenannten Werte von den Stammzellen von Hund 133/12 und 134/12 ohne und nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung.

**Tabelle 6: Schema der MTT-Untersuchung**

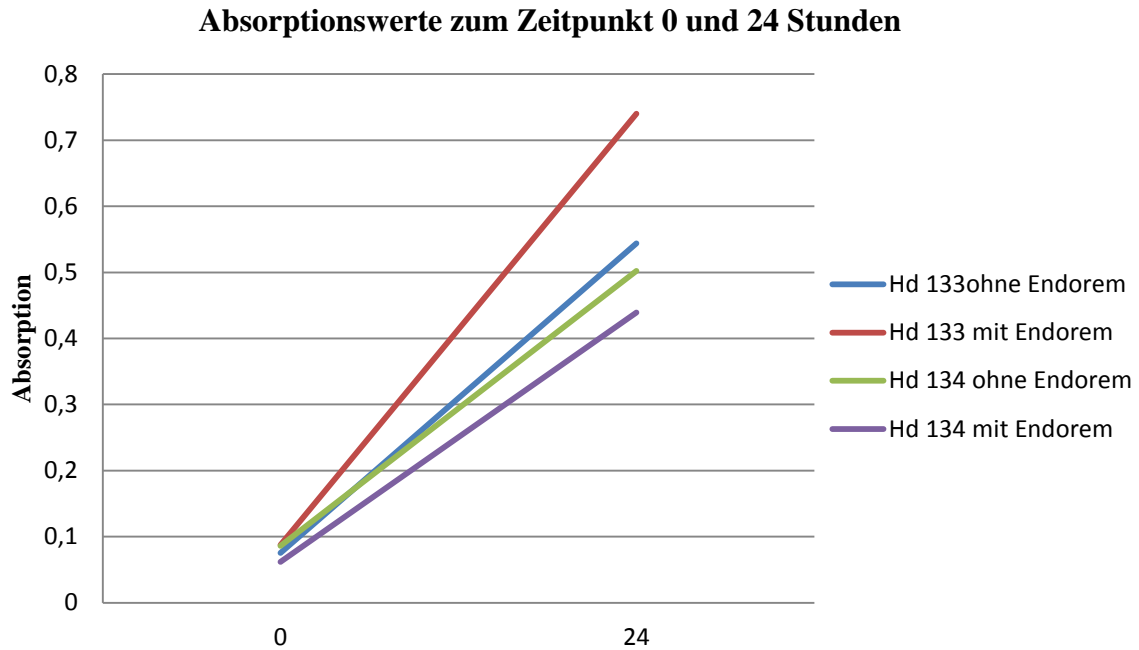
| Zeitpunkt |                               |                               |                               |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A         | Blank                         | x                             | x                             |
| B         | 133 ohne Endorem <sup>®</sup> | 133 ohne Endorem <sup>®</sup> | 133 ohne Endorem <sup>®</sup> |
| C         | 133 mit Endorem <sup>®</sup>  | 133 mit Endorem <sup>®</sup>  | 133 mit Endorem <sup>®</sup>  |
| D         | 134 ohne Endorem <sup>®</sup> | 134 ohne Endorem <sup>®</sup> | 134 ohne Endorem <sup>®</sup> |
| E         | 134 mit Endorem <sup>®</sup>  | 134 mit Endorem <sup>®</sup>  | 134 mit Endorem <sup>®</sup>  |

**Tabelle 7: Werte der Absorptionsmessung zum Zeitpunkt 0 (24 Stunden nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung)**

| Zeitpunkt 0 |       |       |       |
|-------------|-------|-------|-------|
| A           | 0,359 | x     | x     |
| B           | 0,079 | 0,076 | 0,071 |
| C           | 0,096 | 0,096 | 0,071 |
| D           | 0,087 | 0,08  | 0,091 |
| E           | 0,068 | 0,052 | 0,065 |

**Tabelle 8: Werte der Absorptionsmessung zum Zeitpunkt 24 (48 Stunden nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung)**

| Zeitpunkt 24 Stunden |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|
| A                    | 0,407 | x     | x     |
| B                    | 0,613 | 0,480 | 0,539 |
| C                    | 0,786 | 0,723 | 0,712 |
| D                    | 0,501 | 0,520 | 0,486 |
| E                    | 0,506 | 0,396 | 0,416 |



**Abbildung 68: Graphische Darstellung der Absorptionswerte zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden (24 und 48 Stunden nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung)**

#### 4.8 MRT-Untersuchung

Auf der Agaroseplatte wurden außer Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen auch das MRT-Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> und Dotarem<sup>®</sup> in Agarosegel untersucht. Als Negativkontrolle befindet sich in der Mitte jeder Platte eine Probe, die lediglich aus Agarosegel besteht.

Es wurden 2 Sequenzen durchgeführt: T2 TSE und T2 FFE. In den beiden Sequenzen stellt sich Endorem<sup>®</sup> hypointens zu den umgebenden Strukturen dar. Enthalten die Stammzellen nach Inkubation genug Eisenpartikel, werden sie als hypointens dargestellt.

Es wird zusätzlich auf der Agaroseplatte Dotarem<sup>®</sup> mituntersucht. Dotarem<sup>®</sup> gehört zu den paramagnetischen Kontrastmitteln und verkürzt T1 Relaxation. Dadurch wird Dotarem<sup>®</sup> in T1 Sequenzen hyperintens (hell) dargestellt (siehe Kapitel 2.2.2). Dotarem<sup>®</sup> kann auch T2 Relaxationszeit verkürzen und dadurch wird dieses Kontrastmittel in T2 gewichteten Bilder hypointens (dunkel) (WESTBROOK et al. 2011).

Es wurde die Signalintensität in der T2 TSE und T2 FFE Sequenz mit Hilfe der Software View Forum R6.3V1L7 SP1 2010 (Philips Medical System Nederlands) berechnet und als Histogramm/Diagramm dargestellt.

Zur Bestimmung der Signalintensität wird in den Bereich jeder Probe eine sogenannte „*Region of interest*“ (ROI) plaziert, die eine standarisierte Größe von  $24 \text{ mm}^2$  besitzt. Es wird mit Hilfe der gemessenen Intensitätswerte eine graphische Darstellung der Signalintensitäten und deren Häufigkeit möglich gemacht. Gleichzeitig werden Werte für maximale, minimale und mittlere Signalintensität sowie die Standardabweichung festgehalten.

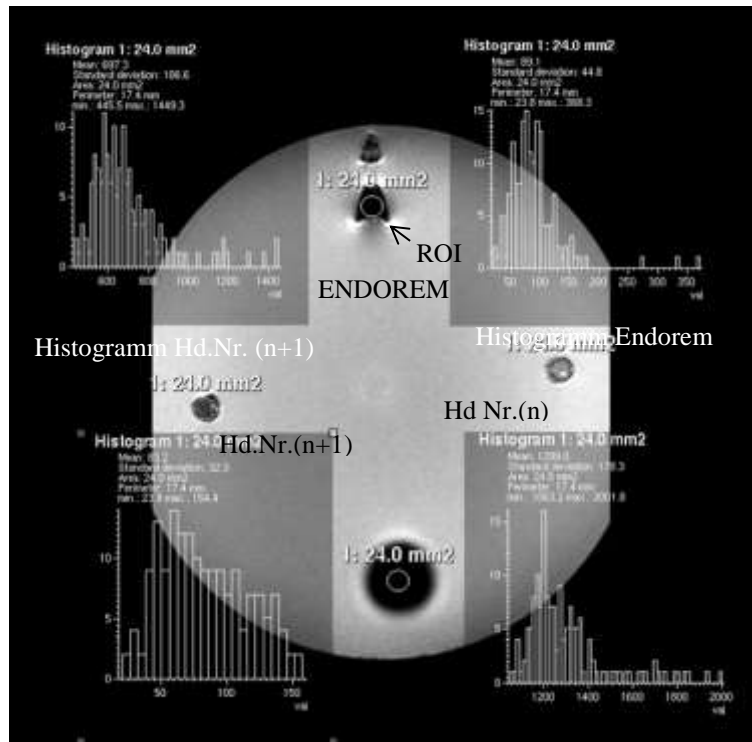


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Agaroseplatte mit Beschriftung

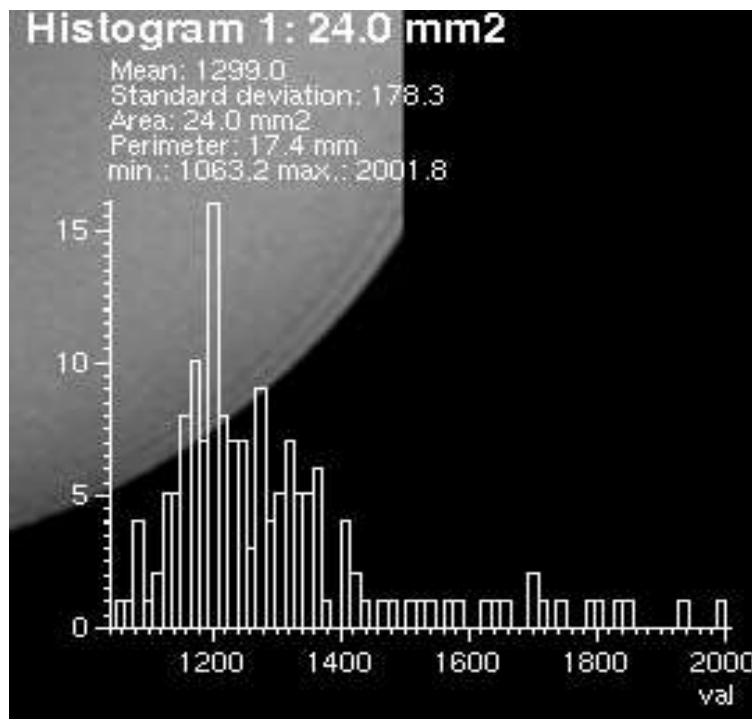


Abbildung 70: Beschreibung eines Beispielhistogramms: y-Achse: Häufigkeit mit der die Intensität vorkommt (Anzahl der Pixel mit diesem Intensitätswert); x-Achse: Signalintensität; Mittelwert (Mean); Standardabweichung (Standard deviation); Messfläche (Area = ROI); Minimalwert (min); Maximalwert (max)

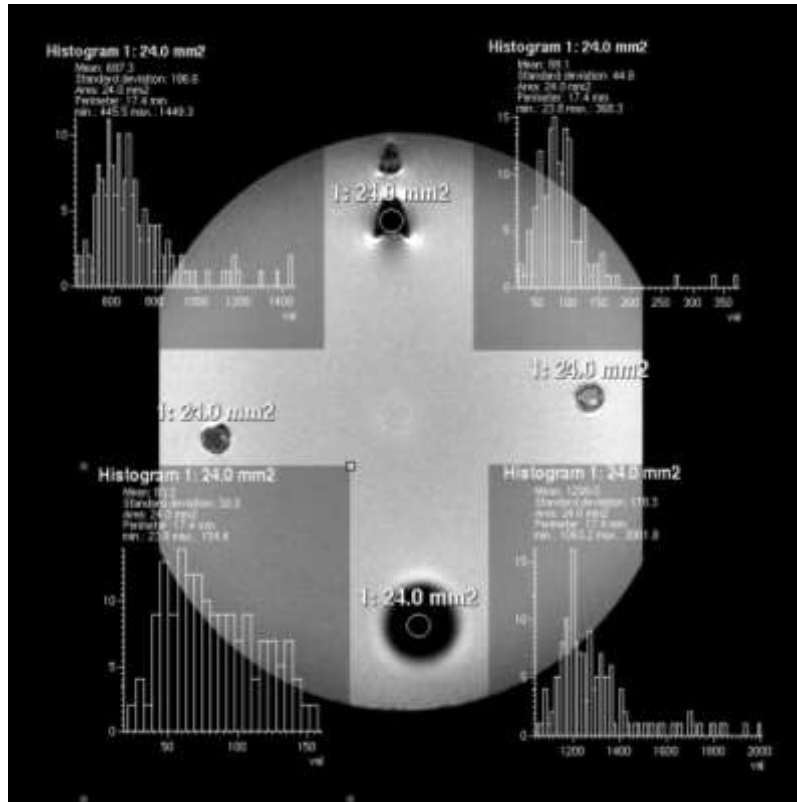


Abbildung 71: MRT-Bild T2 TSE 1 Woche nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10

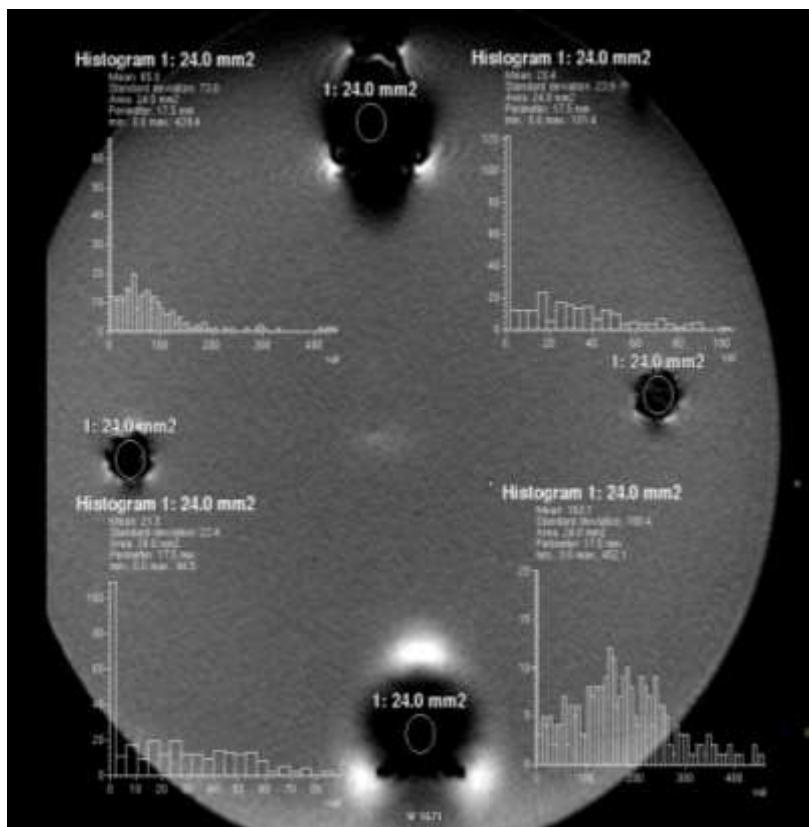


Abbildung 72: MRT-Bild T2 FFE 1 Woche nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10



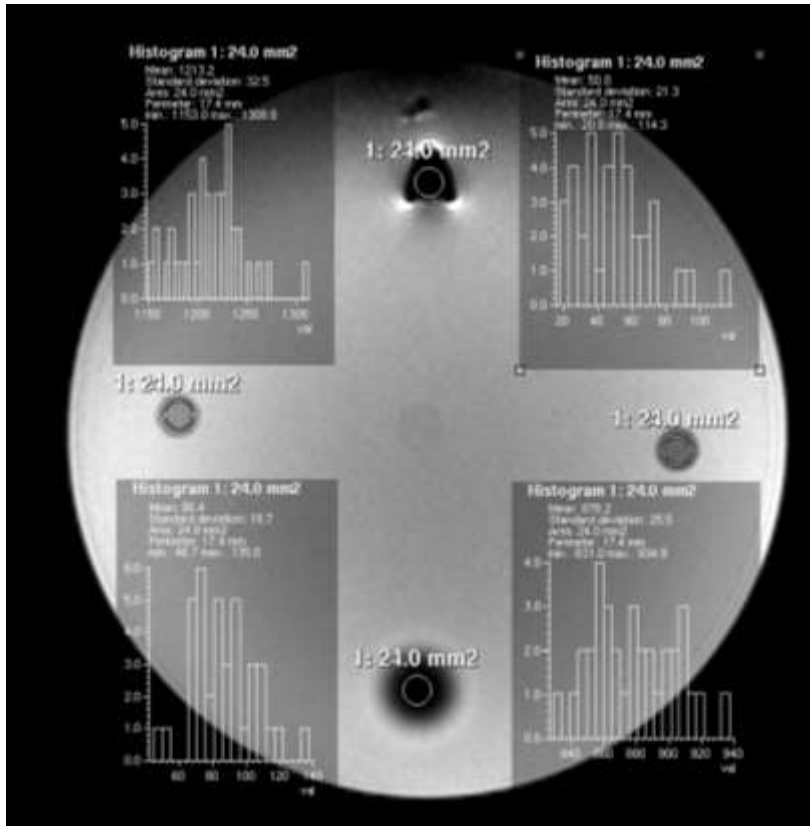


Abbildung 73: MRT-Bild T2 TSE 1 Woche nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12

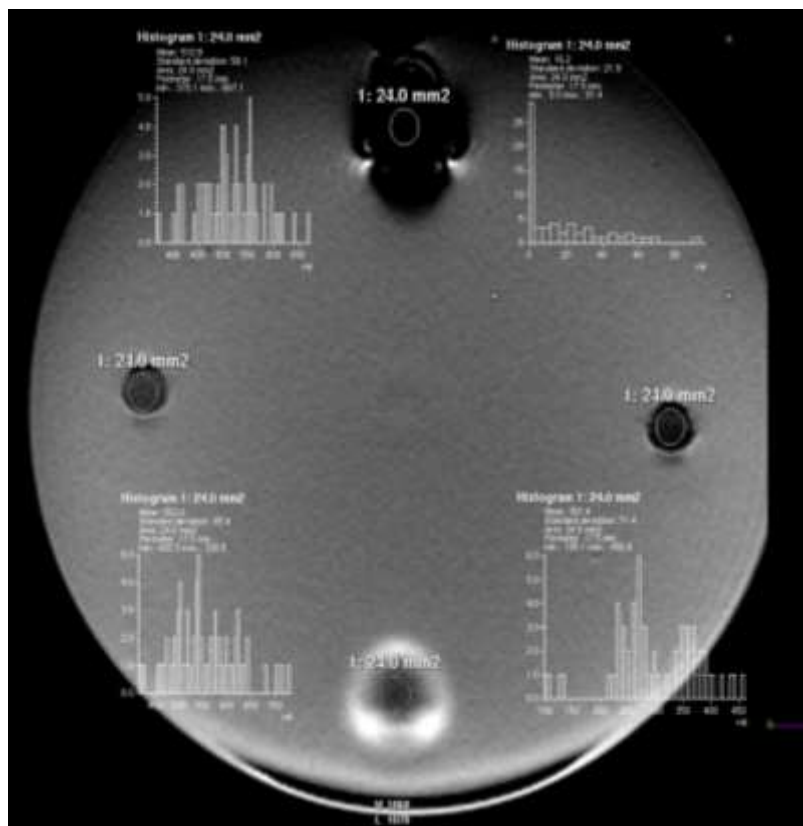


Abbildung 74: MRT-Bild T2 FFE 1 Woche nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12



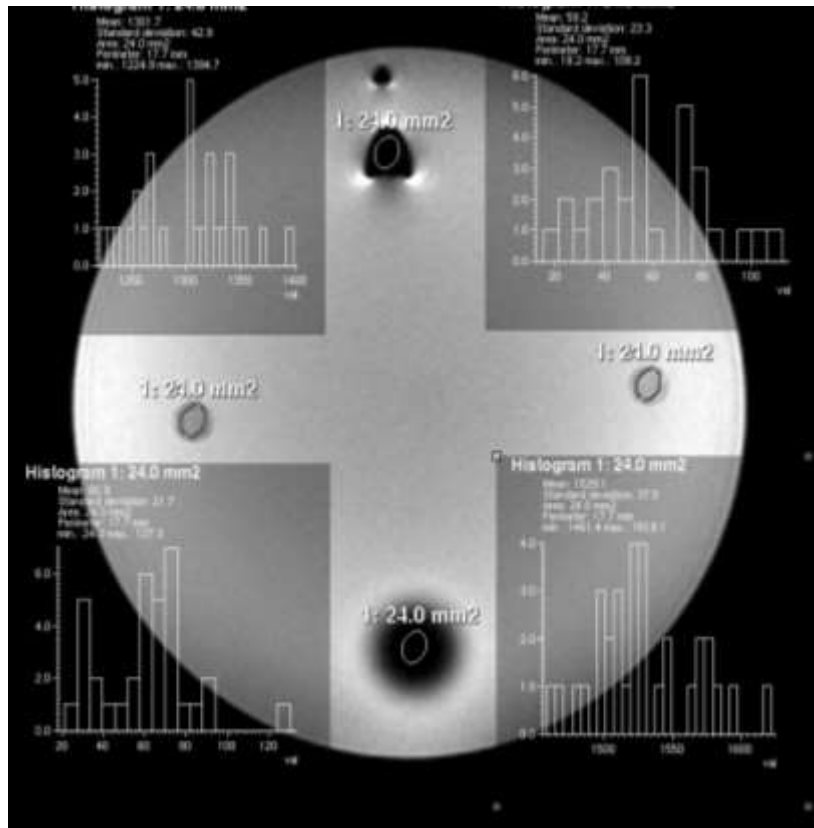


Abbildung 75: MRT-Bild T2 TSE 2 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10

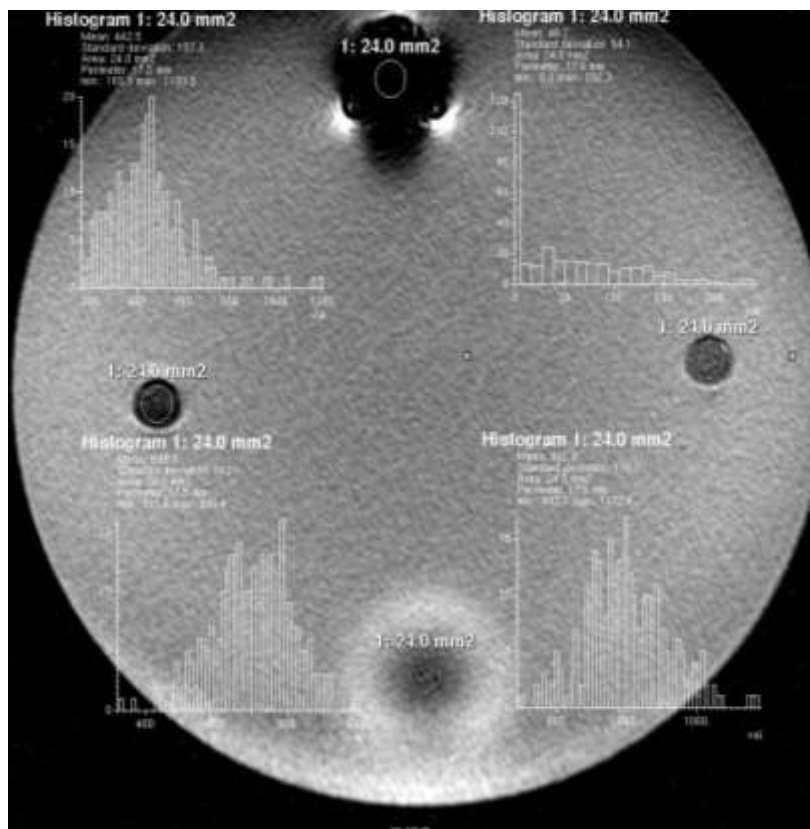


Abbildung 76: MRT-Bild T2 FFE 2 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10

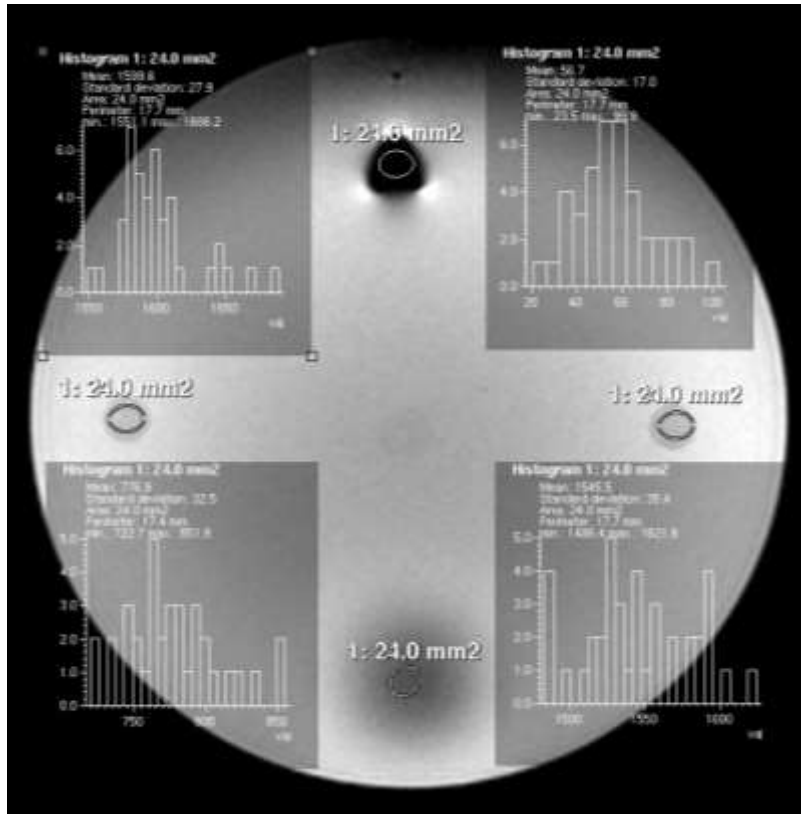


Abbildung 77: MRT-Bild T2 TSE 2 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12

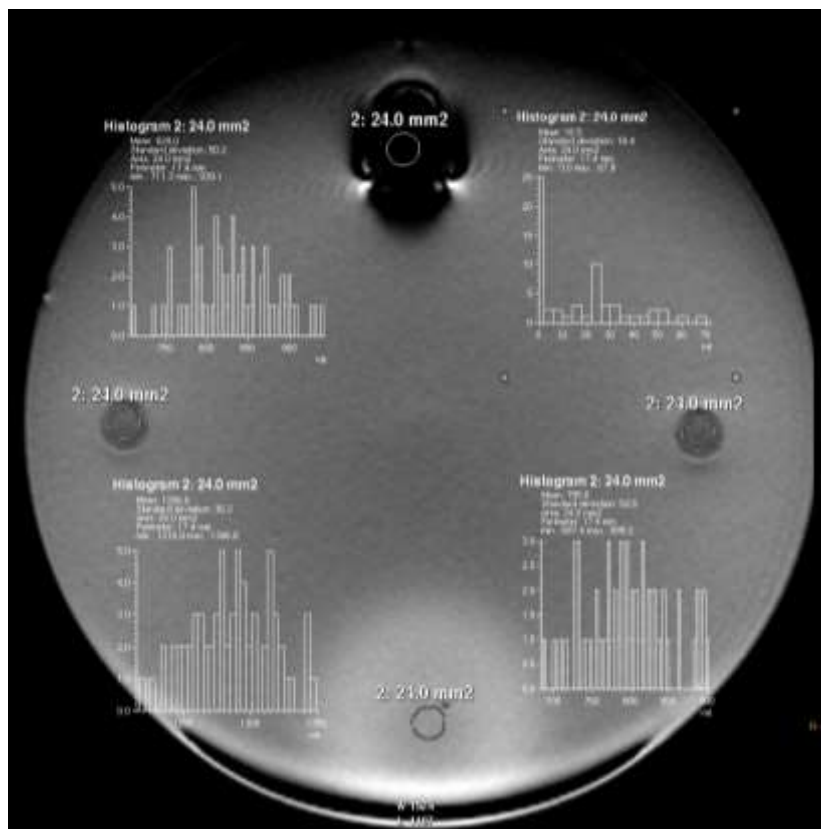


Abbildung 78: MRT-Bild T2 FFE 2 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12

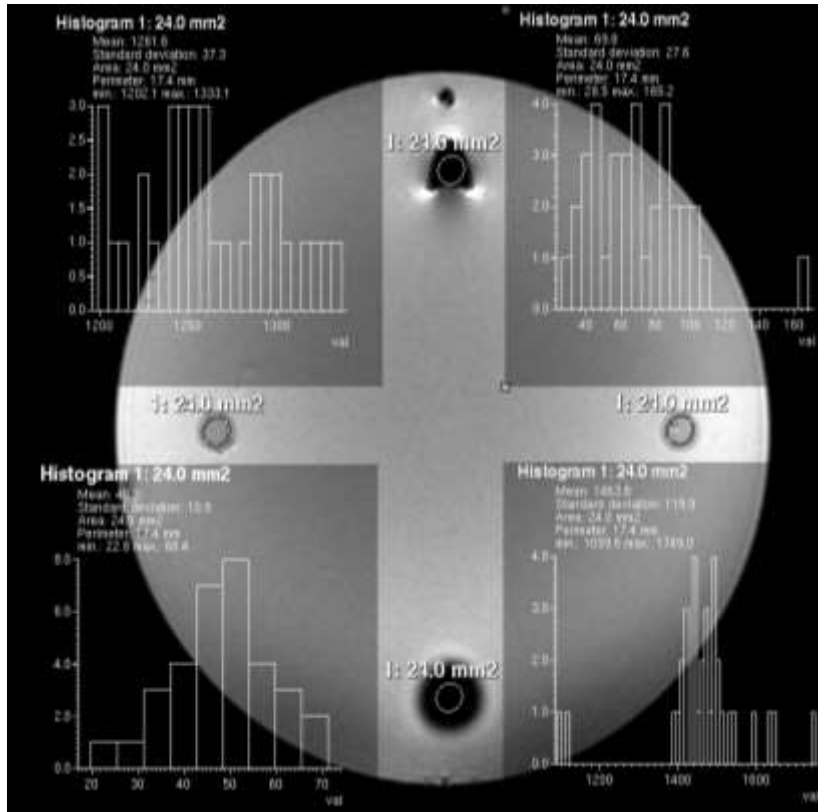


Abbildung 79: MRT-Bild T2 TSE 3 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10

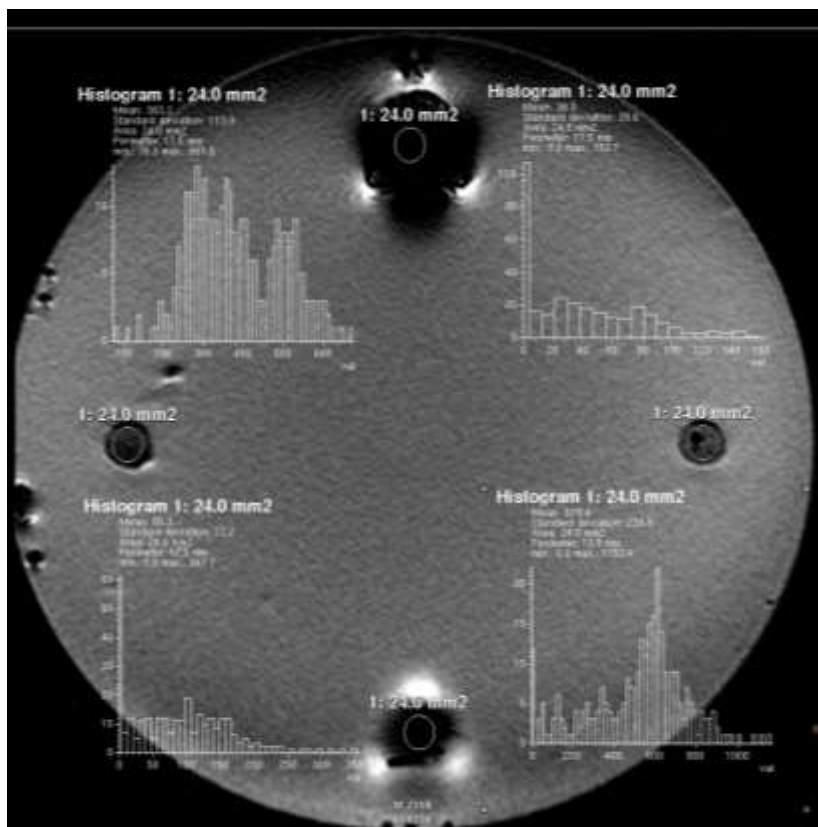


Abbildung 80: MRT-Bild T2 FFE 3 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 127/10 und 128/10

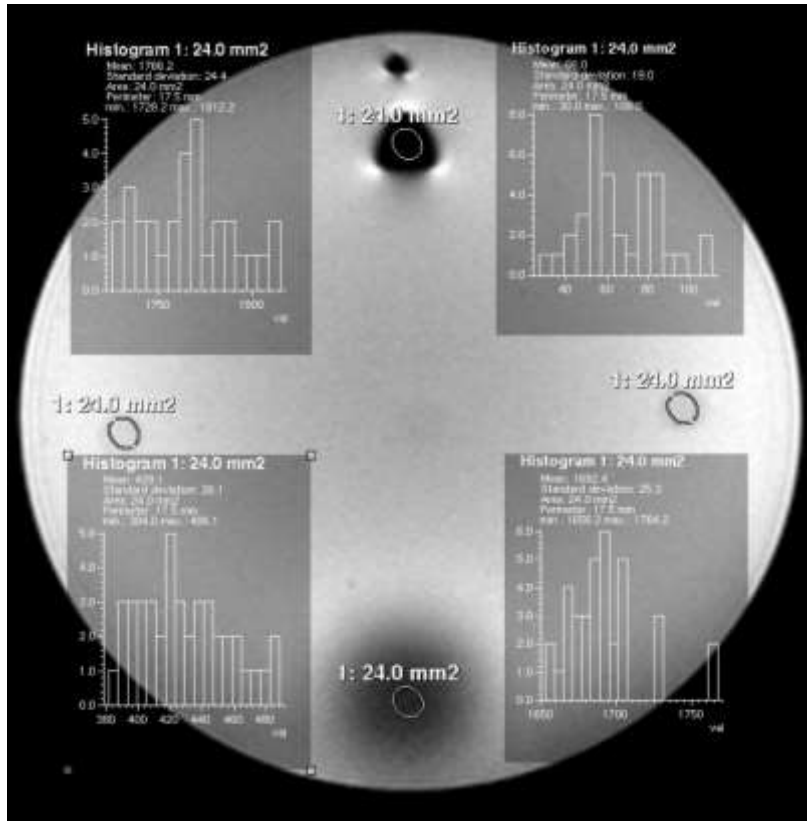


Abbildung 81: MRT-Bild T2 TSE 3 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12

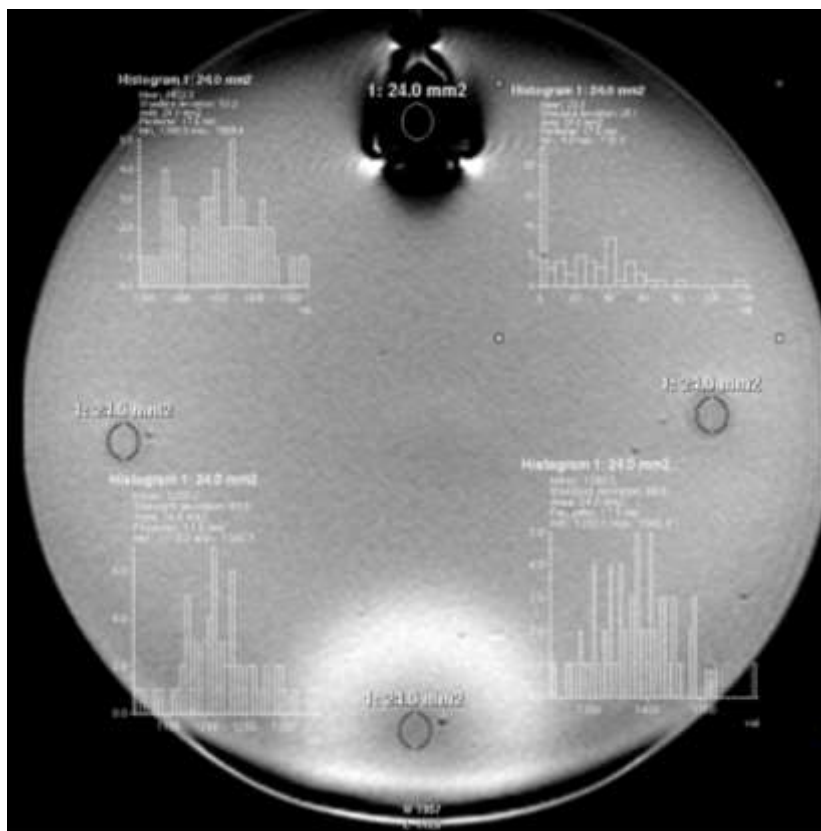
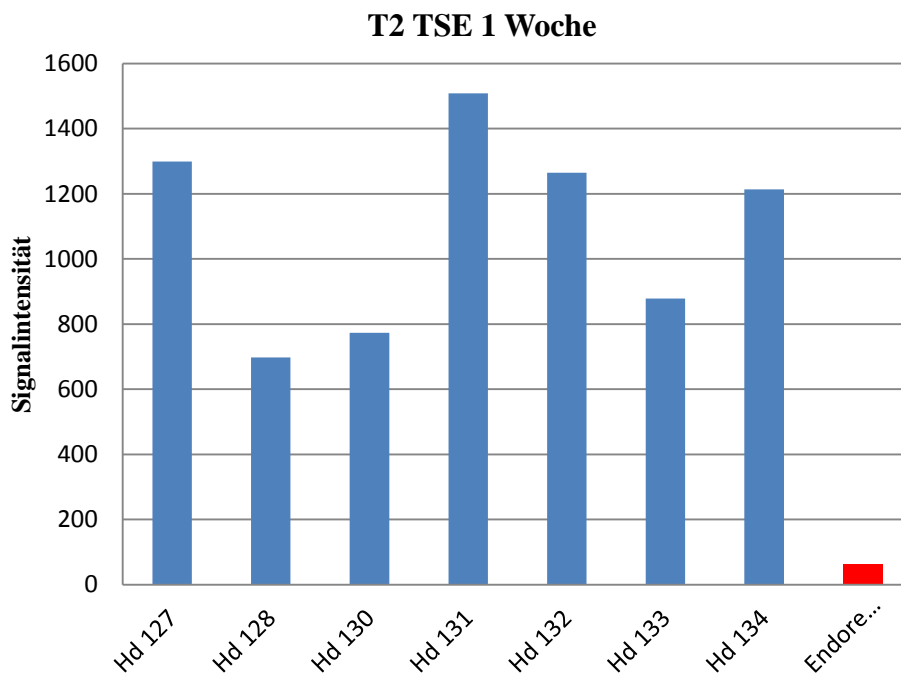


Abbildung 82: MRT-Bild T2 FFE 3 Wochen nach Endorem®-Markierung Hd 133/12 und 134/12

**Tabelle 9: Werte der Signalintensität in der T2 TSE und T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem®-Markierung**

| Hund | MRT Sequenz | 7 Tage | 14 Tage | 21 Tage |
|------|-------------|--------|---------|---------|
| 127  | T2 TSE      | 1299   | 1529,1  | 1463,8  |
| 127  | T2 FFE      | 163,1  | 801,8   | 519,4   |
| 128  | T2 TSE      | 697,3  | 1301,7  | 1261,6  |
| 128  | T2 FFE      | 65     | 442,2   | 383,2   |
| 130  | T2 TSE      | 773,2  | 1070,9  | 786,9   |
| 130  | T2 FFE      | 183,3  | 211,8   | 26,7    |
| 131  | T2 TSE      | 1508,3 | 1715,1  | 1695    |
| 131  | T2 FFE      | 859,5  | 1243    | 892,4   |
| 132  | T2 TSE      | 1265,2 | 1602,1  | 1591    |
| 132  | T2 FFE      | 669,6  | 1130,4  | 828,9   |
| 133  | T2 TSE      | 878,2  | 1696,5  | 1692,4  |
| 133  | T2 FFE      | 301,4  | 795,6   | 1380,5  |
| 134  | T2 TSE      | 1213,2 | 1591    | 1766,2  |
| 134  | T2 FFE      | 510,9  | 829     | 1453,3  |



**Abbildung 83: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 1 Woche nach Endorem®-Markierung und für Endorem®**

### T2 TSE 2 Wochen

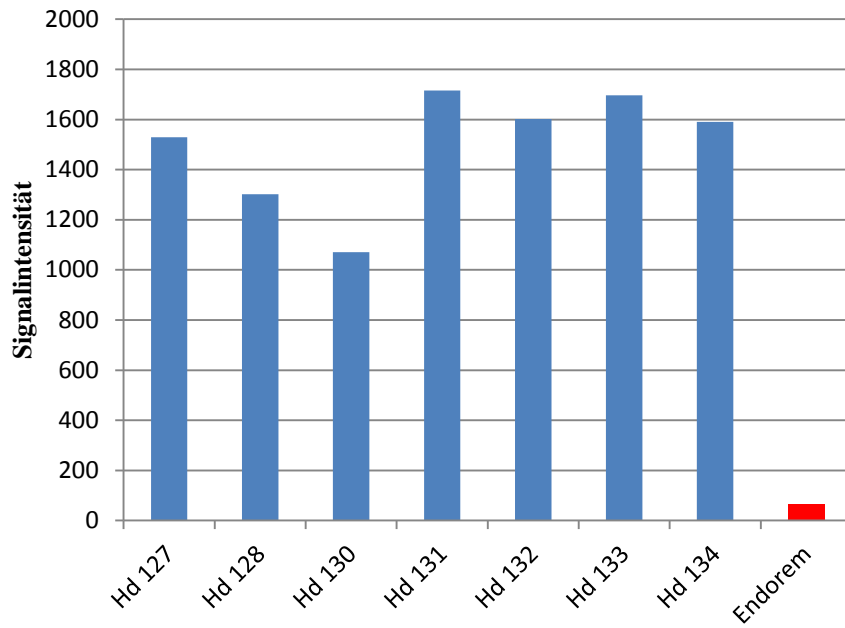


Abbildung 84: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 2 Wochen nach Endorem® - Markierung und für Endorem®

### T2 TSE 3 Wochen

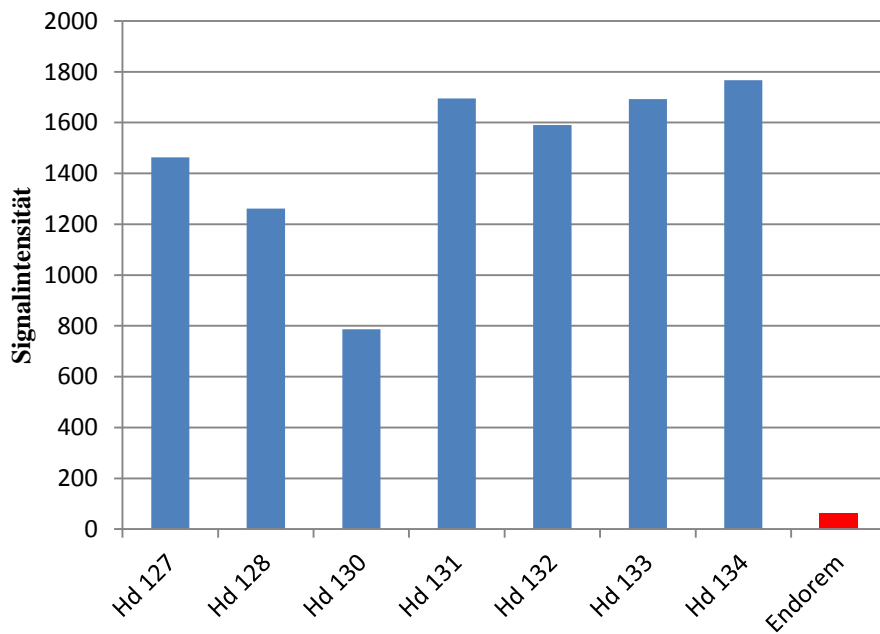


Abbildung 85: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 3 Wochen nach Endorem® - Markierung und für Endorem®

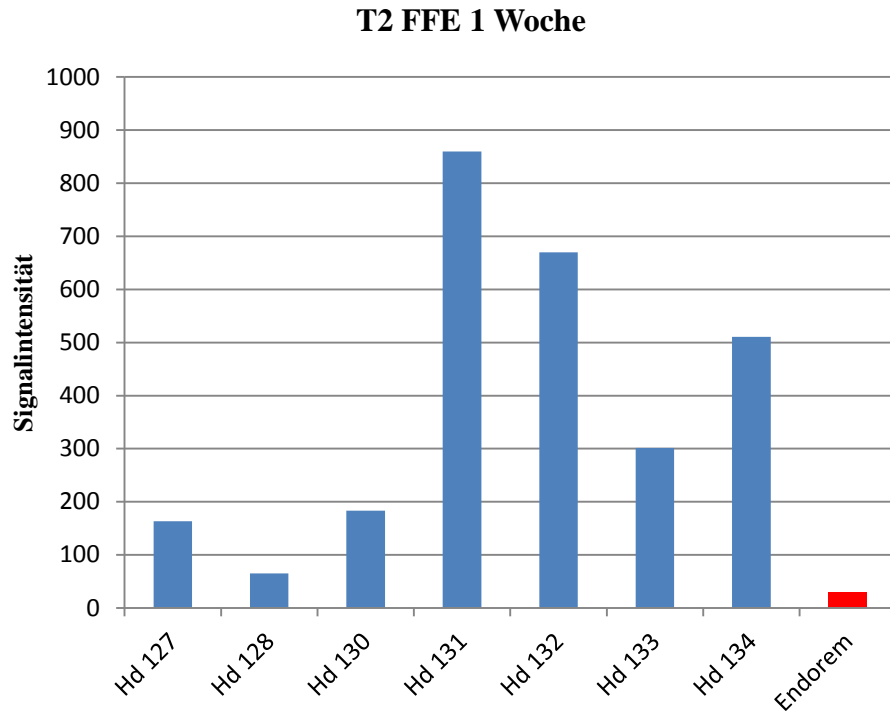


Abbildung 86: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz 1 für alle Proben 1 Woche nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung und für Endorem<sup>®</sup>

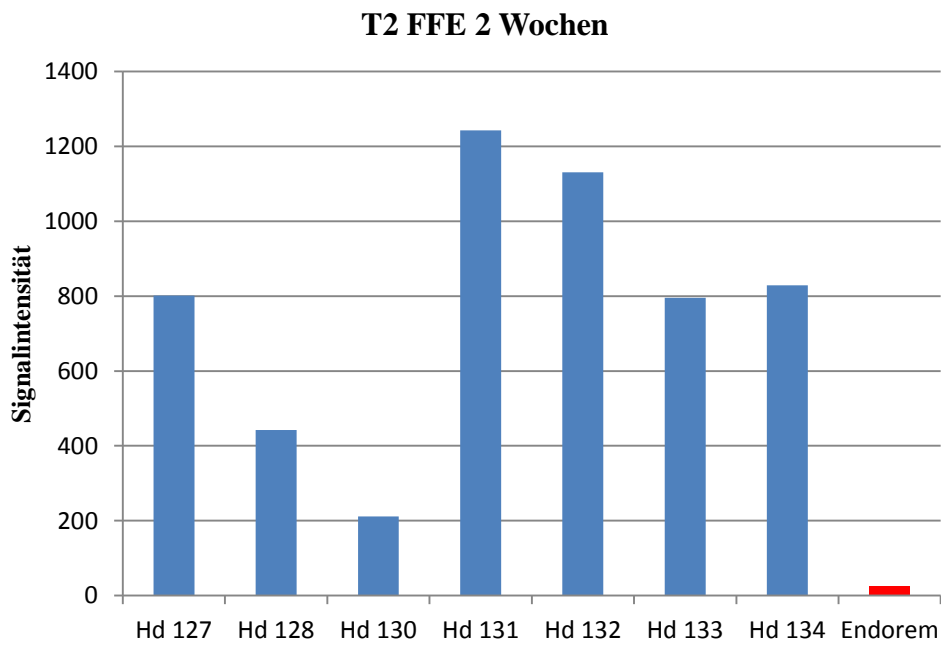
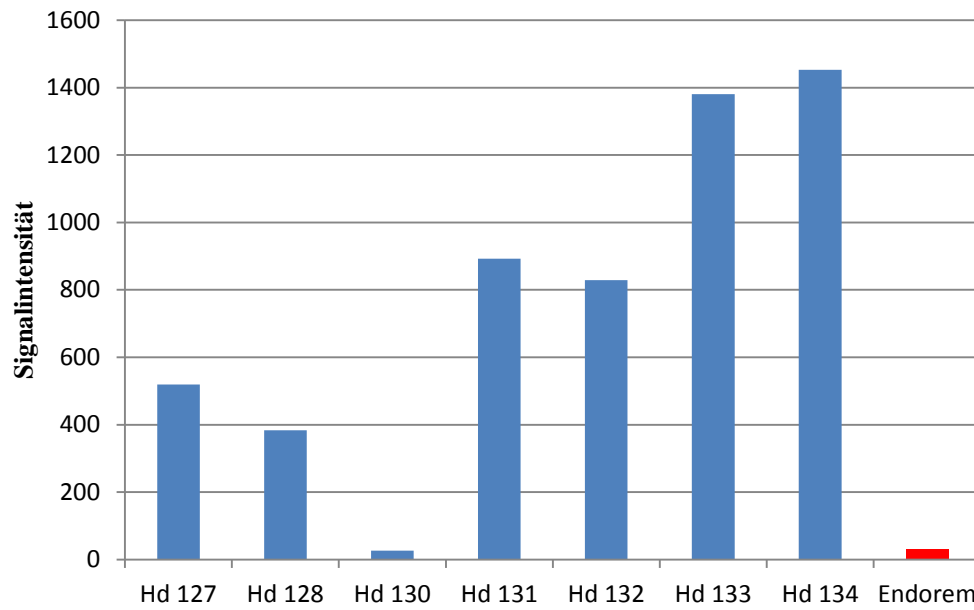


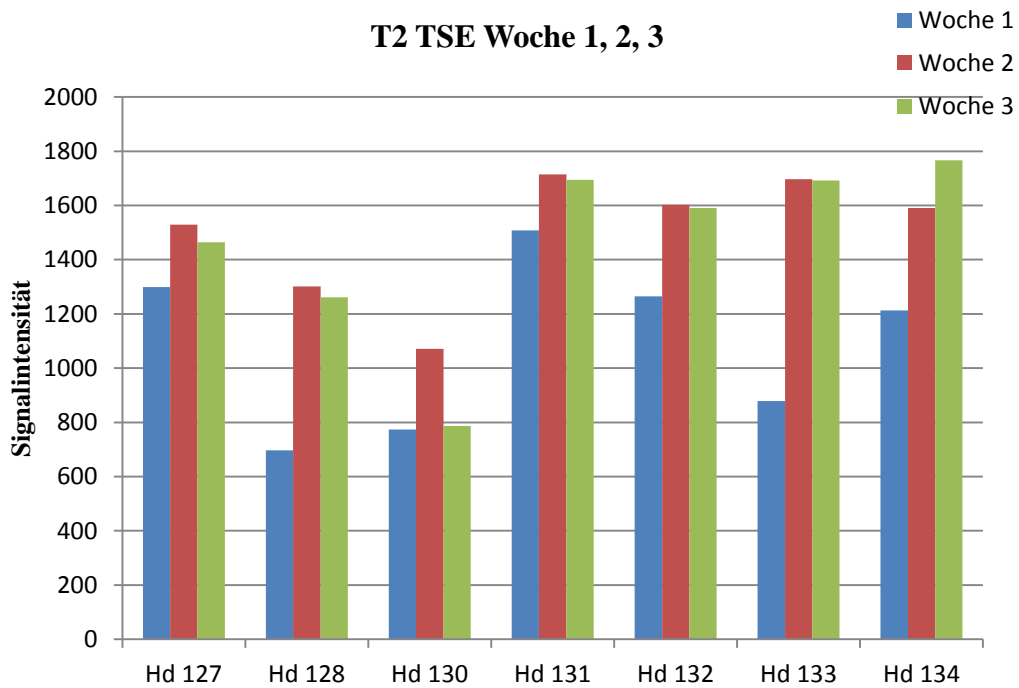
Abbildung 87: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 2 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung und für Endorem<sup>®</sup>

**T2 FFE 3 Wochen**



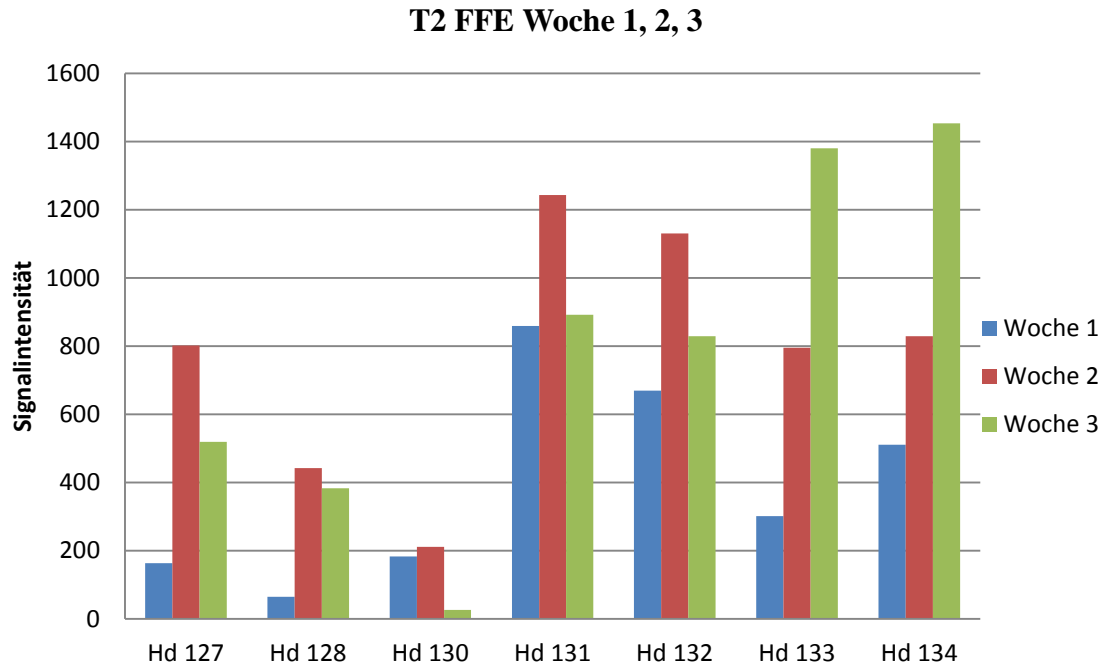
**Abbildung 88: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 3 Wochen nach Endorem®-Markierung und für Endorem®**

**T2 TSE Woche 1, 2, 3**



**Abbildung 89: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem®-Markierung**





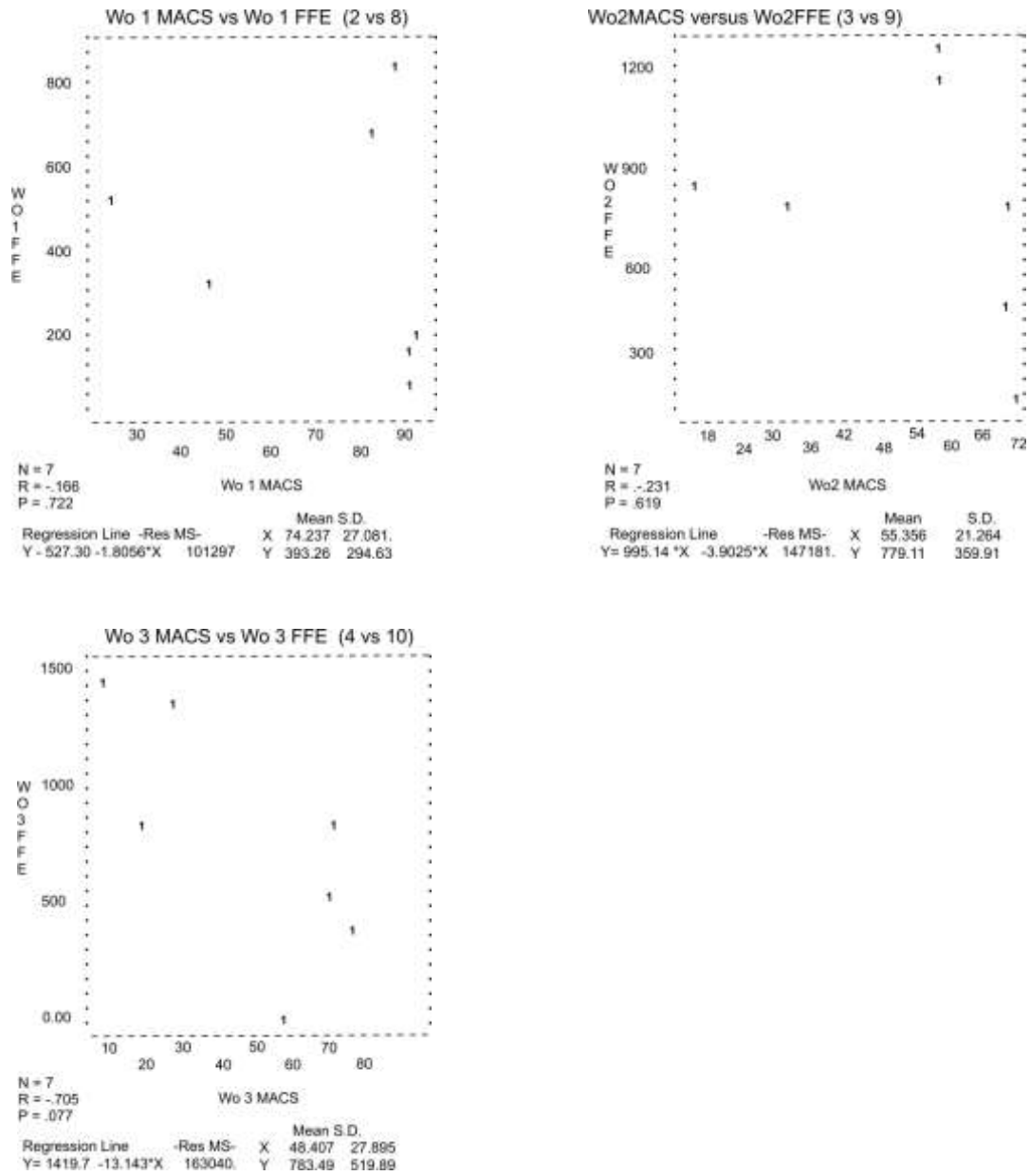
**Abbildung 90: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequen für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung**

Mit Hilfe der zwei-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Sequenz und der Zeit konnte festgestellt werden, dass es signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) zwischen den beiden Sequenzen (T2 TSE und T2 FFE) zu unterschiedlichen Zeitpunkten gibt. Die Signalintensität für die Sequenzen T2 TSE und T2 FFE ändert sich im zeitlichen Verlauf über 3 Wochen. Diese Veränderungen sind statistisch hoch signifikant ( $p = 0,003$ ).

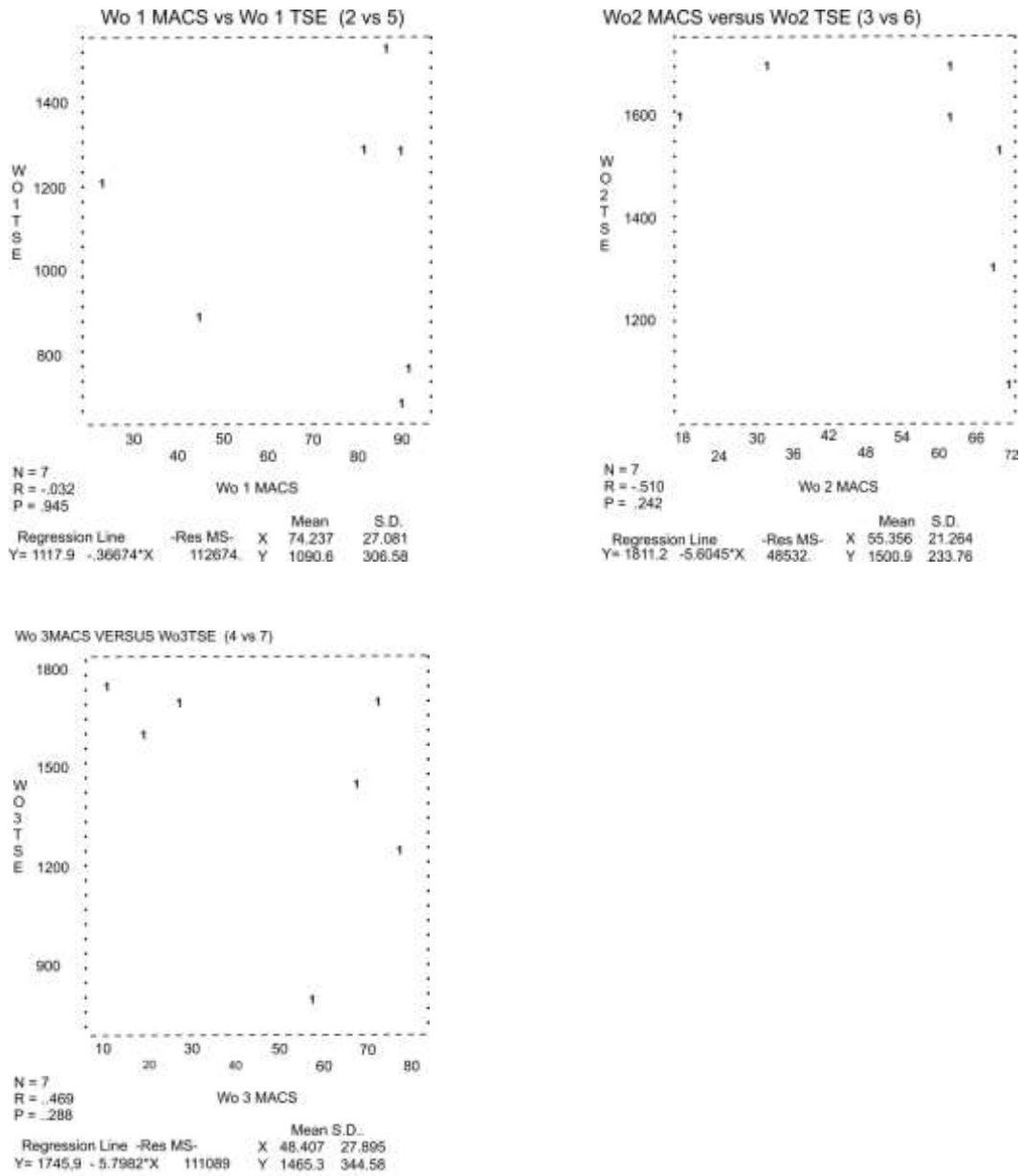
Es wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse zwischen der MACS-Untersuchung und den Signalintensitäten für T2 FFE und T2 TSE für den Zeitpunkt 1, 2, 3 Wochen durchgeführt.

Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und T2 TSE Untersuchung in der Woche 1, 2 und 3 (für Woche 1:  $p = 0,945$ ;  $r = -0,032$ ; für Woche 2:  $p = 0,242$ ;  $r = -0,510$ ; für Woche 3:  $p = 0,288$ ;  $r = -0,469$ ) festgestellt werden. Die Abbildung 93 stellt die Korrelationsanalyse graphisch dar.

Für die MACS-Untersuchung und Signalintensitäten der T2 FFE Untersuchung wurde ebenfalls eine Korrelationsanalyse zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 Wochen berechnet. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Messungen der Signalintensität in der T2 FFE Sequenzen und der MACS-Untersuchung zum Zeitpunkt: 1, 2 und 3 Wochen festgestellt werden (für Woche 1:  $p = 0,722$ ;  $r = -0,166$ ; für Woche 2:  $p = 0,619$ ;  $r = -0,231$ ; für Woche 3:  $p = 0,077$ ;  $r = -0,705$ ). Auf der Abb. 91 werden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse dargestellt.



**Abbildung 91: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT Untersuchung T2 FFE für 1, 2 und 3 Wochen**



**Abbildung 92: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT-Untersuchung T2 TSE für 1, 2 und 3 Wochen**

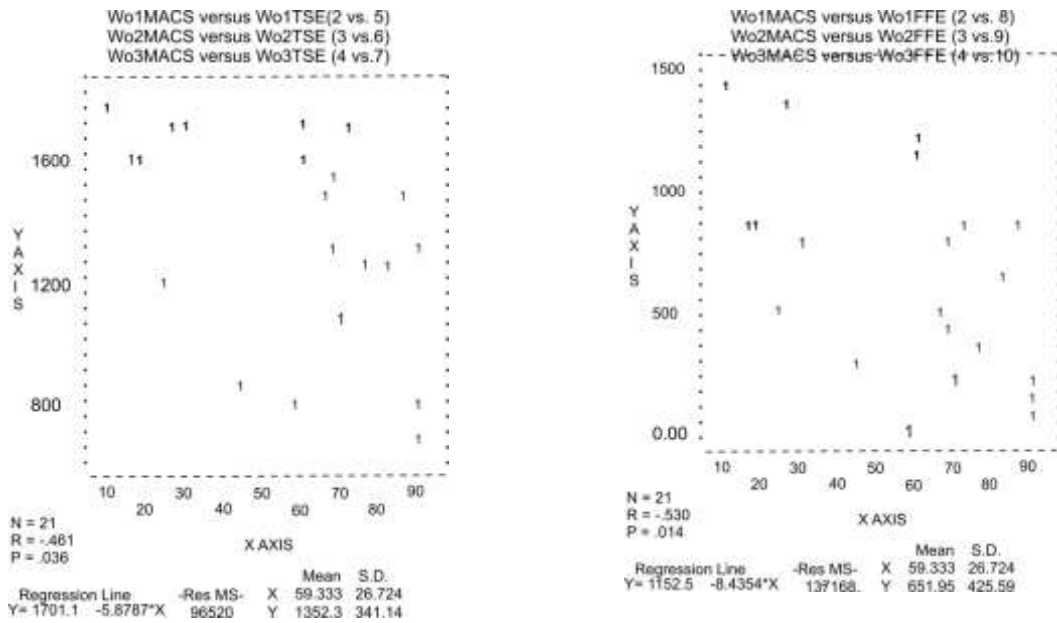


Abbildung 93: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen links für T2 TSE und rechts für T2 FFE für 1,2 und 3 Wochen

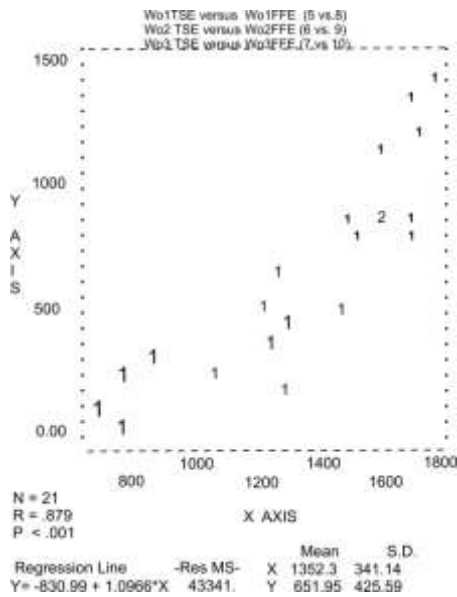


Abbildung 94. Korrelationsanalyse zwischen T2 FFE Sequenz und T2 TSE Sequenz für 1, 2 und 3 Wochen

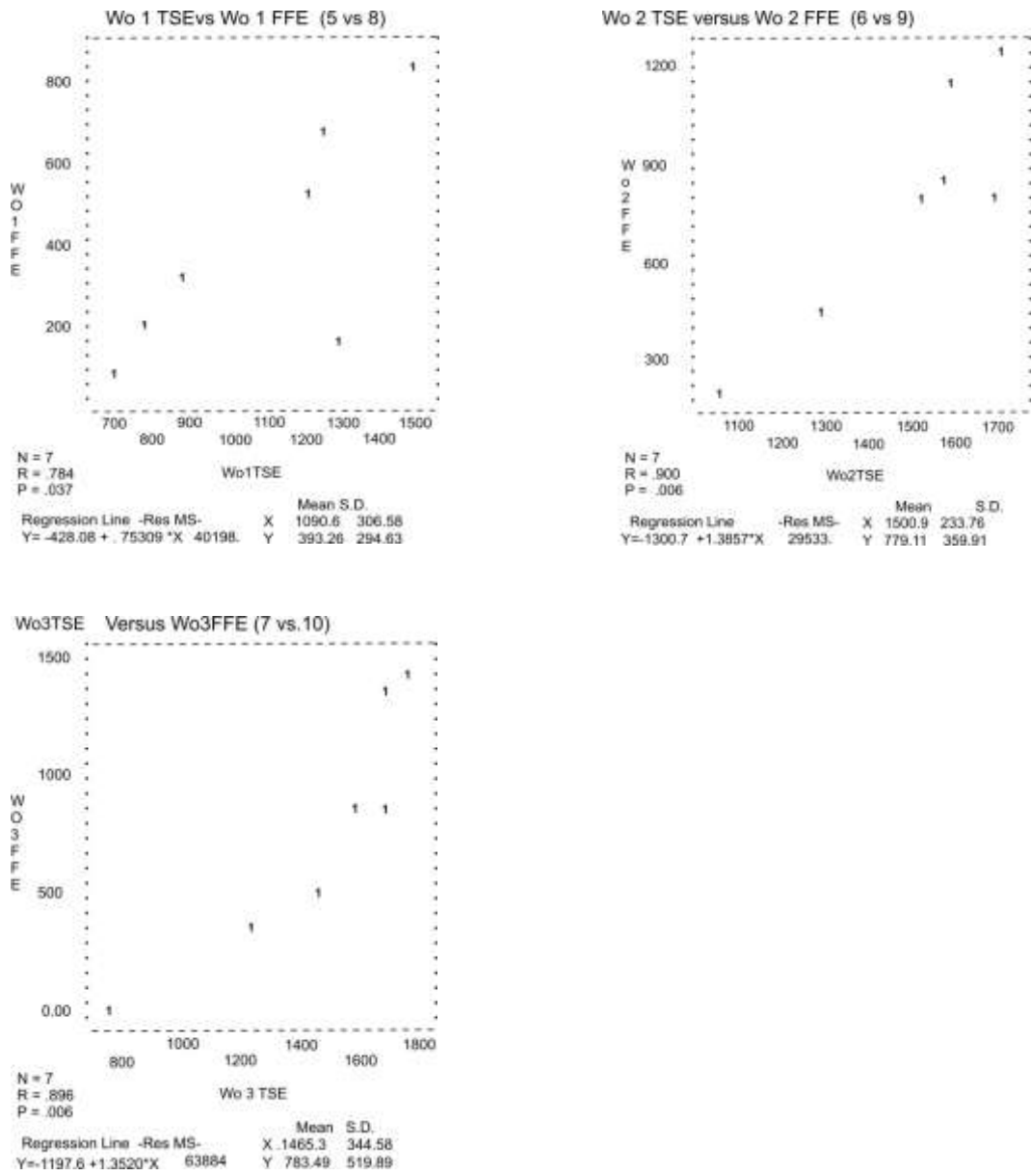


Abbildung 95: Korrelationsanalyse zwischen T2 FFE Sequenz und T2 TSE Sequenz für jeweils 1, 2 und 3 Wochen

## 5 Diskussion

### 5.1 Isolierung der Stammzellen aus dem Fettgewebe

Autologe Stammzellen aus Fettgewebe können in großen Mengen einfach und nicht invasiv isoliert und in Kultur vermehrt werden (VIDAL et al. 2007). RODBELL (1965) beschreibt als erster die Isolation von Fettzellen und *Stromal Vascular Fraction* (SVF) aus dem Fettgewebe mittels Collagenase. Die SVF enthält Blutzellen, Perizyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Fettzellprekursoren (adipogene Stammzellen ASCs). Die weitere Isolation der ASCs erfolgt durch Inkubation auf einer Plastikoberfläche. Die ASCs im Gegensatz zu anderen Zellen sollten sich an die Plastikoberfläche heften (BUNNELL et al. 2008). In der durchgeführten Studie gelten Zellen, die sich an die Oberfläche der Zellkulturflaschen geheftet haben als adipogene Stammzellen. Die *International Society for Cellular Therapy* schlägt jedoch vor, dass man Stammzellen weiter vorselektieren sollte, die positiv für Oberflächenantigene wie CD105, CD73 und CD90 in der Flusszytometrie und gleichzeitig negativ für CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19 und HLA Klasse II (DOMINICI et al. 2006) sind. In der vorliegenden Studie werden die Stammzellen anhand der Oberflächenantigene nicht vorselektiert. RYU et al. (2009) empfiehlt ASCs vor Differenzierungsexperimenten von den CD45 (Hämatopoetische und Leukozytenlinie) und CD31 (endotheliale Linie) Zellen zu trennen, weil sogar kleine Kontamination mit hämatopoetischen Stammzellen eine Quelle der Differenzierung sein könnte. LIM et al. 2007, BUNNELL et al. 2008 berücksichtigen in eigenen Studien nur Adhärenz an Plastik als Kriterium für die MSCs.

### 5.2 Endorem<sup>®</sup>-Aufnahme durch ASCs und Markierungseffizienz

Die von SYKOVA und JENDELOVA (2007) und KÜSTERMANN und Mitarbeiter (2007) beschriebene spontane Aufnahme des Kontrastmittels Endorem<sup>®</sup> konnte in dieser Studie bestätigt werden. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte die Endorem<sup>®</sup>-Partikel Aufnahme aus dem Medium per Endozytose durch die Stammzellen dokumentiert werden (Abb. 32).

Es sind zahlreiche Protokolle der Markierungskonzentration von Eisenpartikeln von 1 - 2 800  $\mu\text{g/ml}$  beschrieben. Es werden auch unterschiedliche Markierungszeiten von 1 bis 72 Stunden

angegeben. Bei längerer Inkubationszeit so wie höherer Konzentration ist mit einem negativen Einfluss auf die Zellen zu rechnen (THOREK, TSOURKAS 2008). KRUTTWIG (2009) beschreibt die Markierung von MSCs mit 112 µg/ml (Fe = 79,8 µg/ml) und 224 µg/ml Endorem<sup>®</sup> (Fe = 159,6 µg/ml) über 20 - 24 Stunden. Bei diesen Konzentrationen zeigten die Zellen eine ungleichmäßige Endorem<sup>®</sup>-Aufnahme und es waren auch Zellen vorhanden, die keine Eisenpartikel enthielten. In der vorliegenden Studie sollten alle Stammzellen markiert werden. Deswegen wurden im Rahmen von Vorversuchen die Stammzellen von 2 unterschiedlichen Hunden jeweils mit 10 µl (entspricht SPIO-Gehalt von 158,1 µg/ml und Eisengehalt von 112 µg/ml), 28,35 µl ( SPIO = 448 µg/ml und Fe = 319,2 µg/ml) und 40 µl ( SPIO = 632,4 µg/ml und Fe = 448 µg/ml ) Endorem<sup>®</sup> über 24 Stunden inkubiert, um die optimale Beladung für diese Studie zu bestimmen. Bei der Konzentration von 448 µg/ml wurde jede Zelle markiert. Des Weiteren scheint die Zellteilung bei dieser Konzentration in *Life Cell Imaging* über den Zeitraum von 24 Stunden unbeeinflusst zu bleiben. Aus diesen Gründen wurde in dieser Studie die Konzentration von 448 µg/ml SPIO verwendet. Diese Konzentration scheint ausreichend zu sein, die markierten Stammzellen nach 3 Wochen in einem 1 Tesla Magnetresonanztomographen darzustellen, obwohl die Stammzellen von dem Zeitpunkt der Markierung bis zur Untersuchung 3 Wochen später stark proliferieren. Zur Verifizierung der Endorem<sup>®</sup>-Aufnahme wurde eine Berliner Blau Färbung durchgeführt.

KÜSTERMANN und Kollegen (2008) berichten, dass Stammzellen (neuronale Progenitorzellen und embryonale Stammzellen) schon 24 Stunden nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung spontan die Eisenpartikel ins Medium abgeben. Das spontane Abgeben der Endorem<sup>®</sup>-Partikel wurde in dieser Studie nicht untersucht. Sollten die Stammzellen spontan Endorem<sup>®</sup> ins Medium abgeben, ist die Markierungskonzentration trotzdem hoch genug die Stammzellen 3 Wochen später in der MRT-Untersuchung darzustellen. Die Neigung der Stammzellen das Kontrastmittel abzugeben, sollte genauer für in vivo Studien untersucht werden: werden Kontrastpartikel an Hostzellen weitergegeben, wird es unmöglich sein diese von markierten Stammzellen zu unterscheiden.

Die Markierungseffizienz kann entweder durch die Bestimmung der Anzahl markierter Zellen oder Bestimmung der Menge der Markierungssubstanz in den Zellen erfolgen (BERNSEN et al. 2010). In dieser Studie wurde die Markierungseffizienz durch die quantitative Prozentzahlbestimmung der mit Eisen markierten Zellen mit Hilfe eines MACS-Separators und durch den histopatologischen Nachweis mittels Berliner Blau Färbung überprüft. Man



kann annehmen, dass die magnetische Trennung der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen mittels MACS-Separator eine zuverlässige Methode darstellt, markierte von nicht markierten Zellen zu unterscheiden. Der Vorteil der Methode ist, dass man bei der Zellsortierung mittels MACS die gesamte Zellpopulation untersuchen kann. Zusätzlich ist die Methode vertrauenswürdig, da die negative Zellfraktion keine Eisenpartikel enthält, was mittels Berliner Blau Färbung verifiziert wird.

Die Berliner Blau Färbung zeigt, ob die Stammzellen Eisenpartikel aufgenommen haben. Eine Quantifizierung der markierten Zellen unter dem Mikroskop stellt sich jedoch problematisch dar. Nicht alle Präparate sind von gleich guter Qualität. Für das Zählen von markierten Zellen wurden Präparate ausgesucht, die von möglichst guter Qualität sind. Es wurden nur die Zellen als markiert bezeichnet, welche mehr als 10 Eisenpartikel enthalten, weil besonders nach 3 Wochen viele Zellen vorhanden sind, die nur 1 - 5 Eisenpartikel enthalten. Dieser Eisenpartikelgehalt könnte für eine im MRT nachweisbare Markierung unzureichend sein. Manche Präparate sind aufgrund schlechter Qualität nach Berliner Blau Färbung nur eingeschränkt auswertbar. Die Zählung ist dadurch erschwert.

Die markierten Stammzellen enthalten mit Ausnahme der Proben 128/10 und 130/11 weniger Eisenpartikel zum Zeitpunkt 3 Wochen als nach 3 Tagen.

Die Abnahme der Eisenpartikel in Stammzellen im zeitlichen Verlauf ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,204$ ). Die Eisenabnahme geschieht im zeitlichen Verlauf zufällig. Ebenfalls ist eine Bestimmung der Referenzwerte für Eisenpartikelzahl in einzelnen Zellen für die Zeitpunkten 3, 7, 14 und 21 Tage mittels 95 %-Konfidenzintervallen aufgrund einer starken Streuung nicht möglich.

Bei der Zellteilung werden die Eisenpartikel nicht gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben. In diesem Fall müssten am Ende der Untersuchung nach 3 Wochen nur Zellen sichtbar sein, die gleiche Eisenmengen enthalten. Wir beobachten stattdessen Zellen die sehr unterschiedliche Mengen an Eisenpartikeln aufweisen. Es sind Zellen zu sehen, die keine oder fast keine Eisenpartikel enthalten und im Gegensatz dazu auch die Zellen die deutlich mehr als 10 Partikel pro Zelle enthalten (Abb. 15).

Die Auswertung des prozentuellen Anteils markierter Zellen stellt sich problematisch dar, da Proben vorhanden sind, die nach 2 oder 3 Wochen  $< 10$  Eisenpartikel enthalten. Die Mehrheit der Zellen ist allerdings noch markiert. Da in dieser Studie angenommen wurde, dass die Zellen erst ab 10 Partikel als markiert gelten, werden diese Zellen in der statistischen

Auswertung als „nicht markiert“ betrachtet. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen in manchen Proben entweder einen hohen Gehalt an Eisen oder es gibt auch Zellen ohne Eisengehalt. Es ist schwierig einzuschätzen inwiefern die Verteilung der Eisenpartikel einen Einfluss auf die MRT-Untersuchung hat. Ebenfalls ist fraglich ob es zu stärkerer Kontrastauslöschung kommt, wenn die Eisenpartikel gleichmäßig in den markierten Zellen verteilt sind und alle Stammzellen einen ähnlichen Eisengehalt zeigen oder wenn manche Stammzellen sehr viel Kontrastpartikel enthalten und manche fast gar keine. Um eine dahin gehende Schlussfolgerung zu ziehen, ist die Untersuchung einer größeren Menge an Zellen nötig.

Im Gegensatz zur Berliner Blau Färbung konnte mittels MACS nachgewiesen werden, dass der Anteil der markierten kaninen Stammzellen im zeitlichen Verlauf sinkt. Diese Abnahme der markierten Zellen ist statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0007$ ).

Die MACS-Untersuchung stellt eine gute Methode des quantitativen Nachweises der Anzahl der markierten Zellen dar. Mittels Berliner Blau Färbung ist es möglich qualitativ die Erfolge einer Eisenmarkierung zu beurteilen. Theoretisch ist es möglich die markierten Zellen unter dem Mikroskop zu zählen. In manchen Situationen, wenn Zellen Konglomerate bilden oder auf einander liegen, ist das Zählen erschwert. Bei Folgeversuchen kann man die Berliner Blau gefärbten Zellen nicht mehr verwenden. Der Vorteil der MACS-Trennung ist, dass man die getrennten Zellen weiter verwenden kann. Dabei wird im Gegensatz zu Berliner Blau Färbung die gesamte Population der Zellen untersucht. Dadurch werden die Ergebnisse genauer. Die quantitative Beurteilung der Eisenpartikelmenge in einzelnen Zellen, stellt sich schwierig dar. Es wird eine weitere Methode benötigt, Eisenpartikel in Zellen zu zählen, bzw. den Eisengehalt der Zellen zu bestimmen.

### **5.3 Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf das Zytoskelett**

In der durchgeführten Studie konnte kein negativer Einfluss der Endoremmarkierung auf das Zytoskelett festgestellt werden. SOENEN und Mitarbeiter (2010) berichten, dass eine Endorem<sup>®</sup>-Konzentration von 600mg Fe/ml geringgradig die Zellausbreitung innerhalb den ersten 6 Tagen nach der Markierung beeinflusst. In der Studie wurden neuronale Progenitorzellen und Phäochromozytomzellen von Ratten, so wie humane endotheliale Zellen untersucht. Die Reduktion von Endorem<sup>®</sup>-Konzentration bis 400 mg Fe/ml zeigt keinen negativen Einfluss auf das Zytoskelett. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Stammzellen in der Studie von SOENEN vor der Markierung mit einem Transfektionsreagenz

(Lipofectamine) inkubiert werden. In unserer Studie nehmen die Stammzellen Endorem<sup>®</sup> spontan auf. Die Endorem<sup>®</sup>-Konzentration zur Markierung der Stammzellen liegt bei 28,35 µl, was 448 µg/ml Fe entspricht. Es konnte keine negative Auswirkung auf das Zytoskelett beobachtet werden. Es wurde jedoch keine Zellausbreitung gemessen, sondern es wird die Integrität der Aktinfilamente und deren Verlauf beurteilt und mit der Kontrollprobe verglichen.

#### **5.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Untersuchung der Eisenpartikelverteilung in der Zelle**

Endorem<sup>®</sup>-Partikel werden durch Endozytose spontan durch die Zellen aufgenommen (SYKOVA & JENDELOVA 2007, KÜSTERMANN et al. 2007). „Bei der Endozytose werden feste oder gelöste Stoffe durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran ins Cytosol aufgenommen“ (LIEBICH 1999). Die Endozyten können entleert werden und die endozytierten Membranvesikel werden für den Membranaufbau verwendet oder im Rahmen einer Transzytose durch die Zelle gelangen und an einer anderen Stelle ausgeschieden werden. Endosomen verschmelzen mit Lysosomen, die Hydrolasen enthalten und für die Verdauung der endozytierten Substanzen zuständig sind (ENGELHARDT & BREVES 1999). Die Aufnahme per Endozytose konnte festgehalten werden (Abb.32). Nach der Aufnahme befinden sich die Endorem<sup>®</sup>-Partikel entweder als unregelmäßige Cluster frei im Zytoplasma oder sind in den Organellen wie Endosomen und Lysosomen integriert. Man kann sagen, dass nach ein bis zwei Wochen die meisten Endorem<sup>®</sup>-Partikel frei im Zytoplasma liegen. Im Gegensatz dazu, scheinen die meisten Partikel nach 3 Wochen in den Organellen (Lysosomen und Lysosomen im Endstadium) eingebaut zu sein. Es sind aber auch vereinzelt unregelmäßige Cluster von Eisenpartikeln im Zytoplasma vorhanden. Die Eisenpartikel konnten in keinen anderen Organellum festgestellt werden. In der Kontrolluntersuchung der Stammzellen ohne Markierung konnten über die gesamte Zelle diffus verteilte schwarze Punkte gefunden werden. Die Lysosomen stellen sich auch bei manchen Kontrollzellen elektronendicht (schwarz) dar, weil sie wahrscheinlich unterschiedliche Metaboliten enthalten. Endorem<sup>®</sup>-Partikel stellen sich in Lysosomen als Einschlüsse mit unregelmäßigen Rändern dar.

SYKOVA und JENDELOVA (2006) berichten, dass nach einer Inkubation in Endorem<sup>®</sup> haltigem Medium über 2 - 3 Tage Cluster von Eisenpartikeln im Zytoplasma in der TEM-Untersuchung zu sehen sind. Die Eisenpartikel sind von einer Membran umgeben.

In der Studie von POLITI und Mitarbeitern (2006) werden die SPIO in den neuronalen Prekursorzellen als elektronendichte intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen dargestellt, die unter Vergrößerung granuliert und von einer Membran ummantelt sind.

KÜSTERMANN und Mitarbeiter (2008) beobachten nicht nur die Endosomenbildung sondern auch die Bindung der SPIO-Partikel an die äußere Zellmembran nach einer Inkubation über 24 Stunden mit Endorem<sup>®</sup>. In der vorliegenden Studie konnten keine Eisenpartikel außerhalb der Zelle beobachtet werden, wahrscheinlich, weil die TEM-Untersuchung erst nach 1, 2 oder 3 Wochen stattgefunden hat. Die Autoren stellen weiterhin fest, dass die Stammzellen Endorem<sup>®</sup>-Partikel während einer weiteren Inkubation Eisenpartikel spontan ins Medium abgeben. Eine Untersuchung von Relaxationszeiten des Überstandes hat das bestätigt, dass im Medium Endorem<sup>®</sup> enthalten ist. In der vorliegenden Studie wurde dieser Aspekt nicht untersucht. Es sind jedoch trotz vermutlicher Partikelabgabe 2 und 3 Wochen nach Inkubation mit Endorem<sup>®</sup>-Eisenpartikeln in den Zellen vorhanden. Auf den Transmissionselektornenmikroskopiebildern ist es zu erkennen, dass nach 3 Wochen weniger Eisenkonglomerate als im Vergleich zu einer und zwei Wochen zu sehen sind. Wahrscheinlich ist das dadurch zu erklären, dass die Endorem<sup>®</sup>-Partikel durch die Zelle per Endozytose aufgenommen werden. Danach liegen sie zum Teil frei im Zytoplasma oder sind in Organellen wie Endosomen und Lysosomen zu sehen. Eine mögliche Erklärung ist der Abbau des Endorem<sup>®</sup> in Lysosomen. Es konnte in der TEM Untersuchung nicht nachgewiesen werden, dass die Stammzellen die Endorem<sup>®</sup>-Partikel wieder aus der Zelle ausscheiden. Man kann aber in mehreren Residualkörpern Endorem<sup>®</sup>-Cluster erkennen.

## **5.5 Untersuchung der Multipotenz der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen**

In dieser Untersuchung sollte festgestellt werden, ob eine Markierung mit Endorem<sup>®</sup> einen Einfluss auf die Multipotenz der mesenchymalen kaninen Stammzellen hat. Die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninen Stammzellen wurden einer adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung unterzogen und mit einer unmarkierten Gruppe verglichen.

### 5.5.1 Adipogene Differenzierung

Es wurden Zellen von zwei unterschiedlichen Hunden untersucht und in beiden Fällen konnte kein negativer Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf adipogene Differenzierung festgestellt werden. Die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen wiesen mehr Fettvakuolen pro Zelle als nicht markierten Zellen auf, die auch der adipogenen Differenzierung unterzogen wurden. Die beiden Negativkontrollen enthielten geringe Mengen an Fettvakuolen. Aufgrund der niedrigen Probenzahl ist keine statistische Auswertung möglich.

KOSTURA und Kollegen (2004) konnten ebenfalls keinen negativen Einfluss von Feridex<sup>®</sup> (BERLEX LABORATORIES USA) (Feridex<sup>®</sup> ist ein Handelsname für Endorem<sup>®</sup> in den USA) auf das adipogene Differenzierungspotenzial feststellen. In der Studie von KOSTURA wurden die Stammzellen mit Feridex (25 µg Fe/ml) und einem Transfektionsmittel (PLL: Poli-L-Lysin) markiert. In der vorliegenden Studie wurde kein Transfektionsmittel benutzt und die Markierungskonzentration von Endorem<sup>®</sup> lag deutlich höher bei 28,35 µl/ml (SPIO = 448 µg/ml und Fe = 319,2 µg/ml). Die Autoren berichten nicht darüber, dass die Markierung mit Ferridex<sup>®</sup> die adipogene Differenzierung unterstützen könnte.

Andere Arbeitsgruppen (ARBAB et al. 2004; BULTE et al. 2004) kommen zu gleichen Ergebnissen. Zellmarkierung mit Ferridex<sup>®</sup> beeinflusst die Differenzierung in die adipogene Linie nicht. In der Studie von BULTE und Mitarbeitern wurde die Konzentration von 12,5 µg/ml Feridex<sup>®</sup> und PLL als Transfektionsmittel benutzt. Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung, wie in der erwähnten Studien diente eine Oil Red O Färbung. Um die Relevanz der Ergebnisse beurteilen zu können ist die höhere Probenzahl erforderlich.

### 5.5.2 Osteogene Differenzierung

Ähnlich wie bei der adipogenen Differenzierung berichten die gleichen Arbeitsgruppen, dass das osteogene Differenzierungspotenzial durch die Markierung mit Feridex<sup>®</sup> nicht negativ beeinflusst wird (KOSTURA et al. 2004; ARBAB et al. 2004; BULTE et al. 2004). KOSTURA et al. (2004) beschreibt zum qualitativen Nachweis der Osteogenese auch die von Kossa Färbung, sowie Färbung mit alkalischer Phosphatase und Immunfärbung der Kollagen I Fasern. Die Ablagerung von Kalzium wird mittels einer kolorimetrischen Untersuchung quantifiziert.

In der vorliegenden Studie wird nur die von Kossa Färbung zum Nachweis der Osteogenese durchgeführt. In der von Kossa Färbung wird das mineralisierte Gewebe schwarz angefärbt. Bei der Untersuchung von Zellen sowohl mit als auch ohne Endorem<sup>®</sup> konnten schwarze Präzipitate in der Extrazellulärmatrix und eine schwarze Färbung der Zellen selbst festgestellt werden. Diese schwarzen Präzipitate deuten auf eine Entstehung von Knochenbälkchen hin. Die Beurteilung ist erschwert, da die Stammzellen an sich auch schwarz gefärbt sind. Die schwarze Färbung der Zellen selbst kommt wahrscheinlich durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  in das Differenzierungsmedium zu.

In der Kontrolluntersuchung wurden keine Hinweise auf Mineralisation der Extrazellulärmatrix und von den Zellen selbst festgestellt. Die Kontrolluntersuchung wurde nur mit Standardmedium durchgeführt. Es ist bekannt, dass das Standardmedium auch mit Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zur keinen Differenzierung führt (ARNHOLD persönliche Mitteilung).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen als auch die nicht markierten Zellen eine Mineralisation vom extrazellulären Matrix zeigen.

### 5.5.3 Chondrogene Differenzierung

In der Literatur wird beschrieben, dass Ferridex<sup>®</sup> einen negativen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung ausübt. KOSTURA et al. (2004) berichtet, dass die wie oben mit PLL-Feridex<sup>®</sup> markierten Zellen keine Anzeichen der chondrogenen Differenzierung zeigen. Es wurde ausgeschlossen, dass die Hemmung der Chondrogenese durch die Transfektionsmittel (PLL) zustande kommt. Weiterhin scheint die Hemmung dosisabhängig zu sein, weil eine Reduktion der Feridex<sup>®</sup>-PLL Konzentration zu einer unvollständigen chondrogenen Differenzierung führt. Es wird vermutet, dass Feridex<sup>®</sup> aktiv die notwendige intrazelluläre Informationsübertragung in Chondrogeneseprozessen hemmt. Zum Nachweis der Chondrogenese wird Färbung mit Safranin O (zum Nachweis der Proteoglykane) und Immunfärbung mit Antikörper C4F6 gegen Kollagen Typ II Fasern verwendet. BULTE und Kollegen (2004) kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Die Stammzellmarkierung mit Feridex-PLL Komplex (12,5  $\mu\text{g/ml}$  Fe) führt zu einer Inhibition der Chondrogenese und eine Konzentrationsreduktion um 50 % zu einer eingeschränkten Knorpelbildung.

In der vorliegenden Studie wird die chondrogene Differenzierung ebenfalls negativ durch die Endorem<sup>®</sup>-Markierung beeinflusst. In dieser Studie wurde eine deutlich höhere

Markierungskonzentration von 319,2 µg/ml Fe als in oben genannten Studien verwendet.

Außerdem wurde kein Transfektionsmittel benutzt.

Mittels Alcian Blau Färbung konnte eine hochgradige Knorpelneubildung in den Präparaten mit Stammzellen und Differenzierungsmedium nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Proben mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen einen gering- bis mittelgradigen Anteil der blau gefärbten sauren Mucopolisaccharide im Interstitium. Die chondrogene Differenzierung bei Hund 131/11 hat in geringgradigem Ausmaß stattgefunden. Bei den Stammzellen von Hund 133/12 wurde eine mittelgradige Knorpelbildung nachgewiesen. Jedoch deutlich weniger als bei Stammzellen, die nicht markiert wurden. Die Negativkontrollproben zeigen zum Teil eine blaue Anfärbung des Interstitiums. Das spricht für eine spontane Differenzierung der nicht markierten Zellen, die im Standardmedium inkubiert wurden. BOSNAKOWSKI et al. 2004 berichten ebenfalls von einer spontanen Chondrogenese von bovinen mesenchymalen Stammzellen, die im Standardmedium ohne Zugabe von zusätzlichen Wachstumsfaktoren wie TGF-β oder Fischkollagen inkubiert wurden. Zu einem anderen Ergebnis kommen ARBAB und Mitarbeiter (2004). Sie zeigen, dass eine Feridex-Protamin Markierung (25 µg/ml Fe) von Stammzellen keinen negativen Einfluss auf die Knorpelneubildung aufweist. Eine Alcian Blau Färbung sowie Färbung für Kollagen X zeigt, dass markierte und nicht markierte Zellen eine gleiche Knorpelneubildung zeigen. Zusätzlich stellt ARBAB folgende Hypothese bezüglich der Befunde obengenannter Arbeitsgruppen auf. Der negative Einfluss auf die Chondrogenese ist nicht durch die SPIO, die sich in den Zellen befinden, sondern durch die Markierungstechnik selbst bedingt. Hier wird vermutet, dass die extrazellulären Fe-Protamin-Komplexe, die sich nach dem nicht ausreichenden Waschen im Differenzierungsmedium befinden, könnten die chondrogene Differenzierung hemmen.

## **5.6 Untersuchung des Einflusses von Endorem<sup>®</sup>-Markierung auf Überlebensfähigkeit der Zellen mittels MTT-Test**

Es gibt zahlreiche Methoden, um Nebenwirkungen von Markierungssubstanzen auf die Überlebensfähigkeit der markierten Zellen zu untersuchen. Dazu zählt z. B. die Trypan Blau Färbung. Aufgrund dessen, dass nur tote oder Zellen in Spätstadium der Apoptose detektiert werden können und die Zählung der Zellproben unter dem Mikroskop erfolgen muss, schlägt BERNSEN und Mitarbeiter (2009) andere Tests zur Untersuchung des Einflusses von

Markierungssubstanzen vor, wie z. B. MTT- ((3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium-Bromid), XTT-(2, 3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((Phenylamino) carbonyl)-2H- tetrazolium Hydroxid) oder den WST-1 (*water soluble terazolium*) Test. Da der MTT Test im Gegensatz zu XTT- und WST-1 Test sich zur Untersuchung aller Zelltypen eignet, wird dieser am meisten empfohlen. Zusätzlich ist der Test sehr sensitiv und es reichen nur ein paar Zellen um die Untersuchung durchzuführen. Der Nachteil ist, dass unter unterschiedlichen Bedingungen des Metabolismus der Mitochondrien variieren kann.

Beim MTT-Test wird eine Reduktion des Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazoliumbromid) in Formazan genutzt. In funktionierenden Mitochondrien wird MTT zu einem Formazan reduziert. Es entstehen Formazankristalle, die zuerst gelöst werden müssen. Danach kann eine spektrophotometrische Untersuchung des lilafarbenen Formazan erfolgen. Die Formazanmenge korreliert direkt mit Anzahl der lebenden Zellen. Es werden in diesem Test lebende Zellen anhand der metabolischen Aktivität untersucht. Die Messung der Absorption sollte immer mit einer nicht markierten Kontrollgruppe verglichen werden (BERNSEN et al. 2009).

Der MTT-Test kann auch zur Untersuchung der Zellproliferation genutzt werden. Dafür müssen Messungen über einen bestimmten Zeitraum erfolgen. Anhand dieser kann man eine Wachstumskurve anfertigen.

In der vorliegenden Studie konnte mithilfe eines MTT-Tests kein negativer Einfluss auf die Zellüberlebensfähigkeit und Proliferation nach 24 und 48 Stunden nach der Endorem<sup>®</sup>-Markierung (Konzentration von SPIO = 448 µg/ml und Fe = 319,2 µg/ml) festgestellt werden. SOENEN und Mitarbeiter (2011) zeigen, dass die Zellverdopplungszeit von der Endorem<sup>®</sup>-Konzentration abhängig ist. Bei einer Markierungskonzentration von 400 µg/ml Fe ist die Zellverdopplungszeit nach 1, 3 und 6 Tagen mit der Kontrollgruppe vergleichbar und liegt bei 21 Stunden. Bei einer Endorem<sup>®</sup>-Konzentration von 600 µg/ml Fe ist die Zellverdopplungszeit ca. 1,75 Stunden länger, wobei sie nach 3 Tagen signifikant ( $p < 0,01$ ) ca. 6 Stunden länger ist. Nach 6 Tagen verkürzt sich die Verdopplungszeit und ist ca. eine Stunde länger als bei der Kontrollgruppe und bei den Zellen die mit einer Endorem-Konzentration von 400 µg/ml Eisen markiert wurden.

ARBAB und Kollegen (2004) benutzen in ihrer Studie den MTT-Test zur Evaluation der Toxizität nach Endorem<sup>®</sup>-Protaminsulfatmarkierung der humanen Stammzellen, Lymphoblasten und Splenozyten der Maus. Es konnte mittels des MTT Tests kein negativer



Einfluss der Protamine selbst (Konzentration bis zu 50 µg/ml über 24 - 72 Stunden) oder der Protamin-Fe Komplexe (Fe 100 µg/ml und Protaminsulfat: 3 - 8 µg/ml, Inkubation über die Nacht) in den ersten 72 Stunden auf die untersuchten Zellen festgestellt werden. Zusätzlich hat eine Trypan Blau Färbung keinen signifikanten Anstieg toter Zellen im Vergleich mit der Kontrolle gezeigt.

FRANK und Mitarbeiter (2003) zeigen mit Hilfe des MTT-Tests, dass die hMSC, die nur mit Feridex<sup>®</sup> (20 µg/ml) oder Feridex<sup>®</sup> und 3 verschiedenen Transfektionsreagentien markiert wurden, weisen keine signifikante Unterschiede bezüglich der Überlebensfähigkeit im Vergleich mit der Kontrollgruppe über die Zeitraum von 9 Tagen auf. Zusätzlich wurde eine Apoptoserate für Feridex<sup>®</sup>-PLL-markierten Zellen und nicht markierten Zellen bestimmt. Hier konnte ebenfalls kein Unterschied nachvollzogen werden. Die Ergebnisse der oben genannten Studie zeigen, dass die Markierungskonzentration von Fe = 319,2 µg/ml keine negative Wirkung auf die Proliferation und Überlebensfähigkeit der Zellen hat.

### 5.6.1 MRT-Untersuchung

Die Ergebnisse der MRT-Studie zeigen, dass das Signalverhalten der untersuchten Proben sich über die Zeit von 3 Wochen statistisch signifikant ändert ( $p = 0,003$ ). Nimmt man an, dass die Anzahl der markierten Zellen über den Zeitraum von 3 Wochen in der MACS-Untersuchung signifikant sinkt ( $p = 0,0007$ ), sollte sich das Signalverhalten dementsprechend ändern. Da sich das Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> in beiden durchgeführten Sequenzen (T2 TSE und T2 FFE) hypointens darstellt, sollten die Proben im Laufe der Zeit weniger hypointens zum umliegenden Agarosegel sein. Das heißt, dass die relativen Signalintensitäten über die Zeit ansteigen sollten. Wenn man davon ausgeht, sollte der Wert nach der ersten Woche niedriger als nach der 2. Woche sein. Der Wert zum Zeitpunkt 3 Wochen sollte am höchsten sein (am wenigstens hypointens = die Messwerte sollten ansteigen).

Das Signalverhalten der Probe von Hd 134/12 entspricht dieser Hypothese für beide Sequenzen. Bei der Probe von Hd 133/12 konnte dies nur in T2 FFE Sequenz gezeigt werden. In der zweiten Woche können höhere Werte als in der dritten Woche (weniger hypointens) für T2 TSE bei Proben Nr. Hd 127/10, Hd 128/10, Hd 130/11, Hd 131/11, Hd 132/11 und 133/11 festgestellt werden. In der T2 FFE ist diese Tendenz ebenfalls zu beobachten. In der 2. Woche steigen die Werte für die Proben Hd 127/10, 128/10, 130/11, 131/10, 132/10 an.

In T2 gewichteten Sequenzen kann man bei manchen Proben sehen, dass es durch Lufteinschlüsse, die am wahrscheinlichsten bei der Vorbereitung der Agaroseplatte entstanden sind, möglicherweise zu einer Verfälschung der Meßwerte gekommen ist. In der T2 Sequenz stellt sich Luft ebenfalls hypointens dar, da Luft zu den negativen Kontrastmitteln gehört (WESTBROOK, KAUTH ROTH, TALBOT 2011). KÜSTERMANN und Mitarbeiter berichten in ihrer Studie mit Agarphantomen ebenfalls über eine Artefaktbildung von kleinen Luftblässchen, die ein hypointenses Signal hervorrufen. Auf dem Agarosegel vom Hd 130/11, das ohne eine weitere Probe im selben Agarosegel untersucht wurde, ist es zu sehen, dass die Negativprobe in der Mitte, die nur das Agarosegel enthält, auch hypointens ist und nicht isointens, wie das zu erwarten wäre. In diesem Fall ist anzunehmen, dass sich zwischen den Agaroseschichten Luft befindet. Diese Hypointensität ist in der T2 FFE nicht nachzuvollziehen. Diese Beobachtung ist ungewöhnlich, da normalerweise der Einfluss der Inhomogenitäten in der T2 FFE Sequenz grösser als in T2 TSE ist. Das kann man durch geringgradige Unterschiede in der Sequenzerstellung wie z. B. geringe Schichtunterschiede (für T2 FFE 1,5 mm; für T2 TSE 1,6mm).

Eine andere Hypothese, die dieses MRT Signalverhalten, erklären kann das nicht mit MACS-Untersuchung korreliert, ist die Tatsache, dass nicht die einzelne Zelle in der durchgeführten MRT-Untersuchung dargestellt werden kann. Es wird lediglich die Störung des Magnetfeldes dargestellt. Es ist nicht bekannt, ab wie vielen Eisenpartikeln in den Zellen diese detektiert werden und als hypointens dargestellt werden. Eisenpartikel und deren ferromagnetische Eigenschaften verursachen eine stärkere räumliche Störung der Feldhomogenität als die Größe der Partikel. Eine räumliche Verteilung der Partikel in der Zelle kann eine Rolle spielen. Wenn die Eisenpartikel in einer Zelle dicht an einander liegen oder einen Klumpen bilden, kann die Kontrastauslöschung deutlich höher sein, als wenn die Eisenpartikel diffus in der Zelle verteilt sind (KÜSTERMANN et al. 2008). In der TEM-Untersuchung sieht man, dass die räumliche Verteilung vom Zeitpunkt der Untersuchung abhängig ist. Die Eisenpartikel werden nicht diffus über die gesamte Zelle verteilt, sondern bilden Konglomerate, die entweder frei im Zytoplasma oder in Endosomen/Lysosomen liegen. In der MACS-Untersuchung sehen wir lediglich, dass die Anzahl der markierten Zellen sinkt. In dieser Untersuchung ist aber nicht berücksichtigt, wie viele Eisenpartikel diese Zellen enthalten. Da in der Kontrolluntersuchung für die MACS-Sortierung, in der Berliner Blau Färbung, keine Zellen sichtbar sind, die Eisenpartikel enthalten, ist davon auszugehen, dass diese Zellen auch sehr geringe Mengen an Kontrastmittel enthalten.

Bei Berliner Blau Färbung konnte nicht gezeigt werden, dass die Anzahl der Stammzellen mit  $\geq 10$  Eisenpartikeln sinkt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind statistisch nicht signifikant ( $p = 0,204$ ), so dass keine Korrelationsbestimmung mit der Berliner Blau- und MRT-Untersuchung möglich war. Die Ergebnisse der Berliner Blau Färbung können dadurch erklärt werden, dass bei der Zellteilung nicht genau die Hälfte der enthaltenen Eisenpartikeln an die Tochterzellen weitergegeben wird, sondern es eher zufällig ist, wie die Eisenpartikel sich verteilen.

Eine der Hauptfragestellungen ist, wie lange die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen im 1 Tesla MR-Tomographen in der T2 FFE und T2 TSE darstellbar sind. Es wurden mehrere Trackingstudien mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen an Labortieren und auch mit Agarphantomen durchgeführt. Diese Untersuchungen fanden im Rahmen von präklinischen Studien statt. Diese Studien verwendeten Magnetresonanztomographen mit deutlich höherer Feldstärke. Im klinischen Alltag in der Tiermedizin ist jedoch der Einsatz solcher Geräte zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

In der vorliegenden Studie konnten die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen 3 Wochen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung mittels 1 Tesla Magnetresonanztomographen dargestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass die markierten Stammzellen in vivo mindestens genauso lange von einem 1 Tesla Magnetresonanztomographen detektiert werden. In vitro teilen sich die Stammzellen intensiver als in vivo.

NORMAN und Mitarbeiter (1992) konnten in einer Studie mit einem 0,14 Tesla MRT-Gerät implantierte Zellen nach 3 Wochen vom Wirtsgewebe unterscheiden. Sie haben als erste den Einsatz der MRT zur Darstellung von mit superparamagnetischen Eisenpartikeln markierten Zelltransplantaten bei Ratten beschrieben. Es wurde aber ein anderes Kontrastmittel in der Studie verwendet. Hier wurden Eisenpartikel mit einem Antikörper an die Zelloberfläche gebunden. URDZIKOVA und Kollegen (2006) stellen mit Endorem<sup>®</sup>-markierte Stammzellen bei Ratten mit einer intraspinalen Läsion nach einer intravenösen MSC-Injektion mittels eines 4,7 Tesla Gerätes und einer 3D Gradienten Echo Sequenz dar. SYKOVA und JENDELOVA (2006) beschreiben in ihrer Studie, dass die mit Endorem<sup>®</sup>- markierten Stammzellen (embryonale und mesenchymale) bei Ratten mit kortikalen und spinalen Läsionen nach einer intravenösen und intracerebellaren Gabe in die Richtung der Läsion wandern. Diese Zellen kann man mindestens 30 Tage lang als hypointenses Signal mittels einer T2 gewichteten Sequenz in 4,7 Tesla Bruker Spektrometer darstellen.

Im Gegensatz zu diesen in vivo präklinischen Studien untersuchen KÜSTERMANN und Mitarbeiter (2008) die Effizienz und Ausschleusung von mehreren Kontrastmitteln unter anderem von Endorem<sup>®</sup> in Agarphantomen. Die Markierungseffizienz und das Abgeben des Kontrastmittels durch die Zellen wird unter Einsatz eines 7,0 Tesla BRUKER Biospec in Agarphantomen überprüft.

NOHROUDI und Kollegen (2010) berichten über ein sehr hohes MRT-Detektionspotenzial und einer anderen Markierungsmethode: den mit MPIO markierten MSCs bei Ratten mit Gehirntumoren. Mittels MRT-Untersuchung (4,7 Tesla Bruker Biospec) ist die Migration der markierten Stammzellen in die Richtung der neoplastischen Veränderung nach der Implantation in die kontralaterale Hemisphäre nach 7 Tagen sichtbar. Auch Zellen, die nur geringe Mengen an Eisenpartikel enthalten, sind in der MRT-Untersuchung darstellbar (NOHROUDI et al. 2010).

Im Gegensatz dazu beschreiben KEDZIOREK und KRAITCHMANN (2010) relativ kurze Darstellungsmöglichkeit von mit Ferucarbotran (Resovist<sup>®</sup> BAYER SCHERING PHARMA AG) markierten Stammzellen bei 2 Hunden nach einer Injektion in Arteria femoralis in einer 3 Tesla MRT Untersuchung. Einen Tag nach der Applikation wird von einem hypointensem Signal im Bereich der Nierenrinde berichtet. Die Hypointensität ist über folgende 8 Tage zu sehen.

Es sollte in Rahmen dieser Studie festgestellt werden, welche von beiden durchgeführten Sequenzen (T2 TSE und T2 FFE) sich besser zur Darstellung der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninen MSC's im 1 Tesla MR-Tomographen eignet. Für Woche 1, 2 und 3 ist eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Sequenzen zu beobachten (Woche 1:  $p = 0,037$ ;  $r = 0,784$ ; Woche 2:  $p = 0,006$ ;  $r = 0,9$ ; Woche 3:  $p = 0,006$ ;  $r = 0,896$ ). Ebenfalls über die gesamte Zeit betrachtet korrelieren beide Sequenzen miteinander. Diese Korrelation ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,879$ ). Keine von beiden Sequenzen korreliert mit der MACS-Untersuchung. In der T2 TSE Sequenz wurden mehr Artefakte beobachtet, die am wahrscheinlichsten durch die Lufteinschlüsse entstanden sind. In vitro wie bei anderen Studien bleibt die T2 FFE Sequenz ein Mittel der Wahl zur Detektion der mit Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninen Stammzellen. KÜSTERMANN und Kollegen (2008) kommen zum Ergebnis, dass die T2 FFE Sequenz sich am besten zur Darstellung der mit Eisenpartikeln markierten Zellen in Agarphantomen eignet. ITTRISCH und Kollegen (2005) demonstrieren Einsatz von T2 FFE Sequenz zur Darstellung und Quantifizierung von mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln markierten humanen Stammzellen in der 3 Tesla

MRT-Untersuchung in vitro. Die T2 FFE Sequenz findet auch eine Anwendung in klinischen Studien in der Humanmedizin, wie bei Transplantation von mit Ferucarbotran markierten Pankreasinseln in der Studie von TOSO und Mitarbeitern (2008). Die transplantierten Zellen aus Pankreasinsel waren in der Leber als hypointense Areale in der T2 FFE Sequenz darstellbar. In der Studie von NOHROUDI und Mitarbeitern (2010) werden die MPIO markierten Stammzellen aus dem Knochenmark mit Hilfe von T2 FFE Sequenz in 4,6 Tesla MRT-Untersuchung in vivo bei Gliommodellratten dargestellt. Mit Geräten mit höherer Teslastärke ist es möglich sogar einzelne Zellen zu detektieren (KÜSTERMANN et al. 2008). Bei Untersuchungen in vivo kann sich die Untersuchung mit T2 FFE eher problematisch darstellen. Bei Rückenmarks- oder Gehirntraumata, bei denen auch eine Blutung vorhanden ist, kann es schwierig sein, das Signal von markierten Zellen und von Blut wegen des Hämoglobins zu unterscheiden.

## **5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, ob das MRT-Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> sich zur Markierung der kaninen Stammzellen eignet. Diese Studie soll ein Ausgangspunkt für weitere klinische Forschungen auf dem Gebiet der Kleintiermedizin sein. Im Rahmen dieser Studie wurde verifiziert, dass die kaninen Stammzellen spontan Endorem<sup>®</sup> aufnehmen können. Es wurde weiterhin eine Markierungskonzentration bestimmt, die die Zellteilung und das Zytoskelett der kaninen Stammzellen nicht beeinflusst. Die Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninen Stammzellen können sich in die adipogene und osteogene Richtung differenzieren. Die chondrogene Differenzierung scheint negativ beeinflusst zu sein, was mit den weiteren Studien untersucht werden muss. Die kaninen Stammzellen geben das Kontrastmittel im zeitlichen Verlauf an ihre Tochterzellen ab. Jedoch sind diese Zellen 3 Wochen nach der Markierung in einem 1 Tesla MR-Tomographen darstellbar, was eine große Bedeutung in einem klinischen Einsatz hat. Die Stärke der meisten Tomographen im klinischen Einsatz in der Tiermedizin beträgt 0,3 - 1 Tesla (sehr selten 3 Tesla). Die T2 FFE Sequenz eignet sich besser als die T2 TSE Sequenz zur Darstellung der markierten Zellen. Die T2 FFE ist eine Gradientenechosequenz, die besonders empfindlich für Feldinhomogenitäten ist. Dadurch können theoretisch minimale Mengen an Eisenpartikel detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die T2 TSE weniger anfällig für Feldinhomogenitäten (WESTBROOK 2011).

In der Tiermedizin gibt es Indikationen für den Einsatz der Stammzelltherapie vor allem für Erkrankungen, bei denen nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten existieren. Zu nennen wären hier vor allem Erkrankungen aus dem Bereich der Neurologie. In Zukunft sind weitere Studien nötig, um die therapeutische Eigenschaft der Stammzellen bei verschiedenen Erkrankungen zu untersuchen. Eine Markierung der Stammzellen kann dazu dienen, sie in der MRT-Untersuchung darzustellen.

Eine der Erkrankungen, bei der eine Stammzelltherapie und dadurch die Markierung von grosser Bedeutung sein könnten, ist z. B. die degenerative Myelopathie der Hunde. Es handelt sich um eine degenerative Rückenmarkserkrankung, die mehrere Hundrassen betrifft. Die Erkrankung fängt mit Symptomen des oberen motorischen Neurons, wie Spastizität und proprizeptiver Ataxie, an. Diese Patienten zeigen eine progressive Paraparese. Mikroskopisch findet man bei betroffenen Hunden eine Demyelinisierung und Axonverlust in lateraler weißer Substanz im Rückenmark. Bislang gibt es keine Therapiemöglichkeiten (AWANO et al. 2008). Bei dieser Erkrankung könnte eine Stammzelltherapie eine Chance darstellen. Die Endorem<sup>®</sup>-Markierung könnte eine Beobachtung in vivo ermöglichen. Die Endorem<sup>®</sup>-markierten Stammzellen könnten entweder direkt in das Rückenmark oder in den subarachnoidalen Raum injiziert werden (OHTA et al. 2004).

Eine andere Erkrankung des ZNS besonders bei Hunden, bei der eine Stammzellimplantation eine Therapiemöglichkeit bietet, ist eine Diskopathie. Bei Hunden nach einem Bandscheibenvorfall, die präoperativ eine Paraplegie ohne Schmerzempfinden zeigen, liegt die Prognose für die Heilung des Rückenmarks nach einer chirurgischen Dekompression bei ca. 64 % und bei einer konservativen Therapie bei 7 % (WHEELER, SHARP 1994). Aufgrund der unsicheren bis schlechten Prognose werden diese Patienten häufig euthanasiert. Eine erfolgreiche chirurgische Dekompression bedeutet nicht, dass diese Patienten vollständig geheilt werden können, da es in manchen Fällen zu einer irreversiblen Nervenschädigung gekommen ist. Bei solchen Patienten könnte eine Stammzelltherapie zum Einsatz kommen. Die Stammzellen können intraoperativ bei der Hemilaminektomie entnommenem Fettgewebe isoliert, kultiviert und danach markiert werden. Stammzellen könnte man nach der Markierung wie bei der degenerativen Myelopathie applizieren. Hier ist der Nachteil, dass die Stammzellen erst entnommen und im Labor vermehrt werden müssen, bevor sie appliziert werden können. Im Durchschnitt würde eine Kultivierung einige Tage in Anspruch nehmen. Weitere Erkrankungen, bei denen man das Potenzial der Stammzellen einsetzen könnte sind immunmedierte Meningitiden beim Hund (steroid responsive Meningitis Arteritis (SRMA)

und granulomatöse Meningoenzephalitis (GME) oder nekrotisierende Meningoenzephalitis (NME)). NME gehört zu den entzündlichen ZNS-Erkrankungen die, bei Zwergrassen besonders beim Mops (*Pug Dog Encephalitis*) auftreten. Die entzündlichen Veränderungen im Sinne von lymphozytären, plasmazytären und histiozytären Infiltraten sowie eine Parenchymnekrose werden vor allem in der Großhirnrinde gefunden. Es wird vermutet, dass bei der Pathogenese eine Dysregulation des Immunsystems in ZNS eine große Rolle spielt (SUZUKI et al. 2003).

Die GME kommt vor allem bei kleinen Hunderassen vor. Das histopathologische Bild zeigt Veränderungen vor allem in der weißen Substanz in Hirnstamm, Cerebrum und Cerebellum. Als Ursache wird hier auch eine Dysfunktion der Immunsystem diskutiert (SUZUKI et al. 2003). Bei beiden Erkrankungen sind Therapiemöglichkeiten eingeschränkt. Die Überlebensrate liegt bei der GME bei 1 bis 1,215 Tage (MUNANA & LUTTGEN 1998). Da Stammzellen in vivo viele bioaktive Substanzen produzieren, die eine immunmodulierende und immunsuppressive Wirkung besitzen (SYKOVA & JENDELOVA 2007), könnte eine Stammzelltherapie eine große Behandlungschance darstellen. Besonders bei Erkrankungen wie nekrotisierende Meningoenzephalitis und granulomatöse Meningoenzephalitis die trotz einer konventionellen Therapie eine schlechte Prognose haben.

Bei der steroid responsiven Meningitis Arteritis wird ebenfalls vermutet, dass eine Fehlregulation des Immunsystems für die Erkrankung verantwortlich ist. Für diese Hypothese spricht der Anstieg der IgA-Konzentration in Liquor cerebrospinalis und Serum (TIPOLD et al. 1994) und die vermehrte Aktivierung von Th-2 Zellen (SCHWARTZ et al. 2008). Des Weiteren sprechen die betroffenen Patienten auf eine immunsuppressive Kortisontherapie an, was ein zusätzlicher Hinweis auf eine immunmedierte Ätiologie ist (CIZINAUSKAS et al. 2000; VOSS 2011). Die Ursache für die Dysregulation des Immunsystems bei betroffenen Hunden konnte nicht erkannt werden (TIPOLD et al. 1994; VOSS 2011). Die Kortisontherapie (über 6 Monate (TIPOLD 2000)) ist mit vielen Nebenwirkungen wie z. B. Polyphagie, Polydipsie, Muskelatrophie, Stammfettsucht verbunden (NELSON, COUTO 2010). Eine Stammzelltherapie könnte in diesem Fall diese Nebenwirkungen ausschließen.

Bei Meningitiden könnte eine Stammzellgabe in den Liquor cerebrospinalis erfolgen, was OHTA und Kollegen (2004) vorgeschlagen haben.

In der Humanmedizin könnte die immunregulierende und immunsuppressive Eigenschaft der Stammzellen ebenfalls bei immunmedierten Erkrankungen des ZNS-Systems wie z. B. Multiple Sklerose (MS) genutzt werden. Es wird vermutet, dass sie durch eine Dysfunktion

des Komplementsystems zustande kommt. Die immunmodulierenden und immunsuppressiven Eigenschaften der MSCs stellen eine Hoffnung in der Therapie von immunmedierten Erkrankungen wie MS bei Menschen dar (UCCELLI et al. 2008; MANCARDI et al 2008).

Es sind weitere Studien nötig, um diese Therapiehypothesen bei den oben genannten Erkrankungen in der Kleintiermedizin zu verifizieren. Bei diesen Erkrankungen müssen verschiedene Anhaltspunkte der Stammzelltherapie untersucht werden. Bei Kaninen Meningitiden müssen die immunsuppressive Eigenschaften überprüft werden. Bei Rückenmarkstraumata z. B. infolge einer Diskopathie geht es um eine Eigenschaft der Stammzellen, das Gewebe bei den Reparatur- und Regenerationsprozessen zu unterstützen (CAPLAN & DENNIS 2006) oder sogar eine Fähigkeit sich in einen gewünschten Phänotyp zu differenzieren. Ebenfalls muss in der Zukunft ein adäquater Applikationsweg und Menge der Stammzellen für jede Erkrankung bestimmt werden. Bis jetzt wurden nur Vorteile der Stammzelltherapie dargestellt. Die Stammzelltherapie muss noch genau auf Nebenwirkungen untersucht werden, bevor sie routinemäßig zum Einsatz kommt.



## 6 Zusammenfassung

Untersuchung zum Wachstums- und Signalverhalten im MRT von kaninen mesenchymalen Stammzellen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung

In der vorliegenden Studie wurde in der Klinik für Kleintiere - Chirurgie, der Justus Liebig Universität Gießen eine Untersuchung zum Wachstums- und Signalverhalten in der Magnetresonanztomographie von mit Endorem<sup>®</sup>-markierten kaninen Stammzellen aus dem Fettgewebe durchgeführt. Endorem<sup>®</sup> (GUERBET) ist ein MRT-Kontrastmittel, das zum Nachweis von Lebertumoren mittels MRT entwickelt wurde. Endorem<sup>®</sup> enthält Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO). In der MRT-Untersuchung bilden sich Störungen des Magnetfelds um jedes Partikel und führen zu einem Signalabfall in den Geweben, die das Kontrastmittel enthalten (GUERBET).

Zunächst wurde eine optimale Endorem<sup>®</sup>-Konzentration von 319,2 µg/ml Fe (448 µg/ml SPIO) bestimmt, was 28,35 µl/ml Endorem<sup>®</sup> entspricht. 7 Proben mit kaninen Stammzellen aus Fettgewebe wurden mit dieser Endorem<sup>®</sup>-Menge über 24 Stunden inkubiert. Die Markierungseffizienz wurde mit Hilfe der Berliner Blau Färbung und MACS-Untersuchung überprüft. Mittels Berliner Blau Färbung konnte gezeigt werden, dass die kaninen Stammzellen spontan Eisenpartikel aus dem Inkubationsmedium aufnehmen. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnte bewiesen werden, dass die Eisenpartikel per Endozytose in die Zelle transportiert werden. Die Eisenpartikel sind in den mit Berliner Blau gefärbten Präparaten 3 Wochen nach der Markierung in den Zellen vorhanden. Die Eisenpartikel werden nicht gleichmäßig an die Tochterzellen übertragen. Es war nicht möglich Referenzwerte für die Anzahl der markierten Zellen, die mehr als 10 Eisenpartikel enthalten, zum Zeitpunkt 3, 7, 14 und 21 Tage zu bestimmen.

Die Trennung der markierten von nicht markierten Zellen mittels MACS-Sortierung stellt eine zuverlässige Methode dar. Der Anteil der markierten kaninen Stammzellen sinkt im zeitlichen Verlauf. Diese Abnahme der markierten Zellen ist statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0007$ ). Eine Referenzwertbestimmung für die Anzahl der markierten Zellen für den Zeitpunkt 1, 2 und 3 Wochen war nicht möglich.

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, die den Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf die Proliferation, das Zytoskelett, die Multipotenzfähigkeit und die Verteilung der Endorem<sup>®</sup>-

Partikeln in der Zelle untersuchen. Mittels Phalloidin Färbung konnte festgestellt werden, dass kein negativer Einfluss von Endorem<sup>®</sup> auf das Zytoskelett besteht. Die Multipotenz der Zellen wurde anhand der Differenzierung in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung beurteilt. Die adipogene und osteogene Differenzierung bleibt ungestört. Die Knorpelbildung scheint jedoch von Endorem<sup>®</sup> negativ beeinflusst zu werden. Die Proliferationsfähigkeit der kaninen Stammzellen nach Endorem<sup>®</sup>-Markierung bleibt im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Um die Endorem<sup>®</sup>-Verteilung in der Zelle zu untersuchen wurde eine transmissionselektronenmikroskopische Analyse durchgeführt. Anhand der Untersuchung konnte beobachtet werden, dass die Endorem<sup>®</sup>-Partikel per Endozytose aufgenommen werden. Die Eisenpartikel bilden Konglomerate und befinden sich entweder frei im Zytoplasma oder sind in die Lysosomen integriert. Eine und zwei Wochen nach Markierung sind überwiegend freie Konglomerate im Zytoplasma sichtbar. Nach 3 Wochen sind die Endorem<sup>®</sup>-Partikel in Lysosomen eingebaut. Die Verteilung von Endorem<sup>®</sup> in der Zelle kann eine Rolle für Kontrastauslöschung in der MRT-Untersuchung spielen.

Im Rahmen dieser Studie sollte bestimmt werden, wie lange die mit Endorem<sup>®</sup>-markierten Zellen in der MRT-Untersuchung darstellbar sind. Es wurde eine MRT-Untersuchung von den markierten Stammzellen in Agarphantomen zu drei Zeitpunkten durchgeführt (1, 2 und 3 Wochen nach der Markierung). T2 TSE und T2 FFE Sequenzen kamen zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass die im Laufe der Zeit die Stärke der durch Endorem<sup>®</sup> bedingten Hypointensität in beiden Sequenzen abnimmt. Die Signalintensität für die Sequenzen T2 TSE und T2 FFE ändert sich im zeitlichen Verlauf über 3 Wochen. Diese Veränderungen sind statistisch hoch signifikant ( $p = 0,003$ ).

Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und T2 TSE Untersuchung in der Woche 1, 2 und 3 (für Woche 1:  $p = 0,945$ ;  $r = -0,032$ ; für Woche 2:  $p = 0,242$ ;  $r = -0,510$ ; für Woche 3:  $p = 0,288$ ;  $r = -0,469$ ) und T2 FFE (für Woche 1:  $p = 0,722$ ;  $r = -0,166$ ; für Woche 2:  $p = 0,619$ ;  $r = -0,231$ ; für Woche 3:  $p = 0,077$ ;  $r = -0,705$ ) festgestellt werden.

Alle markierten Proben sind 3 Wochen nach der Markierung noch mittels eines 1 Tesla Magnetresonanztomographen in einer T2 TSE und T2 FFE Sequenz darstellbar.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Kontrastmittel Endorem<sup>®</sup> die Voraussetzungen für den klinischen Einsatz für Tracking Studien in vivo bestens erfüllt.

## 7 Summary

Study of adipose-derived canine stem cells` behaviour after Endorem<sup>®</sup> labelling for MRI-imaging.

The aim of this study performed at the Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animals–Surgery, Justus–Liebig–University, Giessen was to investigate the growth behaviour and MRI-Signal properties of adipose-derived canine stem cells after labelling with the MRI contrast agent Endorem<sup>®</sup> (GUERBET). Endorem<sup>®</sup> was established to detect liver tumors in humans. This contrast agent contains dextran-coated iron oxide superparamagnetic nanoparticles (SPIO). SPIO affect the T2 relaxation inducing strong field inhomogeneity leading to signal´s decrease in the tissues containing Endorem<sup>®</sup>.

Initially, the optimal labelling concentration was determined to be of 319,2 µg/ml Fe (448 µg/ml SPIO), that corresponds to 28,35 µl/ml of Endorem<sup>®</sup>. Seven samples with canine adipose-derived stem cells were incubated with this Endorem<sup>®</sup> concentration for 24 hours. The efficiency of the labelling was investigated with the aid of the Prussian blue staining and the MACS-Method. The spontaneous uptake of SPIOs from the medium containing Endorem<sup>®</sup> was confirmed with Prussian blue staining. Transmission electron microscopy confirmed the fact that the SPIOs are being incorporated into the canine stem cells by endocytosis. Iron particles were detectable within the cells three weeks after labelling with Endorem<sup>®</sup>. The iron particles were not equally distributed to the daughter cells during the cell division. It was impossible to set the reference value for the stem cells, that contained more than 10 iron particles within the cell at time intervals three, seven, fourteen and twenty one days. Separation of the labelled cells from the cells that do not contain SPIOs with the MACS is a reliable method. It was demonstrated that percentage of the labelled canine stem cells decreases within three weeks. This decrease of the labelled cells is significant (p= 0,0007). It was not possible to determine the reference value of the percentage of the labelled cells for the time intervals of one, two and three weeks

In addition, the influence of the Endorem<sup>®</sup> labelling on the proliferation ability of the stem cells, cytoskeleton and multipotency was assessed. The distribution of the iron particles within the cell was also investigated. Phalloidin staining showed no negative influence of the iron particles on the cytoskeleton. Multipotency was assessed on the basis of the

adipogenesis, chondrogenesis and osteogenesis of the labelled stem cells. Labelled cells underwent osteogenic and adipogenic differentiation. In contrast to that the chondrogenesis of the labelled cells was negatively affected. Endorem<sup>®</sup> labelling seems to partially inhibit the chondrogenic differentiation. The labelling had no adverse effects on the proliferation of the stem cells. To assess the distribution of the iron particles in the single cell transmission electron microscopy was performed. It could be demonstrated that Endorem<sup>®</sup> particles were being incorporated by endocytosis. Iron particles formed clusters free in the cytoplasm or were incorporated in the lysosomes. One and two weeks after labelling the iron clusters were mostly seen free in the cytoplasm. Three weeks after the labelling Endorem<sup>®</sup>-particles were generally detected in the lysosomes.

The further aim of this study was to show duration of Endorem<sup>®</sup> labelling of cells with a 1 Tesla MRI Tomograph. Agarphantoms with the labelled cells were analysed in the T2 TSE and T2 FFE MRI Sequences one, two and three weeks after the Endorem<sup>®</sup> labelling. It was determined in both sequences that the hypointensity caused by Endorem<sup>®</sup> lasted at least for three weeks. The signal intensity changed for both sequences within three week time period. These changes are significant ( $p = 0,003$ ). The statistical correlation between MACS for one, two and three weeks and T2 TSE sequence for one, two and three weeks could not be shown (week one:  $p = 0,945$ ;  $r = -0,032$ ; week 2:  $p = 0,242$ ;  $r = -0,510$ ; week 3:  $p = 0,288$ ;  $r = -0,469$ ) and for 2 FFE (week 1:  $p = 0,722$ ;  $r = -0,166$ ; week 2:  $p = 0,619$ ;  $r = -0,231$ ; week 3:  $p = 0,077$ ;  $r = -0,705$ )

It is possible to detect all of the samples of Endorem<sup>®</sup> labelled stem cells with 1 Tesla MRI in the T2 TSE und T2 FFE sequences 3 weeks after labelling. In this study could be shown that Endorem<sup>®</sup> is a suitable MRI contrast agent for the clinical tracking studies with adipose-derived stem cells.

## 8 Literaturverzeichnis

Abdel-Hamid M.; Hussein M.R.; Ahmad F.A.; Elgezawi E.M. (2005): Enhancement of the repair of meniscal wounds in the red-white zone (middle third) by the injection of bone marrow cells in canine animal model.

In: International Journal of Experimental Pathology, 86: S. 117-123

Akins E.J.; Dubey P. (2008): Noninvasive imaging of cell-mediated therapy for treatment of cancer.

In: Journal of Nuclear Medicine, 49(2): S. 180-195

Al-Khaldi A.; A-Sabti H.; Galipeau J.; Lachapelle K. (2003): Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model.

In: Annals of Thoracic Surgery 75(1): S. 204-209

Arbab A.S.; Yocum G.T.; Kalish H.; Jordan E.K.; Anderson S.A.; Khakoo A.Y.; Read E.J.; Frank J.A. (2004): Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI.

In: Blood, 104: S. 1217-1223

Austin T.; Edwards C.; Cuzzourt J.; Duenzl M.; Lucas P.A.; Black A.C. (2001): Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors.

In: Anatomical Record, 264: S. 51-62

Awano T.; Johnson G.S.; Wade C.M.; Katz M.L.; Johnson G.C.; Taylor J.F.; Perloski M.; Biagi T.; Baranowska I.; Long S.; March P.A.; Olby N.J.; Shelton G.D.; Khan S.; O'Brien; Lindblad - Toh K.; Coates J.R. (2008): Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis.

In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS): February 24, 106 (8)

Barry F.P.; Murphy J.M. (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.

In: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: S. 568-584

Bernsen M.R.; Moelker A.D.; Wielopolski P.A.; van Tiel S.; Krestin G.P. (2010): Labelling of mammalian cells for visualisation by MRI.

In: European Radiology, 20: S. 255-274

Berridge M.V.; Tan A.S.; McCoy K.D.; Wang R. (1996): The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.

In: Biochemica, 4: S. 14-19

Black L.L.; Gaynor J.; Gahring D.; Adams C. (2007): Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial.

In: Veterinary Therapeutics, 8: 4

Black L.L.; Gaynor J.; Adams C.; Dhupa S.; Sams A. (2008): Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of elbow joint in dogs.

In: Veterinary Therapeutics, 9: 3

Bonnemain A. (1996): Superparamagnetic and blood pool agents; in spotlight on clinical MRI.

In: VLC Maffliers, S. 75-88

Brehm M.; Zeus T.; Strauer B.E. (2002): Stem cells - Clinical application and perspective.

In: Herz, 27: S. 611-20

Brown M.A.; Semelke R.C. (2010): MRI: basic principles and applications.

4. Auflage Wiley-Blackwell

Bruder S.P.; Kraus H.K.; Goldberg V.M.; Kadiyala S. (1998): The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects.

In: The Journal of Bone and Joint Surgery 80(7): S. 986-996

Bulte J.W.M.; Kraitchman D.L.; Mackay A.M.; Pittenger M. (2004): Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides,

In: Blood, 104: S. 3410-3413

Bulte J.W.M. (2009): In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies.

In: American Journal of Roentgenology 193(2): S. 314-325

Bunnell B.A.; Flaat M.; Gagliardi C.; Patel B.; Ripoll C. (2008): Adipose-derived stem-cells: isolation, expansion and differentiation.

In: ScienceDirect, Methods 45: S. 115-120

Burk J.; Delling U.; Brehm W. (2011): Einsatz von Stammzellen in der Therapie von Lahmheiten beim Pferd.

In: Pferdespiegel, 14: S. 9-15

Campagnoli C.; Roberts I.A.G.; Kumar S.; Bennett P.R.; Bellantuono I.; Fisk N.M. (2006): Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow.

In: Blood, 98: S. 2396-2402

Caplan A. (1991): Mesenchymal stem cells.

In: Journal of Orthopaedic Research, 9(5): S. 641-650

Caplan A.; Dennis J.E. (2006): Mesenchymal stem cells as trophic mediators.

In: Journal of Cellular Biochemistry, 98: S. 1076-1084

Chaudhari A.J.; Darvas F.; Bading J.R.; Moats R.A.; Conti P.S.; Smith D.J.; Cherry S.R.; Leahy R.M. (2005): Hyperspectral and multispectral bioluminescence optical tomography for small animal imaging.

In: *Physics in Medicine and Biology*, 50: S. 5421-5441

Cizinauskas S.; Jaggy A.; Tipold A. (2000): Long-term treatment of dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis: clinical, laboratory and therapeutic results.

In: *Journal of Small Animal Practice*, 41(7): S. 295-301

Dell`Àgnola C.; Want Z.; Storb R.; Tapscott S.J.; Kuhr C.S.; Hauschka S.D.; Lee R.S.; Sale G.E.; Zellmer E.; Gisburne S.; Bogan J.; Kornegay J.N.; Cooper B.J.; Gooley T.A.; Little M.T.(2004): Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs.

In: *Blood*, 104: S. 4311-4318

De Angelis L.; Berghella L.; Coletta M.; Lattanzi L.; Zanchi M.; Cusella De Angelis M.G.; Ponzetto C.; Cossu G. (1999): Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration.

In: *Journal of Cell Biology*, 147: S. 869-878

De Bari C.; Dell`Accio F.; Tylzanowski P.; Luyten F.P. (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.

In: *Arthritis and Rheumatism*, 44: S. 1928-1942

De Vries I.J.M.; Lesterhuis W.J.; Barentsz J.O.; Verdijk P.; van Krieken J.H.; Boerman C.O.; Oyen W.J.G.; Bonenkamp J.J.; Boezeman J.B.; Adema G.J.; Bulte J.W.M.; Scheenen T.W.M.; Heerschap P.A.; Figdor C.G.(2005): Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy.

In: *Nature Biotechnology*, 23: S. 1407-1413



Ding W.; Bai J.; Zhang J.; Chen Y.; Cao L.; He Y.; Shen L.; Wang F.; Tian J. (2004): In vivo tracking of implanted stem cells using radio-labeled transferrin scintigraphy.

In: Nuclear Medicine and Biology, 31(6): S. 719-725

Djouad F.; Bouffi C.; Ghannam S.; Noel D.; Jorgensen Ch. (2009): Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases.

In: Nature Reviews Rheumatology, 3: S. 392-399

Dominici M.; Blanc K.; Müller I.; Slaper-Cartenbach I.; Marini F.C.; Krause D.S.; Deans R.J.; Keating A.; Prockop P.J.; Horowitz E.M.(2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells The International Society for Cellular Therapy position statement.

In: Cytotherapy, 8(4): S. 315-317

Edelman R.; Hesselink J.R.; Zlatkin M.B. (2006): Clinical Magnetic Resonance Imaging.

In: Elsevier Saunders, 3.Auflage

Engelhardt W.V.; Breves G. (2000): Physiologie der Haustiere.

Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart (2000)

Erb K.; Pfeil I.; Schneider S.; Bader A. (2011): Interventionelle Stammzelltherapie: Anwendungsbeispiel an akuten Rückenmarkstranen mit negativer Tiefensensibilität.

In: 57. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin 2011

Fortier L.A. and Travis A.J. (2011): Stem cells in veterinary medicine.

In: Stem Cell Research and Therapy, 2: 9

Frank J.A.; Miller B.R.; Arbab A.S.; Zywicke H.A.; Jordan E.K.; Lewis B.K.; Bryant L.H.; Bulte J.W.M. (2003): Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents.

In: Radiology, 228: S. 480-487

Freed C.R.; Greene P.E.; Breeze R.E.; Tsai W.Y.; DuMouchel W.; Kao R.; Dillon S.; Winfield H.; Culver S.; Trojanowski J.Q. (2001): Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease.

In: New England Journal of Medicine, 344: S. 710-9

Fridenstein A.J.; Piatetzky-Shapiro I.I.; Petrakova K.V. (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.

In: The Journal of Embryological Experimental Morphology, 16: S. 381-390

Fukumoto T; Sperrling J.W.; Sanyal A.; Fitzsimmons J.S.; Reinholz G.G.; Conover C.A.; O'Driscoll (2003): Combined effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor  $\beta$  1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro.

In: Osteoarthritis and Cartilage, 11 (1): S. 55-64

Gavin P.R.; Kraft S.L.; Wendling L.R. (1989): Canine spontaneous brain Tumors - a large animal model for BNCT.

In: Strahlentherapie und Onkologie, 165(2-3): S. 225-228

Gimble J.M. (2003): Adipose tissue-derived therapeutics.

In: Expert Opinion on Biological Therapy, 3: S. 705-713

Goujon E. (1869): Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os.

In: Journal de L'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de l'Homme et des Animaux 6: S. 399-412

Gronthos S.; Mankani M.; Brahim J.; Robey P. G.; Shi S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC's) in vitro and in vivo.

In: Proceedings of the National Academy of Science USA, 97(25): S. 13625-13630

Haynesworth S.E.; Baber M.A.; Caplan A.I. (1996): Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL -  $1\alpha$

In: Journal of Cellular Physiology, 166(3): S. 585-592

Hazel T.; Hanley E.; Patt J.; Gruber H. (2008): Adipose-Derived stem cells: Characterisation and current application in orthopaedic Tissue Repair.

In: Experimental Biology and Medicine, 234: S.1-9

Herthel D.J. (2001): Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components.

In: AAEP Proceedings, 47: S. 319-321

Hoffmann M.; Wollert K.C.; Meyer G.P.; Menke A.; Arseniev L.; Hertenstein B.; Ganser A.; Knapp W.H.; Drexler H. (2005): Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium.

In: Circulation, 111(17): S. 2198-2202

Horowitz E.M.; Prockop D.J.; Fitzpatrick L.A.; Koo W.K.W.; Gordon P.L.; Neel M.; Sussman M.; Orchard P.; Marx J.C.; Pyeritz R.E.; Brenner M.K.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow - derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta.

In: Nature Medicine, 5 (3): S. 309–313

Hüsing B.; Engels E-M.; Frietsch R.; Gaisser S.; Menrad K.; Rubin B.; Schubert L.; Schweizer R.; Zimmer R. (2003): Menschliche Stammzellen: Studie des Zentrums für Technologiefolgen-Abschätzung TA44/2003

Igura K.; Zhang X.; Takahashi K.; Mitsure A.; Yamaguchi S.; Takahashi TA. (2004): Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta.

In: Cytotherapy, 6(6): S. 543-553

Ittrich H.; Lange C.; Dahnke H.; Zander A.R.; adam G.; Nolte-Ernsting C. (2005): Untersuchung zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3T.

In: Fortschr Röntgenstr 2005; 177: 1151-1163

Jankowski R.J.; Deasy B.M.; Huard J. (2002): Muscle-derived stem cells.

In: Gene Therapy, 9(10): S. 642-647

Jendelova P.; Herynek V.; De Cross J.; Glogarova K.; Andersson B.; Hajek M.; Sykova E. (2003): Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles.

In: Magnetic Resonance in Medicine, 50: S. 767-776

Jendelova P.; Herynek V.; Urdzikova L.; Glogarova K.; Kroupova J.; Bryja V. (2004): MR tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxid nanoparticles in rat brain and spinal cord.

In: Journal of Neuroscience Research, 76: S. 232-243

Jorgensen C.; Noel D.; Apparailly F.; Sany J. (2001): Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

In: Annals of Rheumatic Diseases, 60(4): S. 305-309

Jung C.W. (1995): Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil.

In: Magnetic Resonance Imaging, 13(5): S. 675-91

Kedziorek D.A.; Kraitchman D.L. (2010): Superparamagnetic iron oxide labeling of stem cells for MRI tracking and delivery in cardiovascular disease.

In: Methods in Molecular Biology, 660: S. 171-183

Kerkis I.; Ambrosio C.E.; Kerkis A.; Martins D.S.; Zucconi E.; Fonseca S.A.S.; Cabral R.M.; Maranduba C.M.C., Gaiad T.P.; Morini A.C.; Vieira N.M.; Brolio M.P.; Sant`Anna O.A.; Miglino M.A.; Zatz M. (2008): Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?

In: Journal of Transplantation Medicine, 6: 35

Koga H.; Muneta T.; Nagase T.; Nimura A.; Ju, Y-J. (2007): Comparison of mesenchymal tissues - derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.

In: Cell & Tissue Research, 333: S. 207-215

Kordowich S. (2008): Immunologische Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen und klinische Anwendung bei sieben Kindern.

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Kostura L.; Kraitchmann D.L.; Mackay A.M.; Pittenger M.F.; Bulte J.W.M (2004): Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis.

In: NMR Biomedicine, 17: S. 513-517

Krebsbach P.H.; Mankani M.H.; Satomura K.; Kuznetsov S.A.; Robey P.G. (1998): Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells.

In: Transplantation, 66: S. 1272-1278

Kruttwig K. (2009): Molekulare Markierungsstrategien für die optische und magnetresonanztomographische zelluläre Visualisierung.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften.

Küstermann E.; Himmelreich U.; Kandal K.; Geelen T.; Ketkar A.; Wiedermann D.; Strecker C.; Esser J.; Arnhold S.; Hoehn M. (2008): Efficient stem cell labeling for MRI studies.

In: Contrast Media and Molecular Imaging, 3(1): 27-37

Laubenberger T.; Laubenberger J. (1999): Technik der medizinischen Radiologie.

In: Thieme, 7: S. 355-369

Le Blanc K.; Tammik L.; Sundberg B., Haynesworth S.E.; Ringdén O. (2003): Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex.

In: Scandinavian Journal of Immunology, 57(1): S. 11-20

Lim J-H.; Byeon Y-E.; Ryu H-H.; Jeong Y-H., Lee Y-W.; Kim W.H.; Kang K-S.; Kweon K - J. (2007): Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs.

In: Journal of Veterinary Science, 8(3): S. 275-282

Lohr S.L.M. (2007)

Wertigkeit Sinerem<sup>®</sup>-verstärkter Magnetresonanztomographie des Knochenmarks bei Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen vor und nach Mobilisierungstherapie.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades.

Mahmood, A.; Dunnye, L.; Wang, L.; Chopp, M. (2002): Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury.

In: Journal of Neurotrauma, 19(12): S. 1609-1617

Majors A.K.; Boehm C.A.; Nitto H.; Midura R.J.; Muschler G.F. (1997): Characterisation of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation.

In: Journal of Orthopaedic Research, 15: S. 546-557

Majumdar M.K.; Keane-Moore M.; Buyaner D.; Hardy W.B.; Moorman M.A.; McIntosh K.R.; Mosca, J.D. (2003): Characterisation and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells.

In: Journal of Biomedical Science, 10: S. 228-241

Mancardi G.; Saccardi R. (2008): Autologous hematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis.

In: Lancet Neurology, 7(7): S. 626-36

Mason Ch. (2009): Regenerative medicine.

Regenerative Medicine 4(4), Suppl.1

Maximow A.A. (1906): Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarksgewebe.

In: Anatomischer Anzeiger, 28: S. 24-38

Mazzini L.; Mareschi K.; Ferrero I.; Vassallo E.; Oliveri G.; Boccaletti R. (2006): Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis.

In: Journal of Neurology Research, 28: S. 523-526

McColgan P.; Sharma P.; Bentley P. (2011): Stem cell tracking in human trials: a meta-regression.

In: Stem Cell Reviews and Reports, 7(4): S. 1031-1040

McRobbie D.W.; Moore E.A.; Graves M. J.; Prince M. R. (2006): MRI from Picture to Proton.

2. Ausgabe, Cambridge 2006

Miura M.; Gronthos S.; Zhao M.; Lu B.; Fisher L.W.; Robey P.G.; Songtao S. (2002): SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

In: Proceedings of the National Academy of Science USA, 100(10): S. 5807-5812

Mizrahi A.; Lu J.; Irving R.; Feng G.; Katz L.C. (2006): In vivo imaging of juxtglomerular neuron turnover in the mouse olfactory bulb.

In: Proceedings of the National Academy of Science USA, 103: S. 1912-1917

Modo M.; Hoehn M.; Bulte J.W.M. (2005): Cellular MR imaging.

In: Molecular Imaging, 4: S. 143-164

Munana K.R.; Luttgen P.J. (1998): Prognostic factors for dogs with granulomatous Meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996).

In: Journal of American Veterinary Medical Association, 212 (12): S. 1902-06

Murphy J.M.; Fink D.J.; Hunziker E.B; Barry F.P. (2003): Stem cell therapy in a caprine osteoarthritis.

In: Arthritis and Rheumatism, 48 (12): S. 3464-3474

Mosmann T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.

In: Journal of Immunological Methods, 65: S.55-63

Mulisch M.; Welsch U. (2010): Romeis – Mikroskopische Technik  
18. Aufl. 2010, XII

Muschler G.F.; Nitto H.; Matsukura Y.; Boehm C.; Valdevit A.; Kambic H.; Davros W.;  
Powell K.; Easley K. (2003): Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone  
marrow-derived cells.

In: Clinical Orthopaedics, S. 102-118

Nohroudi K.; Arnhold S.; Berhorn T.; Addicks K.; Hoehn M.; Himmelreich U. (2010):  
In vivo MRI Stem Cell Tracking Requires Balancing of Detection Limit and Cell Viability  
In: Cell Transplantation, 19(4): S. 431-441

Nathan S.; Das De S.; Thambyah A.; Fen Ch.; Goh J.; Hin Lee E.(2003): Cell - based therapy  
in the repair of osteochondral defects: A novel use for adipose tissue.

In: Tissue Engineering, 9(4): S. 733-744

Nelson R.W.; Couto C.G. (2010): Innere Medizin der Kleintiere  
2. Auflage 2010, Elsevier München

Nitz W. (2007): Prinzipien der MRT Bildgebung.

Noort W.A.; Kruisselbrink A.B.; Anker P.S.; Kruger M.; van Bezooijen R.L.; de Paus R.A.;  
Heemskerk M.H.; Lowik C.W.; Falkenburg J.H.; Willemze R.; Fibbe W.E (2002):  
Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+  
cells in NOD/SCID mice.

In: Experimental Hematology, 30: S. 870-878

Norman A.B; Thomas S.R.; Pratt R.G; Lu S.Y.; Norgren R.B. (1992): Magnetic resonance  
imaging of neural transplants in rat brain using a superparamagnetic contrast agent.

In: Brain Research, 594: S. 279-283.



Ohta M.; Suzuki Y.; Noda T.; Ejiri Y.; Dezawa M.; Kataoka K.; Chou H.; Ishikawa N.; Matsumoto N.; Iwashita Y.; Mizuta E.; Kuno S.; Die Ch. (2004): Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of injured rat spinal cord with reduced cavity formation.

In: *Experimental Neurology*, 187: S. 266-278

Orlic D.; Kajstura J.; Chimenti S.; Jakoniuk I.; Anderson S. M.; Li B.; Pickel J.; McKay R.; Nadal-Ginard B.; Bodine D.M.; Leri A.; Anversa P. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.

In: *Nature*, 410(6829): S. 701-5

Pacini S.; Spinabella S.; Trombi L.; Fazzi R.; Galimberti S.; Dini F.; Carlucci F.; Petrini M. (2007): Suspension of Bone Marrow - Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses.

In: *Tissue Engineering*, 13(12): S. 2949-2955

Patrick C.W. JR. (2000): Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection.

In: *Seminars in Surgical Oncology*, 19: S. 302-311

Penicka M.; Lang O.; Widimsky P.; (2007): One - day kinetics of myocardial engraftment after intracoronary injection of bone marrow mononuclear cells in patients with acute and chronic myocardial infarction.

In: *Heart*, 97(7): S. 837-841

Pittenger M.F.; Mackay A.M.; Beck S.C.; Jaiswal R.K.; Douglas R.; Mosca J.D.; Moorman M.A.; Simonetti D.W.; Craig S.; Marshal D.R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

In: *Science*, 284 (5411): S. 143-147

Politi L.S. (2007): MR based Imaging of Neural Stem Cells.

In: *Functional Radiology*, 49: S. 523-534

Politi L.S.; Bacigaluppi M.; Brambilla E.; Cadioli M.; Falini A.; Comi G.; Scotti G.; Martino G.; Pluchino S. (2007): Magnetic Resonance-Based Tracking and Quantification of Intravenously Injected Neural Stem cell Accumulation in the Brains of Mice with Experimental Multiple Sclerosis

In: *Stem Cells*, 25: S. 2583-2592

Ponticiello M.S.; Schinagl R.M.; Kidilaya S.; Barry F.P. (2000): Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy.

In: *Journal of Biomedical Materials Research*, 52: S. 246-255

Pooya H.A.; Sequin B.; Tucker R.L.; Gavin P.R.; Tobias K.M. (2004): Magnetic resonance imaging in small animal medicine: clinical applications.

In: *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 26(4): S. 292-301

Quarto R.; Mastrogiacomo M.; Cancedda R.; Kutepov S.M.; Mukhachev V.; Lavroukov A.; Kon E.; Marcacci M. (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells.

In: *The New England Journal of Medicine*, 344: S. 385-386

Reich C.M.; Raabe O.; Wenisch S.; Bridger P.S.; Kramer M.; Arnhold S. (2012): Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells – a comparative study.

In: *Veterinary Research Communication*, 36 (2): S. 139-48

Reilly T.M.; Seldes R.; Luchetti W.; Brighton C.T. (1998): Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells.

In: *Clinical Orthopaedics*, 346: S. 95-103

Reimer P.; Vossenrich R. (2004): Contrast agents in MRT. Substance, effects, pharmacology and validity.

In: *Radiologe*, 44(3): S. 273-83.

Reiser M.; Semmler W. (2002)

Magnetresonanztomographie

3. Auflage Springer Berlin Heidelberg Tokyo New York

Rodbell M. (1965): Metabolism of isolated fat cells.

In: Supplement 15: Handbook of Physiology, Adipose Tissue

Rouger K.; Larcher T.; Dubreil L.; Deschamps J.Y.; Le Guiner C.; Jouvion G.; Delorme B.; Lieubeau B.; Carlus M.; Fornasari B.; Theret M.; Orlando P.; Ledevin M.; Zuber C.; Leroux I.; Deleau S.; Guigand L.; Testault I.; Le Rumeur E.; Fiszman M.; Cherel Y. (2011): Systemic delivery of allogenic muscle stem (MuStem) cells Induces Longterm Muscle repair and clinical efficiency in 'Duchenne muscular dystrophy dogs.

In: American Journal of Pathology, 179 (5): S. 2501-2518

Ryu H.-H.; Lim J.-H.; Byeon Y.-E.; Park J.-R.; Seo M.-S.; Lee Y.-W.; Kim W.H.; Kang K.-S.; Kweon O.-K. (2009): Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury.

In: Journal of Veterinary Science, 10 (4): S. 273-284

Sampaloesi M.; Blot S.; D`Antona G.; Granger N.; Tonlorenzi R.; Innocenzi A.; Magnol P.; Thibaud J.-L.; Galvez B.G.; Barthelemy I.; Perani L.; Mantero S.; Guttinger M.; Pansarasa O.; Rinaldi Ch.; De Angelis M.G.C.; Torrente Y.; Bordignon C.; Bottinelli R.; Cossu G. (2006): Mesangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs.

In: Nature, 440: S. 574-579

Sanchez - Ramos J.; Song S.; Cardozo - Pelaez F.; Hazzi C.; Stedeford T.; Willing A.; Freeman T.B.; Saporta S.; Janssen W.; Patel N.; Cooper D.R.; Sanberg P.R. (2000): Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.

In: Experimental Neurology, 164: S. 247-256

Satake K.; Lou J.; Lenke L.G. (2004): Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue.

In: Spine, 29 (18): S. 1971-1979

Schnabel L.V.; Lynch M.E.; van der Meulen M.C.; Yeager A.E.; Kornatowski M.A.; Nixon A.J. (2009): Mesenchymal stem cells and insulin growth factor I gene enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendon.

In: Journal of Orthopaedic Research 29 (11): S. 1392-1398

Schwartz M.; Carlson R.; Tipold (2008): Selective cd11a upregulation on neutrophils in the acute phase of steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs.

In: Veterinary Immunology and Immunopathology 126: S. 248-255

Schwartz M.; Moore P.F.; Tipold A (2008): Disproportionally strong increase of b cells in inflammatory cerebrospinal fluid of dogs with steroid-responsive meningitisarteritis.

In: Veterinary Immunology and Immunopathology 125: S. 274-283

Seale P.; Asakura A.; Rudnicki M.A. (2001): The potential of muscle stem cells.

In: Developmental Cell, 1(3): S. 333-342

Serup P.; Madsen O.D.; Mandrup - Poulsen T.: Islet and stem cells transplantation for treating diabetes.

In: BMJ, 322(7277): S. 29-32

Schick F. (2005): Grundlagen der Magnetresonanztomographie (MRT).

In: Radiologie, 45: S. 69-88

Shake J. G.; Gruber P.J.; Baumgartner W.A.; Senechal G.; Meyers J.; Redmond J.M.; Pittenger M.F.; Martin B. J. (2002): Mesenchymal stem cell implantation in swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects.

In: The Annals of Thoracic Surgery, 73: S. 1919-1925

Shapiro E.M.; Skrtic S.; Koretsky A.P. (2005): Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles.

In: Magnetic Resonance in Medicine; 53(2): S. 329-338

Sharp N.J.H.; Wheeler S.J. (2004): Small Animal Spinal Disorders; Diagnosis and Surgery Elsevier, 2. Edition

Silver J.; Miller J.H. (2004): Regeneration beyond the glial scar.

In: Nature Reviews Neuroscience, 5: S. 146-155

Seonen S.J.H.; Himmelreich U.; Nuytten N.; De Cuyper M. (2011): Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labeling.

In: Biomaterials, 32: S. 195-205

Sohur U.S.; Emsley J.G., Mitchell B.D., Macklis J.D. (2006): Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells.

In: Philosophical Transaction of Royal Society Biological Science, 361: S. 1477-1497

Sommer Ursula (1993): Histogenese des Oberflächen- und Drüsenepithels des Labmagens beim Rind während der embryonalen und frühen fetalen Entwicklung.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der J.L.U - Giessen

Stamm C.; Westphal B.; Kleine H.D.; Petzsch M.; Kittner C.; Klinge H.; Schumichen C.A.; Freund M.; Steinhoff G. (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration.

In: Lancet, 361: S. 45-46

Strain A.J.; Crosby H.A. (2000): Hepatic stem cells.

In: Gut, 46(6): S. 743-745

Strauer B.E.; Brehm M.; Zeus T.; Kosterling M.; Hernandez A.; Sorg R.V.; Kogler G.; Wernet P. (2002): Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bonemarrow cell transplantation in humans.

In: Circulation, 106: S. 1913-1918

Suzuki M.; Uchida K.; Morozumi M.; Hasegawa T.; Yanai T.; Nakayama H.; Tateyama S. (2003): A Comparative Pathological Study on Canine Necrotizing Meningoencephalitis And Granulomatous Meningoencephalomyelitis.

Sykova E.; Jendelova P. (2006): Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord.

In: Neurodegenerative Diseases, 3: S. 62-67

Sykova E.; Jendelova P. (2007): Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS.

In: Cell Death and Differentiation, 14: S. 1336-1342

Takashima Y.; Era T.; Nakao K.; Kondo S.; Kasuga M.; Smith A.; Nishikawa S. (2007): Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation.

In: Cell, 129: S. 1377-1388

Tabbara I.A.; Zimmermann K.; Morgan C.; Nahleh Z. (2002): Allogeneic hemapoetic stem cells transplantation; complication and results.

In: Archives of Internal Medicine, 162: S. 1558-1566

Tavasolli M.; Crosby W.H. (1968): Transplantation of marrow to extramedullary sites

In: Science 161: S. 54-56

Teng Y. D.; Lavik E. B.; Qu X.; Park K. I.; Ourednik J.; Zurakowski D.; Langer R.; Snyder E.Y. (2002): Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells.

In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: S. 3024-3029

Thomson J.A.; Waknitz M.A.; Swiergiel J.J.; Marshall V.S.; Itskovitz-Eldor A.J.; Shapiro S.S. Jones J.M. (1998): Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts.

In: Science, 282 (5391): S. 1145-1147

Thorek D.L.J.; Tsourkas A. (2008): Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells.

In: *Biomaterials*, 29(26): S. 3583-3590

Tipold, A.; Jaggy A. (1994): Steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs - longterm study of 32 cases.

In: *Journal of Small Animal Practice* 35: S. 311-316

Tipold A. (2000): Steroid-responsive meningitis arteritis in dogs.

In: *Kirk's Current Veterinary Therapy*, S: 978-981

Toso C.; Vallee J. - P.; Morela P.; Risa F.; Demuylder - Mischlera S.; Lepetit - Coiffec M.; Marangond N.; Saudeke F.; Shapiro A.M.J.; Boscoa D.; Berneya T. (2008): Clinical Magnetic Resonance Imaging of Pancreatic Islet Grafts After Iron Nanoparticle Labeling.

In: *American Journal of Transplantation*, 8: S. 701–706

Tsai M. - S.; Lee J. - L.; Chang Y. - J.; Hwang S - M. (2004): Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol.

In: *Human Reproduction*, 19(6): S. 1450-1456

Tseng S.C. (1996): Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells.

In: *Molecular Biology Reports*, 23(1): S. 47-58

Toriyama K.; Kawaguchi N.; Kitoh J.; Tajima R.; Inou K.; Kitagawa Y.; Torii S. (2002): Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering.

In: *Tissue Engineering*, 8 (1): S. 157-165

Uccelli A.; Moretta L.; Pistoia V. (2008): Mesenchymal stem cells in health and disease.

In: *Nature*, 8: S. 726-736

Urdzikova L.; Jendelova P.; Glogarova K.; Burian M.; Hajek M.; Sykova E. (2006):

Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rat.

In: Journal of Neurotrauma, 23: S. 1379-1391

Vescovi A.L.; Galli R.; Gritti A. (2001): The neural stem cells and their transdifferentiation capacity.

In: Biomedicine and Pharmacotherapy, 55(4): S. 201-205

Vidal M.A.; Kilroy G.E.; Lopez M.J.; Johnson J.R.; Moore R.M.; Gimble J.M. (2007): Characterisation of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.

In: Veterinary Surgery 36: S. 613-622

Viera N.M.; Brandalise V.; Zucconi E.; Secco M.; Strauss B.E; Zatz M. (2010): Isolation, characterisation and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells.

In: Cell transplantation, 19: S. 279-289

Von Roth P. (2009): In vivo Visualisierung mesenchymaler Stammzellen nach lokaler Transplantation im schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Medizin der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Voß J. (2011): Steril eitrige Meningitis - Arteritis - Glukose-Gehalt im Liquor cerebrospinalis und familiäre Prädisposition

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin - Doctor medicinae veterinariae.

Walczak P.; Kedziorek D.A.; Gilad A.A.; Lin S.; Bulte J.W.M (2005): Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation.

In: Magnetic Resonance in Medicine, 54 (4): S. 769-774

Wang L.; Li Y.; Chen J.; Gautam S.C.; Zhang Z.; Lu M.; Chopp M. (2002): Ischemic cerebral tissue and MCP - 1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture.



In: ISEH Experimental hematology, 30(7): S. 831-836

Weinmann H.J.; Ebert W.; Misselwitz B.; Schmitt - Willich H. (2003): Tissue-specific MR contrast agents.

In: European Journal of Radiology, 46(1): S. 33-44

Weishaupt D.; Köchli V.D.; Marincek B. (2009): Wie funktioniert MRI?

6. Auflage, Springer

Weissleder R.; Elizondo G.; Wittenberg J.; Rabito C.A.; Bengele H.H; Josephson L. (1990): Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterisation of a new class of contrast agents for MR imaging.

In: Radiology, 175(2): S. 489-493

Westbrook C.; Kaut Roth C.; Talbot J. (2011): MRI in Practice.

4. Auflage, Wiley Blackwell 2011

Wood M.L.; Hardy P.A. (1993): Proton relaxation enhancement.

In: Journal of Magnetic Resonance Imaging, 3: S. 149-156

Wu S.F.; Suzuki Y.; Ejiri Y.; Noda T.; Bai H.L.; Kitada M.; Katoka K.; Ohta M.; Chou H.; Ide C. (2003): Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord.

In: Journal of Neuroscience Research, (72): S. 343-351

Wu J.C.; Spin J.M.; Cao F.; Lin S.; Xie X.; Gheysens O.; Chen I.Y.; Sheikh A.Y.; Robbins R. C.; Tsalenko A.; Gambhir S.S.; Quertermous T. (2006): Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation.

In: Physiological Genomics, 25(1): S. 29-38

Yoshimura H.; Muneta T.; Nimura A.; Yokoyama A.; Koga H.; Sekiya I. (2007): Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle.

In: Cell & Tissue Research, 327: S. 449-462

Young R.G.; Butler D.L.; Weber W.; Caplan A.I.; Gordon S. L.; Fink D.J. (1998): Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.

In: Journal of Orthopaedic Research, 16: S. 406-413

Young H.E.; Timothy A.S.; Bray R.A.; Hudson J.; Floyd J.A.; Hawkins K.; Thomas K.; Austin T.; Edwards Ch.; Cuzzourt J.; Duenzl M.; Lucas P.A.; Black A.C.Jr (2001): Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors.

In: The Anatomical Record, 264: S. 51-62

Zander A.R.; Stute N.; Kolb H.-J.; Seeber S.; Schmitz N. (2001): Adulte oder embryonale Stammzellen? Eine Stellungnahme der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (DAG - KBT) sowie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)

Zhou R.; Thomas D. H.; Qiao H.; Bal H. S.; Choi S. R.; Alavi A.; Ferrari V. A.; Kung H. F.; Acton P. D. (2005): In vivo detection of stem cells grafted in infarcted rat myocardium.

In: Journal of Nuclear Medicine 46(5): S. 816-22

Zuk P.A.; Zhu M.; Mizuno H.; Huang J.; Futrell J.; Katz A.J.; Benhaim P.; Lorenz H.P.; Hedrick M.H. (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies.

In: Tissue Engineering, 7: S. 211-228

Zuk P.A.; Zhu M.; Ashjian P.; De Ugarte D.A.; Huang J.; Mizuno H.; Alfonso Z.; Fraser J.; Benhaim P.; Hedrick M. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.

In: Molecular Biology of the Cell, 13: S. 4279-429

Zvaifler N.J.; Marinova-Mutafchieva L.; Adams G.; Edwards C.J.; Moss J.; Burger J.A.; Maini R.N. (2000): Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals.

In: Arthritis Research, 2: S. 477-488

## 9 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Multipotenz von MSCs nach Ucelli 2008.....   | 5  |
| Abbildung 2: Pulssequenz Diagramm nach McROBBIE 2006 .....  | 19 |
| Abbildung 3: Endoremolekül nach Sykowa, Jendelowa.....  | 23 |
| Abbildung 4: Endorem <sup>®</sup> -Flasche .....  | 36 |
| Abbildung 5: 24 Wellplatte mit Endorem <sup>®</sup> -markierten MSCs für Berliner Blau Färbung.....                 | 38 |
| Abbildung 6: 24 Wellplatte mit Endorem <sup>®</sup> -markierten MSCs und Kontrollgruppe für Phalloidinfärbung ..... | 39 |
| Abbildung 7: Mini MACS-System der Firma Miletnyi Biotec.....  | 40 |
| ZU/Abbildung 8: 24 Wellplatte für die adipogene Differenzierung .....   | 43 |
| Abbildung 9: 24 Wellplatte für die osteogene Differenzierung.....   | 45 |
| Abbildung 10: 15ml Falconröhrchen für die chondrogene Differenzierung.....  | 47 |
| Abbildung 11: Agaroseplatte .....   | 49 |
| Abbildung 12: MRT System der Firma Philips Medical System (Hamburg).....  | 50 |
| Abbildung 13: C3 Spule der Firma Philips Medical System (Hamburg) .....   | 51 |
| Abbildung 14: Software View Forum R6.3V1L7 SP1 2010 (Philips Medical System GmbH, Deutschland).....                 | 52 |
| Abbildung 15: prozentualer Anteil der Zellen mit $\geq 10$ Partikeln in der Berliner Blau Untersuchung .....        | 54 |
| Abbildung 16: Hund 128/10 Berliner Blau Färbung 3 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                  | 55 |
| Abbildung 17: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung 3 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                  | 55 |
| Abbildung 18: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung 3 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                  | 55 |
| Abbildung 19: Hund 134/12 Berliner Blau Färbung 3 Tage Endorem <sup>®</sup> -Markierung.....                        | 55 |
| Abbildung 20: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung 7 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                  | 55 |
| Abbildung 21: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung 7 Tage Endorem <sup>®</sup> -Markierung.....                        | 55 |
| Abbildung 22: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung 14 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ...                   | 56 |
| Abbildung 23: Hund 133/11 Berliner Blau Färbung 14 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ...                   | 56 |
| Abbildung 24: Hund 130/11 Berliner Blau Färbung 21 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ...                   | 56 |
| Abbildung 25: Hund 133/12 Berliner Blau Färbung 21 Tage nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ...                   | 56 |
| Abbildung 26: TEM Negativkontrolle .....  | 58 |
| Abbildung 27: TEM Negativkontrolle .....  | 58 |
| Abbildung 28: TEM Negativ Kontrolle Hd 127/10 .....   | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 29: TEM Hd 127/10 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                         | 58 |
| Abbildung 30: Vergrößerung von Abbildung 29 .....   | 58 |
| Abbildung 31: TEM Hd Nr 127/10 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                      | 58 |
| Abbildung 32: TEM Hd 128/10 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                         | 59 |
| Abbildung 33: TEM Hd 131/11 nach 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                   | 59 |
| Abbildung 34: TEM Hd 132/12 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                        | 59 |
| Abbildung 35: TEM Hd 131/12 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                        | 59 |
| Abbildung 36: TEM Hd 128/10 3 Wochen nach der Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                    | 59 |
| Abbildung 37: TEM Hd 127/10 3 Wochen nach der Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                    | 59 |
| Abbildung 38: TEM Hd 131/12 3 Wochen nach der Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                    | 60 |
| Abbildung 39: TEM Hd 131/12 3 Wochen nach der Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                    | 60 |
| Abbildung 40: TEM Hd 132/12 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung (Vergrößerung) .....         | 60 |
| Abbildung 41: TEM Hd 132/12 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....                        | 60 |
| Abbildung 42: Phalloidinfärbung Hd 130/11 nach 7 Tagen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....      | 61 |
| Abbildung 43: Phalloidinfärbung Hd 130/11 nach 7 Tagen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....      | 61 |
| Abbildung 44: Phalloidinfärbung Hd 131/11 nach 7 Tagen bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup> .....       | 61 |
| Abbildung 45: Phalloidinfärbung Hd 131/11 nach 7 Tagen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung .....      | 61 |
| Abbildung 46: Abnahme der mit Endorem <sup>®</sup> -markierten Zellen im zeitlichen Verlauf .....       | 63 |
| Abbildung 47: Berliner Blau Färbung nach der MACS-Sortierung (Zellenfraktion ohne Eisenpartikel) .....  | 63 |
| Abbildung 48: Berliner Blau Färbung nach der MACS-Sortierung (Zellenfraktion ohne Eisenpartikel) .....  | 63 |
| Abbildung 49: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ..... | 65 |
| Abbildung 50: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung ..... | 65 |
| Abbildung 51: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup> .....  | 65 |
| Abbildung 52: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup> .....  | 65 |
| Abbildung 53: Hund 131/11 Alcian Blau Färbung nach 23 Tagen Negativkontrolle .....                      | 65 |
| Abbildung 54: Hund 133/11 Alcian Blau Färbung nach 26 Tagen Negativkontrolle .....                      | 65 |
| Abbildung 55: Fettvakuolenzahl (Mittelwert) pro Zelle beim Hund 131/11 und 132/11 .....                 | 67 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 56: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung  | 67 |
| Abbildung 57: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung  | 67 |
| Abbildung 58: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup>   | 68 |
| Abbildung 59: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup>   | 68 |
| Abbildung 60: Hund 131/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen Zellen Negativkontrolle....  | 68 |
| Abbildung 61: Hund 132/11 Oil Red O Färbung nach 2 Wochen Zellen Negativkontrolle....  | 68 |
| Abbildung 62: Hund 133/12 Von Kossa Färbung nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung  | 69 |
| Abbildung 63: Hund 134/12 Von Kossa Färbung nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung  | 69 |
| Abbildung 64: Hund 133/12 Von Kossa Färbung bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup>   | 69 |
| Abbildung 65: Hund 134/12 Von Kossa Färbung bei Zellen ohne Endorem <sup>®</sup>   | 69 |
| Abbildung 66: Hund 133/12 Von Kossa Färbung Negativkontrolle.....  | 69 |
| Abbildung 67: Hund 134/12 Von Kossa Färbung Negativkontrolle.....  | 69 |
| Abbildung 68: Graphische Darstellung der Absorptionswerte zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden (24 und 48 Stunden nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung).....  | 72 |
| Abbildung 69: Schematische Darstellung der Agaroseplatte mit Beschriftung.....   | 74 |
| Abbildung 70: Beschreibung eines Beispielhistogramms: y-Achse: Häufigkeit mit der die Intensität vorkommt (Anzahl der Pixel mit diesem Intensitätswert); x-Achse: Signalintensität; Mittelwert (Mean); Standardabweichung (Standard deviation); Messfläche (Area = ROI); Minimalwert (min); Maximalwert (max)..... | 74 |
| Abbildung 71: MRT-Bild T2 TSE 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....  | 75 |
| Abbildung 72: MRT-Bild T2 FFE 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....  | 75 |
| Abbildung 73: MRT-Bild T2 TSE 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 76 |
| Abbildung 74: MRT-Bild T2 FFE 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 76 |
| Abbildung 75: MRT-Bild T2 TSE 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....   | 77 |
| Abbildung 76: MRT-Bild T2 FFE 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....   | 77 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 77: MRT-Bild T2 TSE 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 78 |
| Abbildung 78: MRT-Bild T2 FFE 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 78 |
| Abbildung 79: MRT-Bild T2 TSE 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....  | 79 |
| Abbildung 80: MRT-Bild T2 FFE 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 127/10 und 128/10.....  | 79 |
| Abbildung 81: MRT-Bild T2 TSE 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 80 |
| Abbildung 82: MRT-Bild T2 FFE 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung Hd 133/12 und 134/12.....  | 80 |
| Abbildung 83: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> .....   | 81 |
| Abbildung 84: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> .....  | 82 |
| Abbildung 85: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> .....  | 82 |
| Abbildung 86: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz 1 für alle Proben 1 Woche nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> ..... | 83 |
| Abbildung 87: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 2 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> .....  | 83 |
| Abbildung 88: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung und für Endorem <sup>®</sup> .....  | 84 |
| Abbildung 89: Signalintensität in der T2 TSE MRT-Sequenz für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung.....                          | 84 |
| Abbildung 90: Signalintensität in der T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung.....                          | 85 |
| Abbildung 91: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT Untersuchung T2 FFE für 1, 2 und 3 Wochen.....                   | 87 |
| Abbildung 92: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT-Untersuchung T2 TSE für 1, 2 und 3 Wochen.....                   | 88 |

Abbildung 93: Korrelationsanalyse zwischen MACS-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen und MRT-Untersuchung für 1, 2 und 3 Wochen links für T2 TSE und rechts für T2 FFE für 1,2 und 3 Wochen..... 89

Abbildung 94. Korrelationsanalyse zwischen T2 FFE Sequenz und T2 TSE Sequenz für 1, 2 und 3 Wochen..... 89

Abbildung 95: Korrelationsanalyse zwischen T2 FFE Sequenz und T2 TSE Sequenz für jeweils 1, 2 und 3 Wochen ..... 90

## 10 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Vor- und Nachteile der embryonalen vs. der adulten Stammzellen nach BREHM et al. 2002:.....   | 4  |
| Tabelle 2: nach Weishaupt (2009): Absolute Werte von T1 und T2 (in ms) für verschiedene Gewebe.....  | 20 |
| Tabelle 3: Liste der Chemikalien .....   | 30 |
| Tabelle 4: Liste der Materialien und Geräte.....   | 32 |
| Tabelle 5: Prozentueller Anteil der mit Endorem <sup>®</sup> -markierten Zellen nach 1, 2, 3 Wochen (Angabe in %) in der MACS-Untersuchung .....     | 62 |
| Tabelle 6: Schema der MTT-Untersuchung.....  | 71 |
| Tabelle 7: Werte der Absorptionsmessung zum Zeitpunkt 0 (24 Stunden nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung).....                                      | 71 |
| Tabelle 8: Werte der Absorptionsmessung zum Zeitpunkt 24 (48 Stunden nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung).....                                     | 71 |
| Tabelle 9: Werte der Signalintensität in der T2 TSE und T2 FFE MRT-Sequenz für alle Proben 1, 2, 3 Wochen nach Endorem <sup>®</sup> -Markierung..... | 81 |



## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer, der mir die Möglichkeit eröffnet hat in der Klinik für Kleintiere – Chirurgie der Justus Liebig Universität Giessen meine Dissertation anzufertigen.

Außerdem bedanke ich mich bei PD Dr. Martin Schmidt für die hervorragende Betreuung meiner Dissertationsarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborversuche, seine Beratung sowie die Korrektur dieser Arbeit.

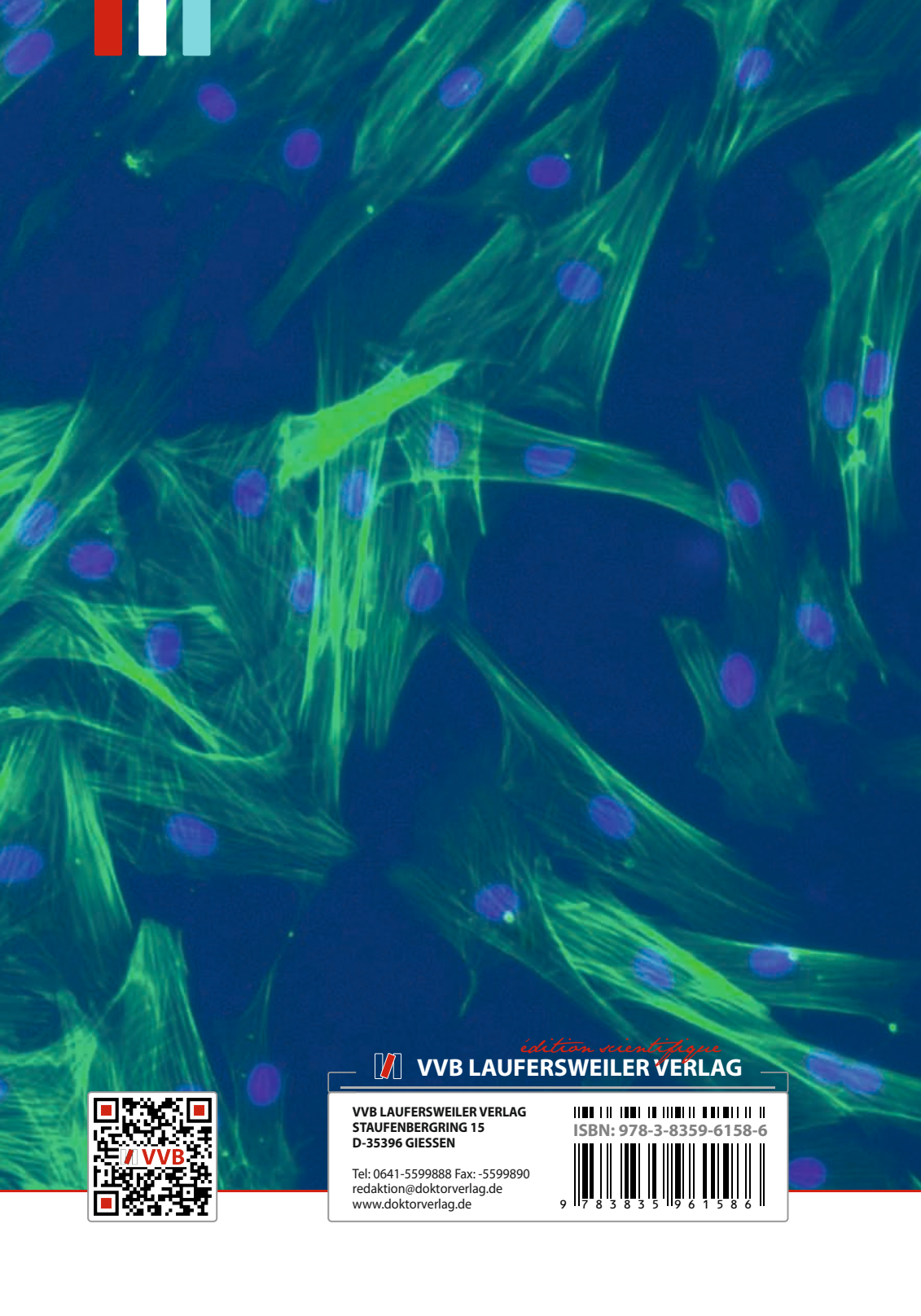
Ich bedanke mich bei Christine Reich für ihre Unterstützung bei Laborversuchen und bei Dr. Kerstin Amort für ihre umfassende Beratung im Zusammenhang mit der Magnetresonanztomographie.

Desweiteren danke ich den Mitarbeitern des Labors des Institutes für Veterinär-Anatomie der Justus Liebig Universität Giessen für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ich danke den Mitarbeitern der Abteilung für Bildgebung in der Klinik für Kleintiere – Chirurgie der Justus Liebig Universität Giessen für Durchführung der MRT-Untersuchung.

Ich bedanke mich bei Dr. Klaus Failing für die durchgeführten statistischen Berechnungen und seine fachliche Unterstützung.

Abschliessend geht mein Dank an meine Eltern, die mir mit Ihrer Unterstützung diese Dissertation ermöglicht haben und an meinen Freund Erik, meine Schwester und meinen Bruder, die mir immer hilfreich zur Seite standen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6158-6



9 783835 961586