

**Aus der Klinik für Innere Medizin V  
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin und  
dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Chirurgischen  
Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes**

**Transplantation von Lungengewebe in die  
Rückenhautkammer der Maus:  
Die Modulation des Homing  
von epithelialen Progenitorzellen in einen Ischämie-  
Reperfusionsschaden der implantierten Lunge**

als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
Annika Elisabeth Marianne Ballázs  
geb. am 29.06.1984 in Ratingen



*für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	07
Tabellenverzeichnis	08
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>09</b>
1.1 Deutsche Zusammenfassung	09
1.2 Summary	10
<b>2 Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1 <i>In vivo</i> - Mikroskopie	11
2.2 Apoptose und Nekrose: Zwei Mechanismen des Zelluntergangs	12
2.2.1 Apoptose	12
2.2.2 Nekrose	14
2.3 Rückenhautkammermodelle	16
2.4 Endothel als Fokus	17
2.4.1 Angiogenese und Vaskulogenese	17
2.4.2 Definitionen von Stamm- und Progenitorzellen	19
2.4.3 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen, zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und zirkulierender Endothelzellen	21
2.5 Epithel im Fokus des akuten Lungenschadens	23
2.5.1 Epithelien im Respirationstrakt	23
2.5.2 Progenitorzellen und Stammzellen im Respirationstrakt	25
2.5.3 Epithelzelluntergang im akuten Lungenschaden	26

<b>2.6</b>	<b>Acute Lung Injury und ARDS</b>	31
2.6.1	Definitionen	31
2.6.2	ARDS – eine Krankheit mit hoher Mortalität: Epidemiologie und Geschichte	32
2.6.3	ARDS: Klinik und Auslöser	32
2.6.4	Pathogenese des ARDS	33
<b>2.7</b>	<b>Ziele der Studie</b>	35
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	36
3.1	Versuchstiere	36
3.2	Etablierung der Technik	37
3.3	Epitheliale Progenitorzellen der Ratte (SDKer)	46
3.4	Intravitale Mikroskopie	47
3.5	Mikrozirkulatorische Parameter	49
3.6	Statistische Auswertung	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	53
4.1	Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	53
4.2	Ischämie-Reperfusionsschaden	53
4.3	Charakterisierungsversuch	54
4.3.1	Kapillardichte	54
4.3.2	Reaktion des Empfängergewebes	57

<b>4.4</b>	<b>Stammzellversuche</b>	58
4.4.1	Kapillardichte	58
4.4.2	Verteilung der epithelialen Stammzellen im Gewebe	63
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	69
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	71
<b>5.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden</b>	71
5.1.1	Diskussion des Modells	71
5.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	74
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	75
5.2.1	Transplantation und Revaskularisierung ektopen Lungengewebes	75
5.2.2	Homing epithelialer Stammzellen in geschädigtem Lungengewebe	76
5.2.3	Einfluss der Ischämie auf Kapillardichte in Lungen- und Kammergewebe	78
5.2.4	Einfluss der Ischämie auf Leukozytencounts im Lungen- und Kammergewebe	79
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	79
<b>5.4</b>	<b>Klinische Perspektiven</b>	80
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	81
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	96
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	97

## Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Eine C57/BI-6 Maus (<http://caf.iisc.ernet.in/photogallery/c57.jpg>)
- Abbildung 2: Eine CD1 nu/nu Nacktmaus ([http://www.respiratoryceus.net/resources/classfiles/class\\_2/image032.jpg](http://www.respiratoryceus.net/resources/classfiles/class_2/image032.jpg))
- Abbildung 3: Rückenhautkammer aus Titan (<http://www.bergmannsheil.de/typo3temp/pics/3dda262d33.jpg>)
- Abbildung 4: Perspektivische Ansicht einer Rückenhautkammer (mit herzlichem Dank für die Überlassung des Bildes, das im Original für die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters gefertigt wurde, an Herrn Dr. M. W. Laschke, Institut für Experimentelle Chirurgie, Homburg, und auch an seinen Vater als Mitverfasser des Bildes)
- Abbildung 5: Testen des Zwischenzehenreflexes mit einer Pinzette
- Abbildung 6: Elektrorasur einer BI-6 Maus
- Abbildung 7: Aufhängung der Maus an einem Stativ
- Abbildung 8: Präparation des Beobachtungsfensters
- Abbildung 9: Aufsetzen des vorderen Titanrahmens
- Abbildung 10: Fertige Rückenhautkammer
- Abbildung 11: Herz-Lungenpaket einer Spendermaus
- Abbildung 12: Präparation der Parenchymwürfel
- Abbildung 13: Inhalationsnarkose
- Abbildung 14: Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer
- Abbildung 15: Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer
- Abbildung 16: Ischämie eines Lungenwürfels
- Abbildung 17: Rückenhautkammer nach Ischämie
- Abbildung 18: Intravenöse Injektion der epithelialen Stammzellen unter operationsmikroskopischer Kontrolle
- Abbildung 19: Epitheliale Stammzellen
- Abbildung 20: Epitheliale Stammzellen (mit herzlichem Dank für die Überlassung des Bildes an Frau Dr.rer.nat. Claudia Scheuer, Institut für Experimentelle Chirurgie, Homburg)
- Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Sammelvenole und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer.
- Abbildung 22: Schematische Darstellung des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes
- Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von implantiertem Lungengewebe und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer.
- Abbildung 24: Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer Kammerarteriole und ihrer Abgänge.
- Abbildung 25: Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe nach einstündiger Ischämie
- Abbildung 26: Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe nach dreistündiger Ischämie
- Abbildung 27: Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe ohne Ischämie

- Abbildung 28: Ischämisches Lungengewebe im Vergleich der Kapillardichte nach einstündiger bzw. dreistündiger Ischämie
- Abbildung 29: Vergleich der Kapillardichte von Lungenkapillaren vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit.
- Abbildung 30: Vergleich der Kapillardichte in Lungengewebe vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit.
- Abbildung 31: Vergleich der Kapillardichte von Lungengewebe über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels.
- Abbildung 32: Vergleich der Kapillardichte von Kontrolllungengewebe vor/nach Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels über die Zeit.
- Abbildung 33: Vergleich der Kapillardichte von Kammergefäßen vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit.
- Abbildung 34: Vergleich der Kapillardichte in betroffenen Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels.
- Abbildung 35: Vergleich der Kapillardichte in Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels.
- Abbildung 36: Vergleich der Kapillardichte in nicht ischämischen Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels.
- Abbildung 37: Verteilung der epithelialen Stammzellen im ischämischen Lungengewebe über die Zeit.
- Abbildung 38: Epitheliale Stammzellen in ischämischem Lungengewebe nach 24h und 8d im Vergleich.
- Abbildung 39: Verteilung der Stammzellen im Kontrolllungengewebe über die Zeit.
- Abbildung 40: Verteilung der Stammzellen im ischämischen Kammergewebe über die Zeit.
- Abbildung 41: Epitheliale Stammzellen im ischämischen Kammergewebe nach 24h und 8d im Vergleich.
- Abbildung 42: Verteilung der Stammzellen im Kontrollkammergewebe über die Zeit.
- Abbildung 43: Verteilung der Stammzellen im Lungengewebe: Ischämie vs. Kontrolle
- Abbildung 44: Vergleich der Verteilung epithelialer Stammzellen zwischen Kontroll- und Ischämiegebieten unabhängig vom Zeitpunkt.
- Abbildung 45: Verteilung der Stammzellen im Kammergewebe, Ischämie vs. Kontrolle, unabhängig von der Zeit.
- Abbildung 46: Vergleich der Verteilung epithelialer Stammzellen zwischen Kontroll- und Ischämiegebieten unabhängig vom Zeitpunkt.
- Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme epithelialer Stammzellen im Lungengewebe.

### **Tabellenverzeichnis:**

- Tabelle 1: Die gängigste Definition des ALI und des ARDS



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das „Akute respiratorische Distress Syndrom“ gehört auch heute noch zu einer der schwerwiegendsten Komplikationen bei beatmeten Patienten in der Intensivmedizin.

Charakterisiert durch bilaterale Lungeninfiltrate, verminderte Compliance und Hypoxämie hat diese Erkrankung immernoch eine hohe Mortalität.

Vor allem im Bereich der supportiven Therapie konnten zuletzt Erfolge erzielt werden. So führte das Verfolgen individueller Beatmungsprotokolle mit niedrigen Tidalvolumina und hohen endexpiratorischen Beatmungsdrücken zu einer Verbesserung des Outcomes und Reduktion der Mortalität um 22 %.

In den letzten Jahren wurden verschiedene pathogenetische Aspekte dieser Krankheit erforscht. Gustavo Matute-Bello und Thomas Martin sprachen in ihrer 2003 veröffentlichten Arbeit von der „epithelialen Hypothese“. Diese besagt, dass der Epithelzelluntergang während des ARDS die Folge apoptotischer Prozesse in Epithelzellen ist, welche durch lösliche Mediatoren wie den Fas-Ligand initiiert werden.

Der Epithelzelltod ist ein bedeutsamer Mechanismus in der Entwicklung des akuten Lungenschadens, welcher bisher nicht vollständig verstanden ist. Es gibt jedoch gute Gründe zu der Annahme, dass in diesem Mechanismus des ARDS großes Potential für therapeutische Ansätze liegt.

Unsere Überlegungen beschäftigten sich mit der Frage ob es auch einen Tropismus epithelialer Progenitorzellen in geschädigtes Lungengewebe gibt. In unserer Arbeitsgruppe konnte dieser bereits für endotheliale Stammzellen in einem Lungen-Transplantationsmodell bei der Ratte bewiesen werden.

In diesem Modell wurde ektopes Lungengewebe in die Rückenhautkammer einer Nacktmaus implantiert und an einem der drei Lungenstücke durch warme Ischämie ein akuter Lungenschaden verursacht. Die Kontrolllungenstücke in der gleichen Kammer waren von dem Reperfusionsschaden nicht betroffen. Ein bis zwei Stunden nach Reperfusion wurden fluoreszenzmarkierte epitheliale Stammzellen intravenös appliziert. Wir konnten demonstrieren, dass auch epitheliale Progenitorzellen eine Tendenz zur Migration in ischämisches Gewebe haben. Diese war signifikant gegenüber den gesunden Lungenstücken sowie anderen Organsystemen. Die applizierten epithelialen Zellen könnten eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung der Integrität geschädigter Gefäße spielen und somit zur Reparatur der Lunge und Wundheilung in geschädigten Gewebe beitragen.

## 1.2 Summary

Acute respiratory distress syndrome still today is one of the major and severest complications of ventilated patients in intensive care units.

Accompanied by bilateral lungedema, decreased compliance and hypoxemia this disease has high mortality rates.

Above all in means of supportive care, great success could be achieved in the past time.

The consequent use of individually adjusted ventilationschemes with low tidal volumes and high endexpiratory pressure leads to improved outcome and reduces long term mortality up to 22%.

In the past years different aspects of pathogenesis in this disease were subject to intense investigation. Gustavo Matute-Bello and Thomas Martin established 2003 the „epithelial hypothesis“, which suggests that epithelial injury in acute lung injury is associated with apoptotic death of alveolar epithelial cells triggered by soluble mediators such as soluble Fas ligand. Epithelial death is a crucial mechanism in acute lung injury, which so far is barely understood. However there is great evidence that this mechanism of ARDS bears potential for therapeutical access.

Our considerations dealt with the question if epithelial stem cells migrate into damaged lung tissue. Our research group could demonstrate a corresponding behaviour for endothelial stem cells in a lung transplant model in rats.

In this model ectopic lung pieces were implanted in a dorsal skinfold chamber and severe acute lung injury of one ectopic lung piece occurred after 3 hours of warm ischemia. The two control lung pieces in the same dorsal skinfold chamber were not affected by reperfusion injury. One to two hours after reperfusion, fluorescence marked epithelial stem cells were transplanted intravenously.

We could prove that epithelial progenitor cells tend to migrate into ischemic tissue. This tendency was significant to control lungs and other organs.

Such transplanted epithelial cells may play an important role in reestablishing the epithelial integrity in injured vessels and therefore may contribute to lung repair or wound healing processes in damaged tissue.

## 2 Einleitung

Es ist bekannt, dass proinflammatorische Signalkaskaden in alveolo-kapillärem Gewebe einen akuten Lungenschaden bedingen, dennoch sind eben diese Schlüsselmechanismen bisher unzureichend verstanden. Man vermutet, dass Entzündungen die Folge koordinierter Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen des betroffenen Gewebes sind, z.B. die Migration von Entzündungszellen in Alveolen (Kuebler 2006).

Experimente an Zellkulturen, wie sie häufig unternommen werden, sind nicht in der Lage das Verhalten solcher Zellen in ihrer physiologischen Umgebung nachzuahmen.

Infolgedessen ist es notwendig neue Verfahren zu untersuchen, welche in der Lage sind eben diese Signalwege in ihrer ursprünglichen Umgebung aufzuzeichnen.

### 2.1 In vivo – Mikroskopie

Die in-vivo Mikroskopie dient in erster Linie der Darstellung von Mikrozirkulation in vitalem Gewebe. Zwei Verfahren werden hierzu maßgeblich genutzt:

Zum einen Transilluminationsmikroskopie und zum anderen Fluoreszenz-Epiilluminationmikroskopie.

Solange der Querschnitt des Gewebes kleiner ist als 300 µm, wie bei Mesenterium (Zweifach 1954), Omentum (Intaglietta 1970) und Kremastermuskel (Prewitt u. Johnson 1976), kann die Transilluminationstechnik angewandt werden.

Im Gegensatz dazu werden solide Organe, wie Herz (Huwer 1998) und Leber (Menger 1991a), mittels Epiillumination untersucht. Dabei verwendet man fluoreszierende Marker und spezifische Färbungen.

Eine andere vielseitige Facette der in vivo-Bildgebung ist die Intravitalmikroskopie (IVM). Durch sie ist es mittlerweile möglich Mikrozirkulation und Hämodynamik fast aller Organe darzustellen. Diese Technik gibt einen detaillierten Einblick in die individuelle Geometrie mikrovaskulärer Geflechte, d.h. zuführender Arteriolen, nutritiver Kapillaren und Venolen, sowie in deren Hämodynamik, im Sinne von Geschwindigkeit roter Blutzellen, Durchmesser von Blutgefäßen, Blutfluss im mikrovaskulären Bett und Ausmaß der Abscherung an der Gefäßwand (Angiogenesis Assays 2006).

Um jedoch Angiogenese genau studieren zu können, reicht diese Art der Aufbereitung von Gewebe nicht aus. Der Grund hierfür ist, dass Angiogenese ein Prozess ist, welcher Tage bis Wochen in Anspruch nimmt. Die IVM-kompatible Aufbereitung des Gewebes ist in den meisten Fällen an chirurgische Eingriffe gekoppelt und kann so nur eine Momentaufnahme der Gefäßsituation liefern und ist nicht geeignet für eine längere Observation.

Als Konsequenz wären wiederholte operative Eingriffe von Nöten um die einzelnen Schritte einer Gefäßneubildung in vivo zu dokumentieren. Chirurgische Reize und vor allem die ständige Präparation des Gewebes haben sich in der Vergangenheit als starke Stimuli für Entzündungsreaktionen und Angiogenese per se erwiesen (Fiebig 1991, Thaler 2005, Greene 2005).

Dadurch würde die Analyse spezifischer angiogenetischer Stimuli in Zusammenhang mit einer bestimmten Krankheit nachhaltig beeinflusst werden.

Die Haut entzieht sich als einziges Organ der Notwendigkeit chirurgischer Präparationen, da nur sie durch ihre physiologisch exponierte Lage von außen zugänglich ist (Vollmar 2000, Barker 1989).

Theoretisch kann sie ohne Einschränkungen über längere Zeiträume im IVM beobachtet werden. Leider ist sie in ihrer Transparenz suboptimal und zeigt große Varianz abhängig von Pigmentierung und Alter des Tieres.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, liegt die Anwendung von Kammermodellen nahe. Zwar ist zur Präparation der Subkutis, Muskel, Gehirn oder Knochen im Kammermodell ebenfalls ein chirurgischer Eingriff notwendig, jedoch reicht eine Ruhephase von 48h bis 72h vor Beginn des Experiments aus, um eine Normalisierung der Mikrozirkulation zu erreichen (Angiogenesis Assays 2006).

## **2.2 Apoptose und Nekrose: Zwei Mechanismen des Zelltods**

### **2.2.1 Apoptose (Hug 2000, Grimm 2003, Höffeler 2004)**

Das Wort „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie weg- oder abfallen, wie Blätter von einem Baum.

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods einzelner biologischer Zellen.

Dieser voraus geht eine Aktivierung spezifischer Zellmembranrezeptoren, sog. „death receptors“ und die Freisetzung einiger mitochondrialer Produkte wie das Cytochrom C (Thome 2001).

Zur Familie der „Todesrezeptoren“ gehören die TNF- Rezeptoren I und II und der Fas Rezeptor (CD 95), welcher vom Fas-Liganden (FasL) oder seiner löslichen Form (sFasL) aktiviert wird (Martin 2005).

Das „Selbstmordprogramm“ der Zelle setzt sich in Gang, wenn entsprechende Stimuli von außen, etwa durch Immunzellen, oder in der Zelle selbst, beispielsweise nach starker Schädigung der Erbinformation, auftreten.

Die Apoptose der Zelle wird durch bestimmte inhibitorische Proteine genauestens reguliert, so dass der Zelltod zu entsprechenden Zeitpunkten kontrolliert werden kann. Eine Familie von Proteinen, die sog. „inhibitors of apoptosis“ (IAP), binden direkt an die Caspasen 3, 6, 7 und 9 (Konopleva 1999). Der mitochondriale Weg wird von der BCL-2-Proteinfamilie durch Blockade der Cytochrom-C-gesteuerten Aktivierung von Caspasen unterbunden (Deveraux 1999, 2001). Im Gegensatz zur Nekrose, einem anderen Weg des Zelluntergangs, kommt die Apoptose häufiger vor. Außerdem ist sie ein aktiver Prozess der betroffenen Zelle und Teil ihres physiologischen Stoffwechsels. Die aktive Form des Zelltods wird auf molekularer Ebene streng kontrolliert und ermöglicht den Zelluntergang ohne benachbartes Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen. Caspasen, einer Gruppe von Enzymen mit proteolytischer Aktivität, kommt dabei eine zentrale Rolle zu.

Apoptose und Nekrose lassen sich schon optisch voneinander abgrenzen:

Bei ersterer bauen Endonukleasen die DNA in definierte Stücke ab, die sog. DNA-Leiter, welche mittels Elektrophorese nachweisbar sind. Die Zelle schrumpft, während sie bei einem nekrotischen Geschehen anschwillt. Durch die erhöhte Volumenbelastung bei der Nekrose wird die Plasmamembran der Zelle zerstört, infolgedessen treten Zytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum aus und verursachen dort eine lokale Entzündungsreaktion. Wie bereits erwähnt, ist die Apoptose ein physiologischer Prozess und während der Entwicklung eines Organismus essenziell. Als Beispiel sei die Linse im menschlichen Auge genannt, welche ihre Lichtdurchlässigkeit erst durch gezielten Zelluntergang in Linse und Glaskörper erreicht oder die Entstehung der Interdigitalräume der Finger und Zehen (Martin 2005). Aber auch im adulten Organismus ist sie unerlässlich: Sie kontrolliert die Zellzahl und Größe von Geweben, trägt zur Verjüngung von Geweben bei (z.B. beim Riechepithel der Nase) und ist der Garant für die Selektion und den Abbau unnötiger oder potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems. Der aktive Zelltod spielt aber auch eine Rolle bei der Selektion von Keimzellen und bei der Eliminierung entarteter Zellen. Gegenwärtig wird die Apoptose besonders im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und verschiedenen Autoimmunerkrankungen erforscht.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Man spricht von einer Initiationsphase und einer Effektorphase. Bei der Initiationsphase unterscheidet man wiederum zwei Vorgänge, den extrinsischen Weg (Typ I) und den intrinsischen Weg (Typ II):

### **Die Initiationsphase**

Der extrinsische Weg (Typ I) wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (z.B. CD95). Mögliche Liganden sind zum Beispiel der Tumor-Nekrose-Faktor und andere Zytokine, die u.a. von T-Lymphozyten sezerniert werden. Es folgt eine Kaskade, welche über homotypische Interaktionen, sog. „death domains“ verschiedener Liganden, schließlich in die Aktivierung der Caspase 8 mündet. Die aktive Caspase 8 löst ihrerseits wieder die Caspase-Kaskade aus.

Beim intrinsischen Weg (Typ II) kommt es durch bislang nicht vollständig untersuchte Mechanismen zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma.

Diese Form der Apoptose tritt auf wenn Tumor-Suppressoren, wie beispielsweise p53, aktiviert werden. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiv wird. Er stimuliert die Freisetzung pro-apoptotisch wirksamer Faktoren, wie das Cytochrom C, aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Über Bindung an den apoptotischen Protease Aktivierungsfaktor 1 (APAF-1) und die konsequente Konformationsänderung des Proteins kann nun die Procaspase 9 ebenfalls andocken.

Durch die Bildung dieses Heterodimers ist die autolytische Aktivierung der Caspase 9 möglich. Dieser Komplex wird auch Apoptosom genannt. Analog zu Caspase 8 initiiert die aktive Caspase 9 ebenfalls die Caspase-Kaskade.

### **Die Effektorphase und Caspase-Kaskade:**

Als Effektorcaspasen bezeichnet man die Caspasen 3, 6 und 7. Sie führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Einerseits aktivieren sie durch gezielte, limitierte Proteolyse sekundäre Zielproteine (z.B. DNase), andererseits bauen sie selbst aktiv Lamin in der Zellkernmembran und Aktin als Teil des Zytoskeletts ab. Ein weiterer Aspekt ist die Caspase-vermittelte Unterdrückung der DNA-Reparatur.

Im weiteren Verlauf schnürt sich die Zelle zu kleinen Vesikeln ab, die von Phagozyten aufgenommen werden können (Kerr 1972).

Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Zellmembran hierbei intakt.

### **2.2.2 Nekrose (Bühling 2004)**

Unter einer Nekrose versteht man intravital auftretende morphologische Veränderungen einer Zelle nach ihrem Absterben. Ihr gehen häufig andere, reversible Vorgänge wie Schwellung

oder Verfettung voraus. Die Ursache für den provozierten Zelltod können sowohl endogener also auch exogener Natur sein.

Ein nekrotischer Zelltod erfolgt nach starker Zellschädigung, wie er durch mechanische oder chemische Noxen, wie z.B. Scherkräfte bei der maschinellen Beatmung oder die Endotoxine gewisser Bakterien, ausgelöst werden kann (Martin 2005).

Wirkt ein schädigender Reiz lange und stark genug auf eine Zelle ein, bricht der osmotische Gradient über der Zellmembran zusammen. Es kommt zum Ioneneinstrom, nachfolgendem Wassereinstrom und somit zur Volumenzunahme der Zelle und der Zellorganellen. Charakteristisch ist ein ungeordneter Abbau von makromolekularen Strukturen. Die Zelle wird irreversibel geschädigt und lysiert innerhalb kurzer Zeit. Zytoplasmatische Bestandteile und Membranfragmente führen zur Schädigung umliegender Zellen. Die Folge ist eine Zytokin-vermittelte Entzündungsreaktion bei stärkerem Gewebszerfall (Schneider 2002).

Über Karyopyknose (Kernschrumpfung), Karyorrhesis (Kernzerfall) und Karyolyse (Kernaflösung) kommt es zum Absterben der Zelle. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Nekroseformen:

Die Koagulationsnekrose ist die typische Nekroseform für Leber, Niere, Herz und Milz.

Durch eine Störung des oxidativen Stoffwechsels mit darauffolgender anaerober Glykolyse kommt es zur Gewebsansäuerung, welche zur Denaturierung beiträgt. Das nekrotisierende Gewebe wandelt sich in eine gelblich-trockene Masse um, wobei seine Struktur weitgehend erhalten bleibt.

Zu den Sonderformen der Koagulationsnekrose gehören die Gangrän, Schorfnekrose, die käsige Nekrose bei Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, fibrinoide Nekrose und die hämorrhagische Nekrose, wie sie bei Verschlüssen von Venen und Arterien vorkommt.

Im Gegensatz zur Koagulationsnekrose kommt es bei der Kolliquationsnekrose nach einer anfänglichen Schwellung zu einer enzymatischen Gewebsauflösung. Die Kolliquationsnekrose ist typisch für das Gehirn und das Pankreas. Mögliche Ursachen hierfür sind Sauerstoffminderversorgung, Laugeneinwirkung oder der Befall durch lysierende Bakterien. Die nekrosebedingte Freisetzung bestimmter Proteasen und koagulierbarer Enzyme begünstigt den hydrolytischen Gewebsabbau. Als Sonderformen der Kolliquationsnekrose treten die einfache Fettgewebsnekrose und die lipolytische Fettgewebsnekrose auf.

Im Zentrum größerer Tumoren oder Metastasen herrscht oft eine Mangelversorgung mit Blut, so dass der Tumor zentral einschmilzt. Dieser Vorgang wird gemeinhin als Tumornekrose bezeichnet.

Je nach Nekroseart kommt es im Gewebe mehr oder minder schnell zu einer Entzündung mit konsequenter Granulozyten- und Makrophagenaktivität. Diese schafft Platz für die nachfolgende Regeneration. Man unterscheidet eine vollkommene Regeneration bei Partialnekrosen und Organen welche nicht zum permanent postmitotischen Zellsystem gehören (z.B. Leber), von einer unvollkommenen Regeneration, wo nekrotisches Gewebe durch Bindegewebe ersetzt wird (Narbenbildung).

Ist es zu Gewebsauflösungen gekommen, können sich Zysten bilden. Tuberkulöse Nekrosen und lipolytische Fettgewebsnekrosen weisen oft Verkalkungen auf.

### 2.3 Rückenhautkammermodelle

Das erste Kammermodell als solches baute Sandison 1924 in ein Hasenohr. Dieses ermöglichte ihm das Wachstum und das Verhalten von lebendigen Zellen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) (siehe Kapitel 3.4) zu beobachten. Diese ursprüngliche Kammertechnik unterlief einige Modifikationen, die darauf abzielten ihre Implantation zu vereinfachen und die Bildqualität zu verbessern (Algire 1943, Arfors 1970).

Ein großer Nachteil dieser frühen Kammerpräparationen war, dass das Gewebe, welches untersucht wurde, primär aus neugebildetem Granulationsgewebe bestand.

Dementsprechend wurden im Zuge der Wundheilung die Ergebnisse bei der Untersuchung von Angiogenese in Tumorimplantaten zusätzlich von der Neubildung von Granulationsgewebe beeinflusst.

Das Ziel war es also die Kammertechnik so zu modifizieren, dass das zu untersuchende Gewebe nicht mehr von der Implantation selbst beeinträchtigt würde.

Innerhalb der heutigen Rückenhautpräparationen lassen sich gestreifte Muskulatur, bzw. der „Panniculus carnosus“, die Subkutis und Haut im Mikroskop beobachten.

Die Rückenhautkammern können über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen zu IVM-Studienzwecken verwendet werden, ohne dass sich Granulationsgewebe bildet bzw. Angiogenese provoziert wird (Lehr 1993).

Folglich kann die Angiogenese von Zellimplantaten in der Kammer studiert werden ohne dass eine Neovaskularisation im Empfängergewebe Einfluss auf diese nimmt.

In den vergangenen 30 Jahren hat sich die Rückenhautkammer in zahlreichen Studien als ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Neovaskularisation verschiedener Transplantate erwiesen (Laschke 2002).



Als Host hierfür dienten Ratten (Papenfuss 1979), Hamster (Endrich 1980) und Mäuse (Lehr 1993). Und untersucht wurden einerseits Organgewebe, wie beispielsweise Milz (Foitzick 1988), Myokard (Funk 1986), Knochenmark (Funk 1986) und Langerhans'sche Inseln (Menger 1989, 1990a, 1991), sowie andererseits Tumorgewebe (Vajkoczy 1998, 2000) und synthetische bzw. biologische Implantationsmaterialien (Menger 1990b, 1992a; Kraft 2000). Auch auf dem Gebiet der Mikrozirkulation bietet dieses Modell noch weitere Forschungsmöglichkeiten, zum Beispiel Untersuchungen über die „physiologischen Steuerungsmechanismen des Gefäßbetts [Gerstberger et al., 1988], den Einfluss von Narkotika auf die Mikrozirkulation [Franke et al., 1982, 1983] und die Veränderungen der Gewebepfusion unter pathologischen Bedingungen, wie Entzündung [Westermann et al., 1999], Ischämie [Sack et al., 1987] und Gewebetrauma [Yamauchi et al., 1999].“ (Laschke 2002)

## **2.4 Endothel im Fokus**

### **2.4.1 Angiogenese und Vaskulogenese - Definitionen**

Man unterscheidet heute üblicherweise zwischen zwei Mechanismen der Gefäßneubildung, bzw. der Endothelregeneration: Der Vaskulogenese und der Angiogenese. 1971 benutzten Gonzalez-Crussi, Haar und Ackermann den Begriff „Vaskulogenese“ zur Beschreibung der Anordnung der ursprünglichen Blutgefäße in Vogel- und Mausembryonen. Heute findet diese Bezeichnung in der Literatur überwiegend Verwendung bei der Abgrenzung der *de-novo* Gefäßbildung von der Angiogenese, welche als Formierung neuer Blutgefäße aus bereits Bestehenden verstanden wird (Pardanaud 1987, Risau 1995, Poole 1989).

Charakteristika der Angiogenese sind Endothelproliferation, Aussprossung und Einstülpung der Gefäße. Diese Vorgänge vollziehen sich am ursprünglichen Gefäßplexus, welcher während der Embryogenese zur Versorgung der Frucht mit Nährstoffen und Sauerstoff ausgebildet wird. Lange Zeit ging man davon aus, dass sich im adulten Organismus das Gefäßendothel aus bereits ausdifferenzierten Endothelzellen regeneriert und auch die im Erwachsenen überwiegende Angiogenese von diesen Zellen ausgeht (Angiogenesis Assays 2006).

Endothelzellen werden früh in der Ontogenese aus mesodermalen Angioblasten gebildet.

Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass auch während der adulten Angiogenese endotheliale Vorläuferzellen, Mesangioblasten und multipotente, adulte Hämangioblasten beteiligt sind (Carmeliet 2003).

Während die Angiogenese wohl von metabolischer Nachfrage und mechanischen Belastungen (z.B. Stress durch Scherkräfte) reguliert wird, setzt sich die Vaskulogenese scheinbar zu einem Zeitpunkt in Gang, wo der Embryo noch durch Diffusion adäquat versorgt werden kann (Folkman 1992, Risau 1997).

Aus diesem Grund werden einmalige Stoffwechselforgänge mit der Vaskulogenese in Zusammenhang gebracht.

In der Literatur finden sich Beschreibungen von Angioblasten, welche ihnen die Form von mesenchymalen Zellen zuschreiben. Es wird davon ausgegangen, dass Angioblasten migratorisch hochaktiv und invasive, „prävasculäre“ endotheliale Zellen sind (Noden 1991). Angioblasten werden für zahlreiche angiogenetische Prozessen im Embryo verantwortlich gemacht:

Vaskularisierung des Kopfmesenchyms (Noden 1991), des embryonalen ZNS (Kurz 1996), der Extremitäten (Feinberg 1991) oder des Koronarplexus des Herzens (Bogers 1989, Mikawa 1992).

Eine Pluripotenz von Angioblasten ist in Anbetracht ihrer Fähigkeit zur Bildung unterschiedlichen Gewebes, wie z.B. Endokard und extraembryonaler Gefäße (Coffin 1991) wahrscheinlich. Unklar ist, ob Angioblasten nur während, bzw. kurz nach der Gastrulation entstehen, oder auch in der weiteren Entwicklung, bzw. sogar im erwachsenen Organismus eine Rolle spielen. Unter Gastrulation versteht man die während der Embryogenese eintretende Einstülpung und Faltung des Keimes, bei der die Gastrula (Becherkeim) entsteht, bestehend aus Ektoderm und Entoderm, später auch Mesoderm (Roche, Lexikon der Medizin).

In der Embryonalentwicklung hat die Vaskulogenese ihren Ursprung in der Ausbildung von Blutinseln aus dem extraembryonalen Mesoderm des Dottersackes. Blutinseln sind Haufen von Epitheloidzellen, von welchen sich die Äußeren zu Angioblasten, und die Inneren zu primitiven Zellen der Hämatopoese entwickeln. Diese gemeinsame Abstammung aus Blutinseln hat zu der Hypothese geführt, dass Blutzellen und Endothelzellen von einer gemeinsamen Population embryonaler Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, abstammen (His 1900, Murry 1932, Sabin 1917).

Die Tatsache, dass Endothelzellen und wenigstens ein Teil der hämatopoetischen Zellen eine Vielzahl gemeinsamer Oberflächenstrukturen gemeinsam haben, unterstützt diese Vermutung (Pardanaud 1987, Labastie 1986, McNagny 1997, Baumhueter 1994, Wood 1997, DeLisser 1994, Kabrun 1997, Yano 1997, McGann 1997).

Während der extraembryonale Gefäßplexus durch Vereinigung von Angioblasten benachbarter Blutinseln geformt wird, erscheinen Angioblasten innerhalb des Embryos entlang der vorderen intestinalen Pforte und entlang der Außenkanten der Somiten. Hier bilden sie die Herzschräuche und verbinden sich zur dorsalen Aorta und den großen Gefäßen des Körpers (Coffin 1991).

Im Gegensatz zu den extraembryonalen Angioblasten entwachsen die intraembryonalen Zellen aus dem Mesoderm, ohne die Begleitung von hämatopoetischen Zellen (Dieterlen-Lievre 1987). Der Grund hierfür ist noch nicht vollständig verstanden.

Angioblasten sind im Embryo weit verbreitet. Es gibt wenige Gewebe in denen sie nicht vorkommen, wie in Knorpel und Epithel (Pardanaud 1987, Noden 1991).

Organe, die endodermalen Ursprungs sind, oder in enger Nachbarschaft zu diesem entstehen, besitzen ein autochthones Kontingent an Angioblasten.

Organe, die aus somatopleuralem Mesenchym erwachsen, wie die Extremitäten, werden von Angioblasten aus dem Rumpf kolonisiert (Pardanaud 1995).

Als Grund hierfür wird die Armut an Angioblasten in somatopleuralem Mesoderm diskutiert. Es stellt sich die Frage, ob sich Angioblasten in einem gegebenen Organ aus fortdauernd pluripotenten Mesenchymzellen entwickeln, oder bereits vor der Entstehung des jeweiligen Organs im Mesoderm vorhanden sind.

Werden Angioblasten in ein Gefäß integriert, oder bilden sie ein Gefäßlumen, scheinen sie vorübergehend ihre migratorischen Fähigkeiten zu verlieren und differenzieren sich zu den eher „sesshaften“ Endothelzellen. Kommt es durch bestimmte Reize zur Angiogenese, kehrt sich dieser Prozess wieder um. Die sog. angiogenetischen Angioblasten lösen sich von der Wand um einen neuen Gefäßspross zu formen, können aber auch ins Gewebe migrieren.

Der genaue Unterschied zwischen den angiogenetischen und vaskulogenetischen Angioblasten ist noch nicht genau bekannt. Es scheint nur so, als ob die Fähigkeit der Endothelzellen zur Differenzierung mit dem Alter abnimmt (Risau 1995).

## **2.4.2 Definitionen der Stamm- und Progenitorzellen**

Als Stammzellen bezeichnet man die Zellen, welche in unserer Knochenmark oder sonst im Gewebe gebildet werden und bei Bedarf die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern und sich uneingeschränkt und undifferenziert zu vermehren. Sie sind in der Lage Tochterzellen zu produzieren und Gewebe zu erneuern.

Während der Embryogenese bildet der Zellhaufen der Blastozyste drei primäre Keimbahnen, Endoderm, Mesoderm und Ektoderm.

Aus diesen drei Keimblättern entwickeln sich alle fetalen Anlagen (Neuringer 2004).

Bei den Stammzellen unterscheidet man zwischen:

- Totipotenz: Fähigkeit zum Einen die plazentazugehörige Trophoblastenhülle zu generieren, zum Anderen einen vollständigen Embryo zu formen.
- Pluripotenz: Die embryonalen Stammzellen bilden, außer o.g. Trophoblastenhülle, sämtliche Zellarten.
- Omnipotenz: Die omnipotenten Stammzellen sind in der Lage alle gewebsspezifischen Zellen eines Organverbandes zu erneuern.

West und Daley modifizierten in ihren Versuchen die Kulturbedingungen von embryonalen Stamm- und Keimzellen durch Zugabe eines Differenzierungs-Inhibitors (leukemia inhibitory factor) und schafften es so die Pluripotenz der Stammzellen zu konservieren. Theoretisch bergen embryonale pluripotente Zellen in sich eine schier unbegrenzte therapeutische Vielfalt (West 2004, Daley 2003).

Die Gewinnung und Verwendung von embryonalen Stammzellen ist ethisch und somit auch gesetzlich problematisch, jedoch ist die weitere Erforschung dieser Stammzellen von großer Wichtigkeit angesichts des hohen therapeutischen Potentials und auch dringend notwendig im Hinblick auf die zahlreichen offenen Fragen, wie Oberflächenstrukturen und Histokompatibilität, Gewinnung der Stammzellen und Kulturbedingungen (Aarif 2005, Sylvester & Longaker 2004, Donovan & Gearhart 2001).

Eine hohe Tumorbildungsrate der embryonalen Stammzellen könnte jedoch eine wesentliche Einschränkung ihrer Anwendung bedingen (Mailänder 2005).

Lange Zeit war die einschlägige Lehrmeinung, dass adulte Stammzellen hauptsächlich für den Erhalt der Zellpopulation in erwachsenem Gewebe, für Selbsterneuerung und für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase verantwortlich sind.

Die terminale Differenzierung einer Stammzelle zur Gewebszelle folgte, so dachte man, linear einem vorgegebenen Weg und galt als irreversibel (Krause 2002).

Neuere Forschung widerspricht diesem grundsätzlichen Verständnis adulter Stammzellen. Die Ergebnisse zeigten, dass das Knochenmark nicht nur „Zellspeicher“ für Stammzellen der Hämatopoese ist, sondern auch Ursprung von Progenitorzellen (Krause 2002), welche sich in vivo vor allem zu Endothelzellen (Rafii 1995, Asahara 1997, Yamada 2004), in geringerem Maß zu Epithelzellen (Krause 2001, Okamoto 2002, Kotton 2001, Suratt 2003, Abe 2004, Yamada 2004, Spencer 2005), mesenchymalen Stammzellen (Sata 2002, Rochefort 2005), Hepatozyten (Lagasse 2000), gestreiften (Ferrari 1998), glatten (Hillebrands 2001) und

Herzmuskelzellen (Orlic 2001), sowie Fibroblasten, Myofibroblasten (Pereira 1995, Epperly 2003) und Nervenzellen (Eglitis 1997, Mezey 2000) differenzieren.

Was die o.g. Differenzierung der Stammzellen zu somatischen Zellen betrifft, so demonstrieren neuere Daten, dass sich sowohl neuronale, als auch Muskelzellen (Jackson 1999) in Blutzellen zurückverwandeln können (Bjornson 1999).

### **2.4.3 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen, zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und zirkulierender Endothelzellen**

Obwohl seit der Entdeckung endothelialer Progenitorzellen (endothelial progenitor cells, EPC) nicht einmal 10 Jahre vergangen sind, ist die Fülle an Erkenntnissen und Daten zu diesem Thema beachtlich und beruht auf der intensiven Arbeit und Forschung zahlreicher Gruppen (Mailänder 2005).

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) haben ein hochkomplexes Wirkungsspektrum innerhalb der Vaskulogenese, welche definiert ist als die Neubildung von Gefäßen aus sich „in situ“-differenzierenden Angioblasten. Dies heißt, dass EPC maßgeblich an der physiologischen, sowie pathologischen Gefäßneubildung im Rahmen der Wundheilung (Asahara 1999), bei ischämischen Prozessen (Asahara 1999, Kocher 2001, Kawamoto 2001, Kalka 2000, Zhang 2002), der Endothelialisierung von Gefäßprothesen (Peichev 2000, Shi 1998) oder geschädigten Gefäßarealen (Werner 2003), beim Tumorwachstum (Asahara 1999), sowie der retinalen (Grant 2002), lymphoiden (Salven 2003) und zerebralen (Zhang 2002) Vaskularisierung beteiligt sind. Diese Ergebnisse legten nahe ex vivo expandierte EPC auch zur gezielten Zelltherapie einzusetzen, um in ischämischen Arealen eine Neovaskularisation einzuleiten (Mailänder 2005).

In einem Hinterlauf-Ischämiemodell bei Mäusen konnte durch die Injektion expandierter Stammzellen die Zahl der Autoamputationen gesenkt werden. Außerdem ließ sich eine höhere Kapillardichte und ein gesteigerter Blutfluss dokumentieren (Kalka 2000).

Nach Verabreichung expandierter EPC bei Ratten mit ischämischem Myokarddefekt, differenzierten sich die Stammzellen zu reifen Endothelzellen im infarzierten Areal. Ebenfalls nahmen die EPC einen positiven Einfluss auf Neovaskularisation und kardiale Funktionsparameter (Kawamoto 2001).

Die Weiterentwicklung der Therapie mit EPC wird sich vor allem mit der Optimierung von Reinigung und Expansion der Stammzellen, sowie deren Transdifferenzierungspotential beschäftigen.

Unter Transdifferenzierung versteht man die Fähigkeit einer adulten Stammzelle, welche sich in speziellen Nischen eines Organs befindet und differenzierte Funktionszellen desselben hervorbringt, sich in reife Zellen eines anderen Organs zu verwandeln (Mailänder 2005).

Aktuell sind noch Fragen offen bezüglich der Verfügbarkeit endothelialer Stammzellen oder inwiefern physiologische Parameter, wie Alter und pathologische Prozesse, wie Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie, autologe EPC in ihrer Funktion beeinflussen.

Neuere Ergebnisse von Moldovan und Asahara belegen außerdem eine Beteiligung von EPC an der Rekanalisation und Vaskularisation vor allem venöser Thromben (Moldovan und Asahara 2003).

Eine sehr interessante Feststellung, wo doch bekanntermaßen Thromben die häufigste Ursache für eine Gewebsischämie sind. Während die Fibringerinnsel, welche das Gefäß verlegen, zunächst von Monozyten und Makrophagen lysiert werden, kleiden die EPC anschließend die neuentstandenen Kanäle innerhalb des Thrombus aus und garantieren durch ihre weitere Organisation den fortlaufenden Blutfluss.

Diese neuen Erkenntnisse bahnen den Weg für eine therapeutische Manipulation der Organisation von Thromben durch Erhöhung der Konzentration von Makrophagen, Monozyten und EPC im Blut.

Endotheliale Progenitorzellen entstehen, ebenso wie Stammzellen der Hämatopoese, im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem Hämangioblasten. (Flamme und Risau 1992).

EPC können sich zu reifen Endothelzellen differenzieren, von denen sie sich funktionell wie phänotypisch unterscheiden.

Zirkulierende EPC tragen in vivo zu Vaskulogenese und Gefäßhomöostase bei (Khakoo 2005).

Reifen Endothelzellen im peripheren Blut hingegen wird keine zentrale reparative Funktion zugeschrieben. Ihr Vorkommen erklärt man sich durch Abschilferungen des Gefäßendothels nach Schädigungen jeglicher Art.

Unter bestimmten Bedingungen, zu denen inflammatorische Reize (Rafii 2000, Bull 2003) oder vaskuläre Insulte, wie aortokoronare Bypässe oder Verbrennungen (Gill 2001) zählen, werden EPC aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt.

Innerhalb der Familie der Wachstumsfaktoren ist der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) der ausschlaggebendste Stimulus für Vaskulogenese und Angiogenese (Carmeliet 1996, Ferrara 1996, Shalaby 1995).

In Versuchen an Mäusen (Asahara 1997) und später auch an Patienten konnte gezeigt werden, dass durch VEGF-Gentransfer bei kritischer Ischämie der Extremitäten (Kalka 2000) und bei Myokardischämie (Kalka 2000), VEGF seinen Beitrag zur Neovaskularisation via

EPC-Ausschwemmung aus dem Knochenmark leistet. Eine ähnliche EPC-Freisetzung wurde im Zusammenhang mit G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (Gehling 2005) und SDF-1 (stromal derived factor) beobachtet (Peichev 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zirkulierende EPC Einfluss nehmen bei myokardialer Ischämie und Infarkt, Extremitätenischämie, Wundheilung, Atherosklerose, Instandhaltung des Endothels und Tumervaskularisierung (Khakoo 2005).

In Herzinfarktmodellen bei der Ratte wurde durch Transplantation von EPC ein verminderter fibrotischer Umbau des infarzierten Areals, sog. „Remodeling“, festgestellt, einhergehend mit stärkerer Vaskularisierung und verbesserter linksventrikulärer Herzfunktion als bei Kontrolltieren (Kocher 2001, Kawamoto 2001).

Anschließend durchgeführte klinische Studien testeten den Effekt von EPC auf Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit ähnlich positiven Ergebnissen (Stamm 2003, Assmus 2002).

Des Weiteren ließen kürzlich veröffentlichte Arbeiten vermuten, dass aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen, inklusive EPC, zur Sanierung von defektem Lungengewebe bei bakterieller Pneumonie beitragen und dass hohe EPC-Level im Blut assoziiert sind mit einer guten vaskulären Funktion, bzw. weniger Dysfunktion in der Lunge (Yamada 2005).

Auch bei pulmonaler Hypertonie gibt es Daten für deren Bedeutung in der Pathogenese und im Verlauf der Erkrankung.

## **2.5 Epithel im Fokus des akuten Lungenschadens**

### **2.5.1 Epithelien im Respirationstrakt (aus Benninghoff, 2003)**

Der Begriff Epithel (epi, gr.: auf; thele, gr.: Brustwarze) leitet sich historisch von dem Gewebe ab, das der Lippe mit ihren Bindegewebepapillen („Warzen“) aufliegt und im Bereich des Lippenrots die in den Papillen enthaltenen Blutkapillaren durchscheinen lässt. Daraus ergibt sich auch die heute gültige Definition des Epithels als Grenzgewebe, das die Oberfläche des Körpers bedeckt und seine inneren Hohlräume und Gangsysteme auskleidet.

Epithelgewebe, das die Körperoberfläche, Körperhöhlen und innere Oberflächen weitlumiger Hohlorgane bedeckt, wird Oberflächenepithel genannt. Davon unterschieden wird das Epithel von Drüsen (Drüsenepithel), Ausführungsgängen (Gangepithel) und von Sinnesorganen (Sinneseithel).

Exoepithelien stehen direkt oder über Gangsysteme (u.a. des Atem- und Verdauungssystems) mit der Außenwelt in Kontakt.

Endoepithelien kleiden innere Kompartimente aus wie Blutgefäße (Gefäßendothel) oder Körperhöhlen (Mesothel), welche nicht mit der Außenwelt in Verbindung stehen.

Epithelien entstehen aus allen Keimblättern: Mesoderm (u.a. Epithelien der Blutgefäße, Körperhöhlen, Nierentubuli und inneren Geschlechtsorgane), Endoderm (u.a. Epithelien von Rumpfdarm und unteren Atemwegen), Ektoderm (u.a. Epidermis, Brust- und Speicheldrüsenepithel, Epithelien des Innenohrs) und Neuroektoderm (u.a. epitheliale Auskleidung der Hirnventrikel, Pigment-, Ziliar- und Irisepithel des Auges).

Das Atemsystem, bzw. der Respirationstrakt des Menschen wird in die oberen Atemwege (Nasen-Rachenraum) und unteren Atemwege (Kehlkopf, Luftröhre und Lungen) untergliedert. Wie bereits weiter oben erwähnt, ist das gesamte Atemsystem mit Epithel ausgekleidet, welches eine Barriere-, Transport- sowie Sekretionsfunktion einnimmt. Folgt man dem Weg der eingeatmeten Luft, stößt man zunächst auf „äußere“ Haut im Vestibulum nasi. Das mehrschichtige verhornte Plattenepithel geht im Limen Nasi in das mehrreihige Flimmerepithel über, welches bis auf die Pars olfactoria die gesamte Haupthöhle der Nase und den Nasopharynx auskleidet. Die Schleimhaut der Nasennebenhöhlen entspricht prinzipiell der der Nasenhöhle.

Der Nasopharynx geht seitlich und hinten fließend in den Oropharynx über, welcher in Fortsetzung der Mundschleimhaut aus einem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel aufgebaut ist.

Der Kehlkopf (Larynx) repräsentiert eine Übergangszone der Pharynxschleimhaut (mehrschichtig unverhornt) zur Schleimhaut des unteren Respirationstrakts.

Die inneren Schichten von Trachea und Hauptbronchien werden unscharf in eine Tunica mucosa und eine darunterliegende Tunica submucosa gegliedert. Das Epithel ist ein mehrreihiges kinezilientragendes Säulenepithel (Flimmerepithel). Neben eingewanderten immunkompetenten Zellen enthält das Epithel sechs weitere Zelltypen. Außer der kinezilientragenden Zelle, die am häufigsten vorkommt, findet man Becherzellen, Basalzellen, endokrine Zellen, Bürstenzellen und Intermediärzellen.

Die Luftwege der Lunge werden durch traktale Teilung über 23 Generationen von dem reich verzweigten Bronchialbaum gebildet, der in einen proximalen, konduktiven, nur luftleitenden Abschnitt, 1.-16. Generation, und in einen distalen, gasaustauschenden Abschnitt, 17.-23. Generation unterteilt wird. Die Schleimhaut des konduktiven Teils wird, wie in den Hauptbronchien von einem mehrreihigen Flimmerepithel gebildet. Es kommen hier zahlreiche Becherzellen und Bronchialdrüsen vor, welche ein seromuköses Sekret produzieren. In den terminalen Verästelungen des Bronchialbaums, den Bronchioli, ist das Flimmerepithel einreihig säulenförmig bis kubisch.



Drüsen fehlen ganz und die Becherzellen nehmen zur Peripherie hin ab. Sie werden in ihrer sekretorischen Funktion zusehends von sog. Clara-Zellen ersetzt.

Schließlich betrachten wir noch das Alveolarepithel, welches Bestandteil des Inter-alveolareseptums ist und somit maßgeblich Anteil am Gasaustausch in der Lunge nimmt. Dieses Epithel differenziert sich in den terminalen Lufträumen zu zwei Zelltypen, den Alveolarepithelzellen und den Pneumozyten Typ I und Typ II. Die Alveolarepithelzellen Typ I nehmen den Platz der Deckzellen in den Inter-alveolaresepten ein. Zwischen diese sind Alveolarepithelzellen vom Typ II eingefügt, die der Zahl nach etwas häufiger sind und 16 % der Gesamtzellzahl der Inter-alveolaresepten ausmachen. Sie weisen einen hohen Zellstoffwechsel auf und produzieren vor allem Phospholipide und die größte Menge der Surfactantlipoproteine, die gemeinsam den Surfactant bilden, den essenziellen oberflächenaktiven Film der Alveolen.

## 2.5.2 Progenitorzellen und Stammzellen im Respirationstrakt

Manche Organe, wie Haarfollikel, Blut und Darm, unterstehen einem stetigen Wandel, welcher mit der kontinuierlichen Erneuerung ihres Gewebes einhergeht. Hier finden sich adulte Stammzellen, welche morphologisch noch nicht spezialisiert sind, sich relativ langsam teilen und in sog. „Nischen“ zu finden sind. Diese Nischen sind Stellen im Gewebe, welche sich durch eine gute Gefäß- und Nervenversorgung auszeichnen und daher besondere regulatorische Möglichkeiten für die Stammzellen bereithalten. (Fuchs 2004, Lanza 2006)

Die Lunge ist dagegen ein Organ, welches sowohl über langsame, als auch schnelle Reparaturmechanismen verfügt. Diese Eigenschaft ist von eminenter Bedeutung, da unsere Atemwege in einzigartiger Weise einer konstanten Belastung durch Noxen und Pathogene aus der Umgebungsluft ausgesetzt sind. Eine schnelle Antwort auf Zellschäden und lokale Immunzytokinproduktion ist hier für den Organismus zwingend notwendig.

Zahlreiche Modelle untermauern die Vorstellung, dass sich die verschiedenen Regionen des Respirationstraktes – Trachea und große Bronchien einerseits und distale Bronchioli und Alveolen andererseits – unterschiedlicher Strategien und Stammzellen bedienen, um die Gewebsintegrität aufrechtzuerhalten und Schäden zu reparieren (Rawlins 2006).

Ein beliebtes Modell zur Simulation eines Lungenschadens ist die Zerstörung der Clara-Zellen durch Naphtalin (Lawson 2002).

Nach zwei bis drei Tagen beginnt die Zellproliferation, welche das Epithel nach zwei bis vier Wochen in den *status quo* zurückführt (Stripp 1995, Van Winkle 1995).

In den oberen Atemwegen, also Trachea und Hauptbronchi, gilt es als gesichert, dass Basalzellen als Stammzellen fungieren und die Clara-Zellen nach ihrem Naphtalin-induzierten Untergang ersetzen (Rawlins 2006).

In den unteren Atemwegen, wo keine Basalzellen vorhanden sind, geht man davon aus, dass sog. „variante“ Clara-Zellen (Clara<sup>V</sup>-Zellen), die aufgrund eines Enzymmangels nicht durch Naphtalin absterben, zum Wiederaufbau der Clara-Zellpopulation beitragen.

Diese Clara<sup>V</sup>-Zellen befinden sich in den Bronchien hauptsächlich in der Nähe neuroendokriner Zellen (Hong 2001, Stripp 1995), oder am bronchio-alveolo-duktalen Übergang (Giangreco 2002, Hong 2001, Stripp 1995).

Ob das Flimmerepithel zu den fakultativen Stammzellen gezählt werden kann, wird noch kontrovers diskutiert (Park 2005).

### **2.5.3 Epithelzelluntergang im akuten Lungenschaden: Überlebensfaktoren und Todesfaktoren**

Der akute Lungenschaden ist in der heutigen Zeit ein gehäuft auftretendes und vital bedrohliches Krankheitsbild.

Studien zu Outcome und Prognose der Krankheit erbrachten seit der Erstbeschreibung dieser sehr schweren Form des akuten Lungenversagens keine ermutigenden Ergebnisse.

Die Mortalität Betroffener liegt bei 30-50%, bei einer jährlichen Inzidenz von 1:1500 Personen (Bernard 1994, Petty 2003, Ware 2000).

Klinisch ist das „Akute Respiratorische Distress Syndrom“ (ARDS), eine schwere Form des „Akuten Lungenschadens“ (ALI), durch das rasche Auftreten einer meist intubationspflichtigen arteriellen Hypoxämie in Gegenwart bilateraler pulmonaler Infiltrate charakterisiert.

Im Anschluss an den resultierenden apoptotischen Gewebsuntergang entfacht sich ein fibroproliferativer Prozess, der zu einer extensiven Granulation des alveolären Raums führt (Polunovsky 1993).

Morphologisch besteht dieses Granulationsgewebe hauptsächlich aus Fibroblasten und endothelialen Zellen.

Im Gegensatz zu Patienten, welche an ARDS sterben, löst sich das Granulationsgewebe bei Überlebenden auf und der alveoläre Apparat kehrt in seinen ursprünglichen funktionellen Zustand zurück (Rotmann 1977).

Ein akuter Lungenschaden kann experimentell durch eine Reihe lokaler oder systemischer Faktoren ausgelöst werden, die zu einer heftigen Entzündungsreaktion und zu Zelluntergang in der Lunge führen.

Eine zentrale Rolle spielt dabei die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und die daraus resultierende massenhafte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, einschließlich derer aus der Hämostase und Fibrinolyse (Fuchs-Buder 1996, Ware 2001/2003, Sapru 2006) und aus dem Komplementsystem (Fosse 1998, Hamacher 1998). Untersuchungen der bronchioalveolären Lavage (BAL) von ARDS-Patienten zeigen einen Anstieg der absoluten Zahl von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen im Vergleich zu Patienten ohne dieses Syndrom (Hamacher 2006).

Polunovsky et al. zeigten in ihrer Studie 1993, dass die Lavagen von ALI-Patienten, im Gegensatz zu gesunden Kontrollpatienten, sowohl nach drei Tagen (frühe inflammatorische Phase) als auch nach zehn Tagen (alveoläre Reparatur nach akuter Entzündung) eine gesteigerte Fibroblastenproliferation vorwiesen. Verdünnt man die Lavagen, so nimmt die Fibroblastenproliferation in der frühen inflammatorischen Phase monoton ab, im Gegensatz zum biphasischen Verlauf der Wachstumskurve der Fibroblasten während der Reparaturphase. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass sich sowohl stimulierende, als auch inhibierende Faktoren in den Lavagen befinden.

Ein hierzu konkordantes Verhalten zeigten Endothelzellen: Lavagen von ALI-Patienten nach zehn Tagen (Reparaturphase) riefen bei Endothelzellen einen acht- bis zehnfach höheren Zelluntergang hervor als solche nach drei Tagen oder von Kontrolllavagen.

Da die Wiederherstellung eines suffizienten Gasaustausches nach einem akuten Lungenschaden von einer schnellen Beseitigung von Fibroblasten und Endothelzellen abhängt, wurde davon ausgegangen, dass sich während der Reparaturphase Signalstoffe am Alveolarepithel befinden, welche *in vitro* den Zelluntergang von Fibroblasten und Endothelzellen induzieren können. In Einklang mit dieser Fragestellung entdeckten Polunovsky et al. Peptide bei Patienten in der Reparaturphase, die bei Kontrollen oder in der frühen Entzündungsphase nicht vorhanden waren. Diese Peptide sind nicht mit TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor) identisch. Dennoch ist TNF- $\alpha$  bekannt dafür, *in vitro* Apoptose bei Endothelzellen hervorzurufen. Da Alveolarepithelzellen während der Entwicklung (Shoji 1989 Smith 1989) und nach Gewebeschäden (Adamson 1990, Everett 1990) eng mit Mesenchymzellen interagieren, stellten Wendt et al. 1994 die Hypothese auf, dass Alveolarepithelzellen den programmierten Zelltod in Mesenchymzellen, vorzugsweise während der Reparaturphase der Lunge, nachhaltig beeinflussen. Ihre Daten belegen, dass Alveolarepithelzellen vom Typ II Quelle einer Bioaktivität sind, welche die apoptotische Wirkung von TNF- $\alpha$  auf Endothelzellen inhibiert. Weder bei Fibroblasten, noch bei Makrophagen konnte unter gleichen Voraussetzungen ein solcher Effekt entdeckt werden (Wendt 1994).

Es ist anzunehmen, dass der TNF- $\alpha$ -bedingte, programmierte Zelltod von Endothelzellen das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von intrazellulären Komponenten und extrazellulären Induktoren ist (Wendt 1994).

TNF- $\alpha$  tritt schon ein bis zwei Stunden nach Beginn einer Entzündungsreaktion vermehrt auf und stimuliert Endothelzellen, unter anderem zur Expression von Adhäsionsmolekülen (Horgan 1993) und zur Bildung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN). TNF- $\alpha$  hat keinen direkten permeabilitätssteigernden Effekt *in vivo*, indessen besteht seine Wirkung in einem indirekt synergistischen Effekt bei der VEGF-bedingten Ödembildung (Claus 2003). Er stimuliert auch die Bildung von Interleukin-8 und den erst ca. 15 h später auftretenden späten Mediator HMGB 1 (High Mobility Group Box 1) aus der Gruppe der sogenannten Alarmine (Abraham 2000a).

VEGF ist ein sehr potenter Angiogenese- und Permeabilitätsregler und dürfte die vaskuläre Permeabilität um das rund 50000-fache stärker erhöhen als Histamin (Papaioannou 2006). Dennoch ist seine Rolle im Permeabilitätsödem und insbesondere auch im Höhenlungenödem nicht klar (Thickett 2001, Kaner und Crystal 2004, Carpenter 2005, Ware 2005, Kunig 2006, Godzich 2006). HMGB 1 aktiviert unter anderem Endothelzellen und führt zu deren eigener Produktion von TNF, IL-8, MCP-1, Plasminogenaktivator-Inhibitor und Gewebe-Plasminogenaktivator (Fiuza 2003) und ist eventuell spät noch für die Prognose von Bedeutung. HMGB 1 ist beispielsweise durch cholinerge Agonisten z.B. via den auf Makrophagen und Endothelzellen sitzenden  $\alpha 7$ - nikotinischen Acetylcholin- Rezeptor und somit auch durch Nikotin modulierbar (Fiuza 2003, Wang 2004, Wang 2003a).

Die Beobachtung, dass cholinerge Neuronen zum präzisen „Fein- Tuning“ die akute Inflammation inhibieren und z.B. via Vagusstimulation durch den  $\alpha 7$ -nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor posttranskriptionell TNF- Freisetzung verhindern (Borovikova 2000, Saeed 2005, van Westerloo 2005, Tracey 2002, Metz und Tracey 2005), dürfte eine der Brücken zu der Vielzahl von neuronalen Strukturen und entsprechenden Substanzen und deren noch weitgehend unbekannte Rolle in der Pathologie der Lunge sein.

Angiotensin Converting Enzyme II (ACE2) ist ein Schlüsselfaktor der Abwehrmechanismen rund um ARDS und ALI. ACE vermittelt über das Renin-Angiotensin-System (RAS), im besonderen via Angiotensin II (ATII), Vasokonstriktion, Hypertension und kardiale Hypertrophie, sowie durch Aktivierung von PMN („polymorphnuclear leucocytes“) und Endothelzellen das Entstehen einer Permeabilitätsstörung. ACE 2 gegenreguliert diese Funktion, senkt den Spiegel von AT II und begünstigt vermehrt gegenteilige Effekte, z.B. Vasodilatation und Hypotension (Imai 2008). Angiotensin II ist ein wichtiger Modulator des Fas-Liganden-Systems (FasL/ Apo-1) in der Lunge. Epithelzellen interagieren mit Angiotensin II via Angiotensin-II-Rezeptoren, welche *in vitro* notwendig für die Fas-vermittelte Apoptose von Alveolarepithelzellen sind (Wang 1999a).

Die SARS-Epidemie (severe acute respiratory syndrome) 2003 war Anlass für intensivierete Nachforschungen über die Entwicklung von ALI und ARDS.

Interessanterweise konnte ACE 2 als Rezeptor des SARS-induzierenden Coronavirus SARS-CoV in vitro identifiziert werden. Der Verlust von ACE2-Expression in mutierten Mäusen zeigte im Experiment eine gesteigerte Gefäßpermeabilität, verstärktes Lungenödem, Akkumulation neutrophiler Granulozyten und Verschlechterung der Lungenfunktion. Die Applikation von rekombinantem, katalytisch aktivem ACE 2, verbesserte die Symptome eines akuten Lungenschadens in Wildtyp- sowie ACE 2-knockout-Mäusen. Demnach spielt ACE 2 eine protektive Rolle im akuten Lungenschaden, ACE, AT II und der Angiotensin-1-Rezeptor (AT1R) hingegen tragen zu einer schwerwiegenderen Verlaufsform dessen bei (Imai 2005).

Die aktuelle Forschung postuliert zwei Hypothesen, welche Apoptose mit der Pathogenese der ARDS verbinden:

Die „neutrophile Hypothese“ und die „epitheliale Hypothese“ (Matute-Bello 2003).

Erstere besagt, dass die Apoptose neutrophiler Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung von Entzündungsprozessen im akuten Lungenschaden spielt (Cox 1994, Haslett 1994). Letztere versteht den Epithelzelluntergang während des ARDS als Folge apoptotischer Prozesse in Epithelzellen, welche durch lösliche Mediatoren wie den Fas-Liganden initiiert werden (Matute-Bello 1999, Hashimoto 2000).

Das Fas (CD95)/FasL (CD178)-System spielt eine zentrale Rolle im Epithelschaden während des ARDS. Fas ist ein Typ1 Membranoberflächenprotein, welches zur TNF-Rezeptorfamilie gehört (Itoh 1991). Der natürliche Ligand von Fas ist CD178, auch Fas Ligand (FasL) genannt, ein Typ 2-Membranprotein, welches es sowohl in membrangebundener als auch in gelöster Form gibt (Suda 1993 u. 1994, Tanaka 1995).

Der Fas-Ligand findet sich auf der Oberfläche zytotoxischer Lymphozyten, während seine lösliche Variante (sFasL) durch spezifische serinhaltige Proteinasen, wie die Matrix-Metalloproteinasen 3 und 7, von Membranen abgespalten wird (Powell 1999, Matsuno 2001). Der lösliche Fas-Ligand wird außerdem noch von aktivierten Monozyten gebildet, nicht aber von aktivierten Alveolarmakrophagen (Kiener 1997).

Die Interaktion von Rezeptor und Ligand führt zur Gruppierung eines zytoplasmatischen Proteinkomplexes, auch „death-initiating-complex“ (DISC) genannt, welcher Caspase 8 aktiviert, die erste einer ganzen Reihe von Proteasen, deren maximale Aktivität zur Apoptose führen (Itoh 1991, Muzio 1997, Tanaka 1998). Es kommt zu einer Aktivierung von Endonukleasen mit Spaltung nukleärer DNA und subsequentem Zelltod (Martin 2005).

Obwohl distale (DLEC) sowie proximale Lungenepithelzellen (PLEC) gleichermaßen Fas exprimieren, gehen nur die distalen Zellen in Apoptose, wenn sie mit dem Fas Liganden (rh-sFasL) in Kontakt kommen. Die unterschiedliche Sensitivität des Atemwegsepithels für FasL lässt auf einen Gradienten in der Empfänglichkeit des Gewebes für Apoptose schließen, welcher von proximal nach distal zunimmt (Nakamura 2004).

Des Weiteren induziert die Rezeptorbindung des FasL weder in distal noch in proximal gelegenen Lungenepithelzellen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Nakamura 2004).

Exogene proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , modulieren hingegen die Apoptose indem sie die Expression von Fas auf Zelloberflächen und von intrazellulären apoptoseassoziierten Proteinen regulieren. In diesem Sinne verstärken sie die Sensitivität des Atemwegsepithels für die Fas-vermittelte Apoptose (Nakamura 2004).

Die Apoptose von Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten sind zusammenhängende Ereignisse (Li 2004). Wird Fas oder TNF- $\alpha$  von Bronchialepithel gebunden, geht dieses in den programmierten Zelltod und sezerniert dabei Interleukin-8 und NF- $\kappa$ B (Hagimoto 1999).

Ihrerseits inhibieren diese Faktoren die Apoptose neutrophiler Granulozyten.

Im akuten Lungenschaden (ALI), bei ARDS und auch bei Lungenfibrose sorgen zirkulierende Neutrophile für die Ausschüttung von „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), (Stern 2003).

Sowohl HGF als auch „keratinocyte growth factor“ (KGF) sind potente Wachstumsfaktoren für Pneumozyten vom Typ II (Mason 1994).

Aus dieser Erkenntnis lässt sich ein positiver Einfluss von Neutrophilen auf den Reparaturprozess während eines akuten oder chronischen Lungenschadens ableiten (Li 2004).

Bronchioalveoläre Lavagen (BAL) von Patienten in frühen ARDS-Stadien vermindern in vitro die Zahl neutrophiler Zellen, die in die Apoptose gehen. Dieser Effekt verschwindet mit zunehmender Zeit und abnehmender Entzündung beim ARDS (Matute-Bello 2000).

Dieser inhibitorische Einfluss der BAL auf das apoptotische Verhalten neutrophiler Granulozyten wird von den proinflammatorischen Zytokinen „granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF) und „granulocyte/macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF), sowie vermutlich IL-8 und IL-2 vermittelt (Matute-Bello 2003). Höhere Konzentrationen von GM-CSF wurden vermehrt in den bronchioalveolären Lavagen überlebender Patienten gefunden (Matute-Bello 2000).

Sookhai et. al untersuchten ob ein verstärkter Untergang neutrophiler Zellen einen Einfluss auf die Pathogenese der ALI hat und kamen zu dem Schluss, dass höhere Apoptoseraten vorteilhaft für den Betroffenen sind (Sookhai 2000).

## 2.6 Acute Lung Injury und ARDS

### 2.6.1 Definitionen

Nach heutigem Verständnis ist das ARDS, „Acute Respiratory Distress Syndrome“, die schwerwiegendste Verlaufsform der „acute lung injury“ (ALI). Diese Definition, einhergehend mit einer strengen Unterscheidung zwischen ARDS und ALI, wurde 1994 von der American-European Consensus Conference (AECC) etabliert, sowie ein Katalog von Kriterien welcher die Diagnose und Behandlung des ARDS optimiert.

Die AECC beschreibt die ALI als ein Syndrom mit Entzündungsreaktion und erhöhter Permeabilität, welche mit einem typischen Muster aus klinischen, radiologischen und physiologischen Abnormalitäten einhergeht und nicht durch eine linksatriale oder pulmonale Hypertonie erklärt werden kann. Dennoch tritt sie häufig in Kombination mit dieser auf.

Die ALI ist sehr oft assoziiert mit Sepsis, Aspiration, Pneumonie, Polytrauma, seltener mit kardiopulmonalem Bypass, Massentransfusion, Fettembolien, Pankreatitis u.a. (Bernard 1994).

Definition	Referenz
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acute onset, bilateral infiltrates on chest radiography.</li> <li>2. Pulmonary-artery wedge pressure of &lt; 19 mm Hg.</li> <li>3. Absence of clinical evidence of left atrial hypertension.</li> <li>4. Acute lung injury considered present if PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> is ≤ 300 mm Hg and the ARDS subset was defined with a more severe oxygenation deficit, PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ≤ 200 mm Hg.</li> </ol>	<p>Bernard and colleagues, 1994 (American European Consensus Conference Definition)</p>

**Tabelle 1: Die gängigste Definition des ALI und des ARDS**

### 2.6.2 ARDS: Eine Krankheit mit hoher Mortalität: Epidemiologie und Geschichte

Erstmalige Erwähnung fand das Syndrom in einem Artikel über „Acute respiratory distress in adults.“ (Ashbaugh 1967). Hier wurden 12 Patienten beschrieben, welche alle ähnliche Symptomkomplexe aufwiesen: akut einsetzende schwere Tachy- und Dyspnoe, refraktäre Zyanose, verminderte respiratorische Compliance und diffuse alveoläre Infiltrationen in den Röntgenthoraxaufnahmen. 5 dieser 12 Erkrankten konnten durch mechanische Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) am Leben erhalten werden. 1971 wurde ein exakter Kriterienkatalog zur Feststellung des ARDS veröffentlicht (Ashbaugh und Petty 1971). Dieser wurde bis 1988 ohne nennenswerte Veränderungen beibehalten und erst 1994 durch die Arbeit der American-European Consensus Conference abgelöst.

Obwohl die ARDS eine eher seltene Ursache des akuten Atemwegsversagens auf Intensivstationen ist, lediglich 7% (Roupie 2000), und ihre Inzidenz bei 66 Fälle/100000 Einwohner/Jahr (Petty 2003) liegt, ist die weitere Erforschung dieses Krankheitsbildes von enormer Bedeutung angesichts einer nach wie vor hohen Letalität von 30 bis über 50% (Krafft 2001).

### 2.6.3 Klinik und Auslöser

Klinisch imponiert immer ein schweres Krankheitsbild, das innerhalb von Stunden zur Beatmungspflichtigkeit führen kann, häufig jedoch auch während der Beatmung entsteht. Ursache ist eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, welche durch direkte Lungenschädigung (Aspiration, Pneumonie, Lungenkontusion, Inhalationsverletzung, Schäden bei zu hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Verlauf maschineller Beatmung) bedingt wird, als auch durch indirekte Schädigung bei primär extrapulmonalen Prozessen (Schock jeder Genese, Sepsis, Polytrauma, Verbrennungen, disseminierte intravasale Gerinnung). ARDS zeichnet sich biologisch durch eine erhöhte Permeabilität der alveolar-kapillären Membran aus. Funktionell liegt ein diffuser transmuraler alveolärer Zellschadenvor, mit Zerstörung zweier Barrieren, der endothelial-interstitiellen (d.h. „endothelialen“) und interstitiell-alveolären (d.h. „epithelialen“) Barriere (Steinberg 1994). Daraus resultiert eine Überflutung der Alveolarräume mit einem inflammatorischen Exsudat, welches so proteinreich wie Blutplasma sein kann. Eine nicht-selektive Schrankenstörung mit einem Übertritt von Proteinen von über 60 kD Molekulargewicht entsteht, welche unter anderem auch eine Inaktivierung des Surfactant bewirkt (Petty 2003b).



#### 2.6.4 Pathogenese

Die ARDS verläuft typischerweise in vier Phasen:

(aus Lehrbuch der Inneren Medizin, Renz-Polster, H., 3. Auflage, 2004)

- Exsudative Phase: Der auslösende Schädigungsprozess führt zu einer gesteigerten Kapillarpermeabilität mit interstitiellem Lungenödem (Boyd 1984, Brigham 1982).
- Einstrom neutrophiler Granulozyten: Proteasen, Sauerstoffradikale und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt.
- Entzündungsreaktion mit kapillärem Leck: Es kommt zum „alveolar flooding“, also einem alveolären Lungenödem, was mit dem Einstrom eines proteinreichen Exsudates einhergeht. Konsekutiv kommt es zu einer Inaktivierung des Surfactant. Durch die erhöhte Wandspannung in den Alveolen entstehen Mikroatelektasen die zu einem intrapulmonalen Rechts-Links-Shunt mit Hypoxie führen (Bernard 1994).
- Stadium mit fibroproliferativem Umbau: Diese Phase des ARDS geht einher mit einer progressiven interstitiellen Fibrose, welche zu einer erhöhten Diffusionsstrecke der Alveolargefäße führt und somit zu einer zunehmenden Perfusionsverschlechterung mit respiratorischer Insuffizienz. Eine Restitutio ad integrum ist auch hier noch möglich.

Bis vor kurzem waren signifikante Verbesserungen im Outcome der Patienten lediglich auf höher werdende Standards in der Intensivmedizin zurückzuführen und weniger durch gewonnene Erkenntnisse in prospektiven randomisierten Studien. Trotz des bemerkenswerten Wachstums der Forschung welche sich mit ARDS beschäftigt, bleiben noch viele klinische Fragen offen, welche potentiell wichtige Beiträge zur Verbesserung von Morbidität und Outcome der Patienten mit ARDS leisten können (Bernard 2005).

Neuere Studien untermauern zunehmend die Bedeutung von standardisierten Beatmungsprotokollen. Im Jahr 2000 konnten Roy G. Bower und Mitarbeiter in einer großen Studie mit 861 Patienten erarbeiten, dass die Beatmung von Patienten mit ALI und ARDS mit niedrigen Tidalvolumina (6 ml pro kg/KG im Vergleich zu 12 ml, wie sie bis dahin Standard waren) die Mortalität um 22% senkt. Dies wirkt sich zudem positiv auf die Beatmungspflichtigkeit aus. Pathophysiologisch führen die geringeren Tidalvolumina zu weniger Scherkräften in der Lunge, welche maßgeblich an der Entzündungsreaktion beteiligt sind (Bower 2000). In Patienten, die mit niedrigen Tidalvolumina beatmet wurden, konnten auch geringere Blutspiegel von Interleukin 6 dokumentiert werden. Hohe IL-6-Spiegel werden mit Multiorganversagen in Verbindung gebracht, welches so oft den tödlichen Verlauf des ARDS ausmacht (Slutsky 2000).

Weiterführende Studien zeigten auch, dass bei Patienten mit ARDS hohe endexpiratorische Beatmungsdrücke zu einer besseren Oxygenierung und geringerer Mortalität führen (Briel 2010). ARDS-Patienten profitieren von hohen endexpiratorischen Drücken insofern, dass dem Kollabieren von Alveolen entgegengewirkt wird und damit die zyklischen Scherkräfte, die beim Wiederöffnen der Alveolen auftreten, verhindert werden. Dadurch wird die pulmonale Schädigung reduziert (Gattinoni 2008, Halter 2007, Toth 2007).

Ein weiteres Prinzip, um ventilationsbedingten Schäden entgegenzuwirken, ist das sog. „Recruitment Maneuver“. Ziel ist es, durch einen hohen kontinuierlichen Beatmungsdruck kollabierte Alveolen zu reexpandieren und durch hohe PEEP offen zu halten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Durchführung des „Recruitment Maneuvers“ bei ARDS-Patienten, die gleichzeitig mit niedrigem Tidalvolumen beatmet wurden, signifikant die Überlebenschancen auf Intensivstationen erhöht und die Beatmungspflichtigkeit im ersten Monat verringert (Xi 2010).

In Zukunft wird die optimale Abstimmung jener Strategien das Outcome der Patienten mit ARDS weiter verbessern.

## 2.7 Ziele der Studie

In unserer Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen experimentellen Studie die Transplantation ektopen Lungengewebes in die Rückenhautkammer der Maus als geeignetes Modell zur Untersuchung von Vaskularisierung des Parenchyms und zur Imitation eines akuten Lungenschadens etabliert werden (Promotionsarbeit N. Regelin 2011).

Das dort angewandte Modell soll in dieser experimentellen Studie erfolgreich fortgeführt und konsolidiert werden. Hauptziel des Versuchsaufbaus ist das in vivo-Studium des Homings epithelialer Progenitorzellen in nach Ischämie geschädigtem Lungengewebe.

In den Versuchsgruppen soll auf folgende Fragestellungen näher eingegangen werden:

- Im Charakterisierungsversuch geht es vornehmlich darum zwei verschiedene Ischämiezeiten, nämlich drei Stunden und eine Stunde, miteinander zu vergleichen:
  1. Verändert sich die Kapillardichte nach Ischämie und anschließender Reperfusion?
  2. Steigt die Schwere des Schadens, gemessen an der Kapillardichte, bei längerer Ischämiedauer?
  3. Steigt die Anzahl der Leukozyten im Gewebe nach Ischämie an? D.h. kann man eine hohe Leukozytenzahl mit einem schweren Schaden gleichsetzen?
  
- Die beiden Stammzellversuche sollen Aufschluss darüber geben, wie sich epitheliale Progenitorzellen nach einer dreistündigen Ischämie verhalten:
  4. Haben epitheliale Stammzellen eine signifikante Tendenz dazu in geschädigtes Gewebe zu wandern, bzw. „lockt“ der Ischämie-Reperfusionsschaden Stammzellen an?
  5. Gehen die Stammzellen bevorzugt in Lungengewebe, d.h. auch in nicht geschädigtes, oder ist die Verteilung zwischen Lungen- und Kammergewebe ausgeglichen?
  6. Wie verhält sich die Kapillardichte in Lungen- und Kammergewebe im Vergleich zum Ausgangswert mit bzw. ohne Ischämie?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Zur Durchführung des Reperfusionsmodells wurden C57Bl6-Mäuse aus hauseigener Inzucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) und transgene CD1 nu/nu Nacktmäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

Zum Aufbau der Rückenhautkammer und für die Entnahme des Lungengewebes wurden ausschließlich gesunde, geschlechtsreife Tiere gewählt im Alter von acht bis zehn Wochen und mit einem Gewicht von 20-30g.

Für den Zeitraum des Experiments (ca. 3-4 Wochen) wurden die Mäuse in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus in Einzelkäfigen gehalten.

Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Wasser wurden den Tieren uneingeschränkt bereitgestellt. Das Wohlbefinden der Tiere wurde bis zu mehreren Malen täglich kontrolliert.

Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt.



Abb 1: Eine C57/Bl-6 Maus

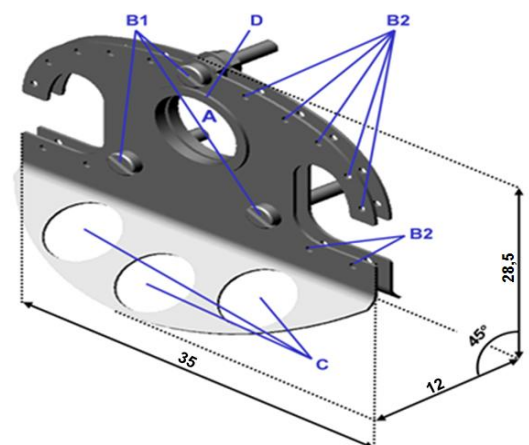
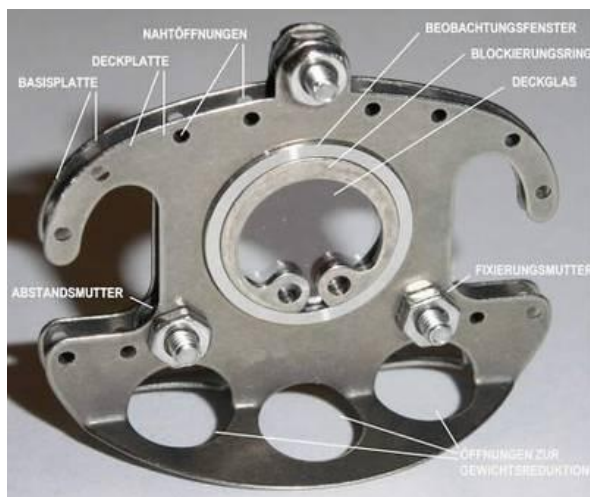


Abb 2: Eine CD1 nu/nu Nacktmaus

### 3.2 Etablierung der Technik zur Charakterisierung der Rückenhautkammertransplantation von Lungengewebe und dortigem Ischämie-Reperfusionsschaden des ektopen Lungengewebes

#### Modell Rückenhautkammer (aus Doktorarbeit M. Laschke 2002)

Als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der physiologischen Angiogenese transplantierten ektopen Lungengewebes diente die Rückenhautkammer bei C57/BL6-Mäusen und CD1 nu/nu-Mäusen, welche quergestreifte Skelettmuskulatur, subkutanes Gewebe und Haut enthält. Die erstmals von Lehr et al. [1993] beschriebene Rückenhautpräparation an der Maus ermöglicht die intravitalmikroskopische Untersuchung mikrozirkulatorischer Parameter am narkotisierten Versuchstier. Durch die intravenöse Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann dabei mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie sowohl die gesamte Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur beurteilt werden, als auch die Entwicklung neuer Blutgefäße innerhalb der sich in der Rückenhautkammer befindlichen Transplantate. Durch die Möglichkeit der repetitiven Untersuchung bietet diese Technik gegenüber anderen Mikrozirkulationsmodellen zudem den Vorteil, dass die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen schrittweise verfolgt und mit Hilfe eines entsprechenden Bildverarbeitungssystems anschließend quantifiziert werden kann.



**Abbildung 3 und 4: Perspektivische Ansicht einer Rückenhautkammer, die sich aus zwei durch Schrauben verbundene, spiegelbildlich konstruierte Titan-Rahmen zusammensetzt (Gewicht 4,5g).**

A = Beobachtungsfenster; B1 = Bohrungen mit Verbindungsschrauben; B2 = Bohrungen für Fixationsfäden; C = Materialausparungen zur Gewichtsreduktion; D = Kammerring zur Fixation des Deckglases (Maße in mm).

Zum Aufbau der Rückenhautkammer wird die Maus intraperitoneal anästhesiert (Ketanest®/Rompun®, 50 - 200 mg/kg Ketamin und 5 - 10 mg/kg Xylazin 0,1 ml/g Körpergewicht; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland).

Wenn die Maus nicht mehr auf Schmerzreize reagiert, kann mit dem Protokoll fortgefahren werden. Die Analgesie des Tieres testet man am effektivsten mit dem sog. „Zwischenzehenreflex“. Hierzu kneift man mit einer Pinzette in die interdigitale Haut. Fällt der Reflex negativ aus, d.h. die Maus reagiert nicht mit einem Zucken der betroffenen Extremität, wird mit der Haarentfernung begonnen (nur bei C57/BL-6).



**Abb. 5: Testen des Zwischenzehenreflexes mit einer Pinzette**

Ziel ist es, den Bereich der später die Kammer trägt von Haaren zu befreien. Hierzu bedient man sich in einem ersten Schritt der Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen), welche bereits einen Großteil des Fells entfernt. Das optimale Ergebnis erhält man mit anschließender chemischer Depilation (Pilca med Creme, Asid Bonz, Böblingen).



**Abb. 6: Elektrorasur einer BL-6 Maus**

Das freigelegte Hautareal wird mit warmem Wasser gereinigt und nachfolgend gründlich getrocknet. Dieser Schritt soll einer Auskühlung der betäubten Maus entgegenwirken. Nun wird das Versuchstier in Bauchlage gebracht und die gut verschiebliche Rückenhautfalte entlang ihrer Mittellinie angehoben. Mit jeweils einem Haltefaden (gewöhnliches Nähgarn) wird die dorsale Haut an ihrem kaudalen und kranialen Ende fixiert. Mit diesen wird die Maus am Stativ aufgehängt so dass sie parallel zum Boden schwebt. Um die Lordosierung und Belastung des Tieres in dieser Position zu verringern, kann ein Unterbau aus Kompressen von ventral stützen.



**Abb. 7: Aufhängung der Maus an einem Stativ**

Unter diaphanoskopischer Kontrolle wird nun zunächst der hintere der zwei Titanrahmen an seinem oberen Rand an vier Stellen mit der Rückenhaut vernäht (Bindfaden). Acht zu geben ist bei diesem Schritt auf die Unversehrtheit der großen Versorgungsgefäße, welche entlang der Schulterbasis verlaufen.

Mit einer Skalpellklinge präpariert man zwei kleine Löcher zum Durchtritt der Schrauben des hinteren Rahmens am ventralen Ende der Rückenfalte.

Ist dies geschehen, zeichnet man mit Permanent Marker entlang des Schattens des hinteren Rahmens einen Kreis, der dem späteren Fenster entspricht. Die Maus wird vom Stativ abgenommen und auf eine Korkplatte gelegt.

Diese bietet zum Einen den Vorteil der Wärmedämmung und zum Anderen den einer drehbaren Lagerung. Um auch im ventralen Bereich die Rückenhaut adäquat zu fixieren, kann man an beiden Schrauben je eine Gefäßklemme befestigen, welche die Haut auf die Unterlage drückt.

Unter dem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) wird nun im markierten Bereich ein Layer (Cutis, Subcutis, Haut- und Retraktormuskulatur, subcutanes Fettgewebe) der doppelten Rückenhaut abpräpariert. Dabei wird darauf geachtet, dass die Präparation mit



einem zirkulären Ausschnitt von etwa 15mm Durchmesser die Größe des eigentlichen Beobachtungsfensters (Durchmesser: 11mm) leicht überschreitet um eine Gewebekompression und die damit verbundene Beeinträchtigung der Blutversorgung nach Anbringen des vorderseitigen Kammerrahmens zu vermeiden. Ein Anfeuchten der freigelegten Subkutis mit steriler 0,9% NaCl – Lösung wirkt einer Austrocknung entgegen.



**Abb. 8: Präparation des Beobachtungsfensters**

Anschließend wird der vordere Teil der Rückenhautkammer angebracht und an den drei Punkten mit Stahlmuttern verschraubt.



**Abb. 9: Aufsetzen des vorderen Titanrahmens**

Der Abstand zwischen den beiden Rahmen beträgt 400 – 500  $\mu\text{m}$ . In einem vorletzten Schritt wird das Deckglas des Beobachtungsfensters auf den freipräparierten Hautmuskel aufgelegt, wo es durch Adhäsion haftet und mit einem Sprengling im Titanrahmen der Kammervorderseite fixiert (Abb. 9)



Auf diese Weise ist während des gesamten Versuchs ein freier Zugang zum Beobachtungsfeld möglich.

Abschließend werden vorderer und hinterer Titanrahmen mit der dazwischenliegenden Hautfalte mit 5.0 Vicrylfäden vernäht.

Der Versuch wird erst nach 48 bis 72h fortgesetzt um den Versuchstieren eine Erholungszeit von der Narkose zu gewähren, v.a. aber um in eine reizfreie Kammer implantieren zu können.



**Abb. 10: Fertige Rückenhautkammer**

### **Entnahme von Lungengewebe aus einer Spendermaus**

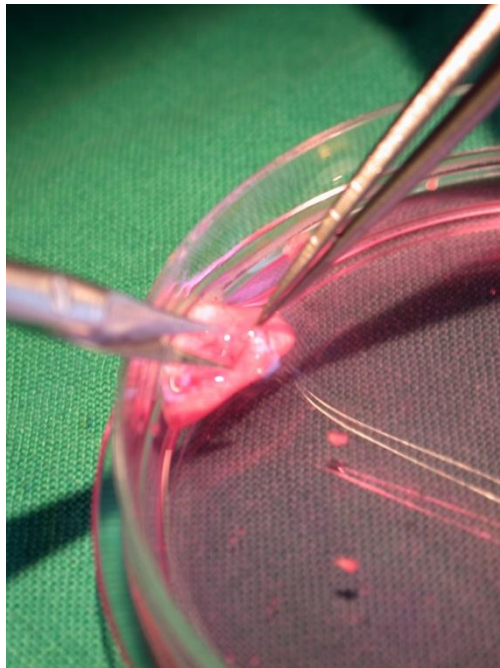
Die Spendermaus, welche gleicher Rasse, jedoch unterschiedlichen Geschlechts wie das Empfängertier sein sollte (Sex-Mismatch), wird nach o.g. Schema narkotisiert und an den Vorderläufen mittels Klebestreifen auf einer Korkplatte fixiert.

Das oben erwähnte „Sex-Mismatch“ soll in gegebenenfalls folgenden genetischen Untersuchungen eine Unterscheidung der Herkunft neu entstandenen Gewebes ermöglichen. Zunächst wird der Thorax entlang des Sternums eröffnet, wobei auf Unversehrtheit der parallel zum Sternum verlaufenden Ae. thoracicae internae zu achten ist. In einem nächsten Schritt wird die Trachea freipräpariert, mit einer Halteklemme fixiert und kranial dieser durchtrennt. Unter Zug löst man anschließend das gesamte Herz-Lungen-Paket aus dem Mediastinum.



**Abb. 11: Herz-Lungenpaket einer Spendermaus**

Das gesamte Resektat wird in eine Petrischale mit Nährlösung und Farbstoff (DMEM, Dulbecco's modified eagle medium, + 10% FCS, fetal calf serum, + Bisbenzimid) gegeben und unter mikroskopischer Sicht (Stereo – Operationsmikroskop Wild M650; Leitz, Schweiz) kann nun vorsichtig die Pleura visceralis abgelöst und mehrere ca. 1 mm<sup>3</sup> messende Lungen-Parenchymwürfel herausgeschnitten werden.



**Abb. 12: Präparation der Parenchymwürfel**

Mit einer Pinzette transferiert man diese in eine weitere Petrischale mit gleichem Inhalt nur ohne Farbstoff.

Die Parenchymwürfel sind nun fertig für die Implantation in die Rückenhautkammer der Empfängermaus.

### **Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer**

Da die Implantation der Lungenstücke in die Kammer ein sehr kurzer und wenig invasiver Arbeitsschritt im Protokoll ist, hat sich die Anwendung einer Inhalationsnarkose bewährt. Das schnelle An- und Abfluten des Narkosegases verringert die Betäubungsdauer des Versuchstieres über das Notwendige hinaus um ein vielfaches.

Initial wird die Maus hierfür mit einer Mischung aus Sauerstoff (1000ml/min) und Narkosegas (Isofluran 5%) in einem geschlossenen Gefäß beatmet, bis die Atemfrequenz auf < 60/min (visuelle Kontrolle) gesunken ist. Für die Dauer des Eingriffs führt man ihr über eine Maske 1,5 – 2% Narkotikum bei einem Sauerstoff - Zeitvolumen von 200ml/min zu.

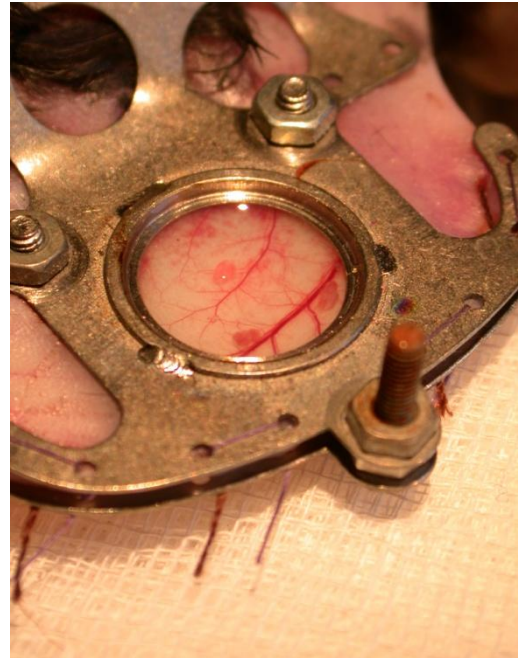


**Abb. 13: Inhalationsnarkose**

Für die Implantation wird die Maus in Seitenlage gebracht und die Rückenhautkammer auf Kompressen gelagert, so dass diese parallel zur Unterlage zu liegen kommt.

Mit einer speziellen Zange wird der Sprengring entfernt und das Deckglas zur erleichterten Ablösung mit einem Tropfen NaCl 0,9% angefeuchtet. Unter Zuhilfenahme von Nadel und Pinzette wird das Deckglas entfernt und das freiliegende Gewebe gründlich, aber vorsichtig mit steriler Kochsalzlösung gespült. Die verbleibende Flüssigkeit saugt man zum großen Teil mit einer Kompresse behutsam wieder ab.

Unter dem Mikroskop werden nun nacheinander drei Lungenwürfel mit einer Pinzette sanft, ohne das Gewebe arg zu komprimieren, aus dem Nährmedium der Petrischale entnommen und triangulär in der Nähe von Gefäßen in der Kammer positioniert.



**Abb. 14/15: Implantation der Lungenwürfel in die Rückenhautkammer**

Man achte darauf, dass die Lungenstücke größtmöglichen Abstand zueinander haben und dass die Gewebestücke sich in den oberen zwei Dritteln der Kammer befinden, da das Kammergewebe mit der Zeit dazu neigt nach unten zu sinken. Ein neues Deckglas wird mit einer Pinzette auf die Kammer gelegt. Es Bedarf unter Umständen einiger frustrierender Versuche bis man die richtige Dosierung an NaCl kennt, welche die Lungenstücke weder wegspült, noch Luftschlüsse in der Kammer duldet. Nach erfolgreicher Applikation des Deckglases wird der Sprengring wieder so angebracht, dass alle Transplantate gut sichtbar sind und nicht durch den Ring verdeckt werden.

### **Applikation von subkutanem Matrigel**

An Tag 3 nach Transplantation des ektopten Lungengewebes in die Rückenhautkammer wird der narkotisierten Maus (Isofluran 5%/O<sub>2</sub> 1l/min) je 100 µl Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) subkutan in die linksseitige Flanken-Subcutis injiziert. Die Applikation erfolgt 7 Tage vor Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens und sukzessiver SDKer-Injektion am Wirtstier zur Analyse der Angiogenese und zum Nachweis von Homing von SDKer in diese pro-angiogene Matrix.

### **Setzen des Ischämie-Reperfusionsschadens**

10 Tage nach Transplantation wird ein Ischämie-Reperfusionsschaden isoliert an einem der 3 ektopten Lungenwürfel gesetzt. Zu diesem Zweck wird ein Stempel an der oberen Fixierschraube der Rückenhautkammer angebracht. Über eine justierbare Stellschraube wird kontrolliert Druck auf



ein Silikonplättchen ausgeübt, welcher mittels eines darunter plazierten Gummiringes präzise die Blutzufuhr zu einem vollrevaskularisierten Lungenwürfel unterbricht. Notwendig ist die Applikation eines Drucks, welcher die zuführenden Gefäße verschließt, das umliegende Gewebe jedoch nicht darüberhinaus traumatisiert. Während der Ischämiezeit von 3h, bzw. 1h ist das Versuchstier anästhesiert (Isofluran 1-2%; O<sub>2</sub> 0,6l/min).

Nach der Ischämie wird die Blutzufuhr wieder geöffnet und eine Reperfusionszeit von ca. 1h gewährt.

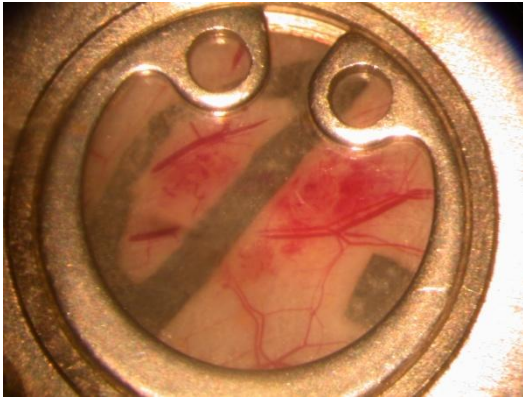


Abb. 16: Ischämie eines Lungenwürfels

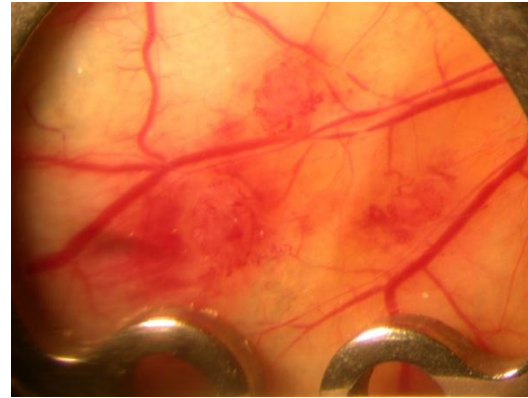


Abb. 17: Rückenhautkammer nach Ischämie

### Intravenöse Injektion (“Transplantation“) der epithelialen Progenitorzellen

Unmittelbar vor der Injektion epithelialer Progenitorzellen in die Wirtsm Maus werden die SP-DiIC<sub>18</sub> - (Molecular Probes, Leyden, The Netherlands) gelabelten Zellen geerntet und in EBM-2-Medium (EBM = endothelial basal medium) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml resuspendiert. Die Injektion der Zellen wird in Intraperitonealnarkose mit Xylazin/Ketamin nach mikroskopischer Darstellung i.d.R der rechten V. jugularis durchgeführt um eine direkte Sicht zur sicheren und vollständigen Zuführung der Zellen in jede Maus zu gewährleisten. Diese intravenöse Applikation der Stammzellen folgt 60 bis 120 Minuten nach Reperfusion des Lungenwürfels.

Die Kontrollgruppe erhält nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden keine Stammzellen.

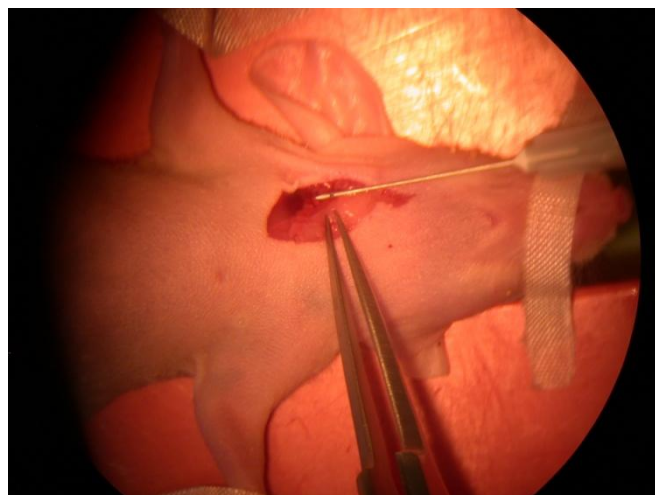


Abb. 18: Intravenöse Injektion der epithelialen Stammzellen unter operationsmikroskopischer Kontrolle

### **Sakrifizierung der Versuchstiere**

Um die Inkorporation der SDKer in den Organen der Maus nachzuweisen, werden die Tiere mit intraperitoneal verabreichtem Xylazin/Ketamin (min 1ml auf 30g KG) terminal anästhesiert.

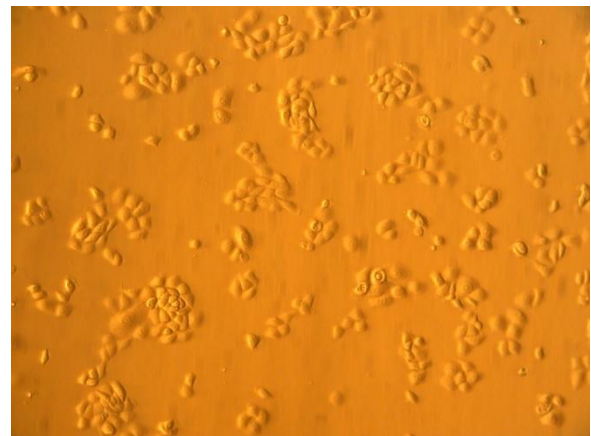
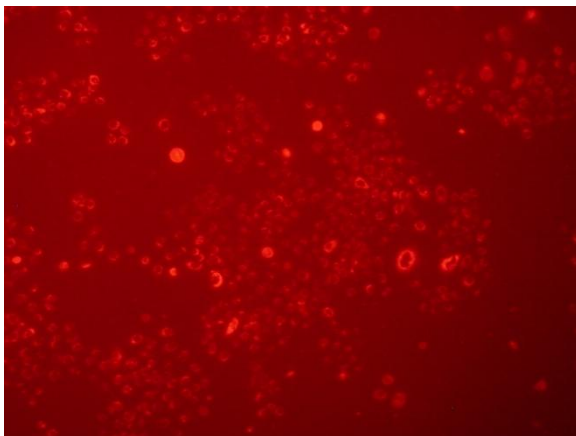
Die Tiere wurden drei (Versuchsgruppe 1) und acht Tage (Versuchsgruppe 2) nach SDKer-Injektion sakrifiziert. Die Tiere des Charakterisierungsversuchs wurden 24 Stunden nach Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens sakrifiziert. Post mortem wird zunächst die Rückenhautkammer abgebaut. Die Kammer wird nach Fadenmarkierung des ischämischen Lungenwürfels entnommen und in 10% PBS- gepuffertem Formalin fixiert. Nach Eröffnung von Thorax- und Abdominalhöhle werden den Wirtstieren Proben von Organen (Lunge, Herz, Milz, Leber und Niere) entnommen, ferner das subkutan applizierte Matrigel, und analog in Formalin aufbewahrt.

### **3.3 Epitheliale Progenitorzellen der Ratte (SDKer, „Skin derived keratinocytes“)**

Die Epithelialen Progenitorzellen stammen von Dr. Retro Caldelari und wurden entsprechend des Herstellerprotokolls in Keratinozyten-Wachstums-Medium CellNteck-03 kultiviert.

#### **Ex vivo Cell Tracer- Färbung der SDKer mit dem anionischen Sulfophenyl-Zellmarker SP-DilC<sub>18</sub>**

Im Vorfeld der in vivo Färbung werden die SDKer in Petrischalen mit CellINTec-03-Medium aufbewahrt. Die Zellen werden mit einem Phosphat Puffer (PBS) gewaschen und mit einem anionischen Sulfophenyl-Zellmarker SP-DilC<sub>18</sub> (Molecular Probes, Leyden, The Netherlands), einem Formaldehyd- und Aceton-resistenten Dil-Farbstoff, konzentriert auf 4 µg/ml Lösung in Standard PBS gefärbt. Die Färbung der adhärenenten Zellen bedarf einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C, gefolgt von weiteren 30 min bei 4°C. Im Anschluss werden die Zellen zwei Mal mit PBS gespült. Der Erfolg der Färbung und die Morphologie der Zellen wird vor der Implantation zwei Mal im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

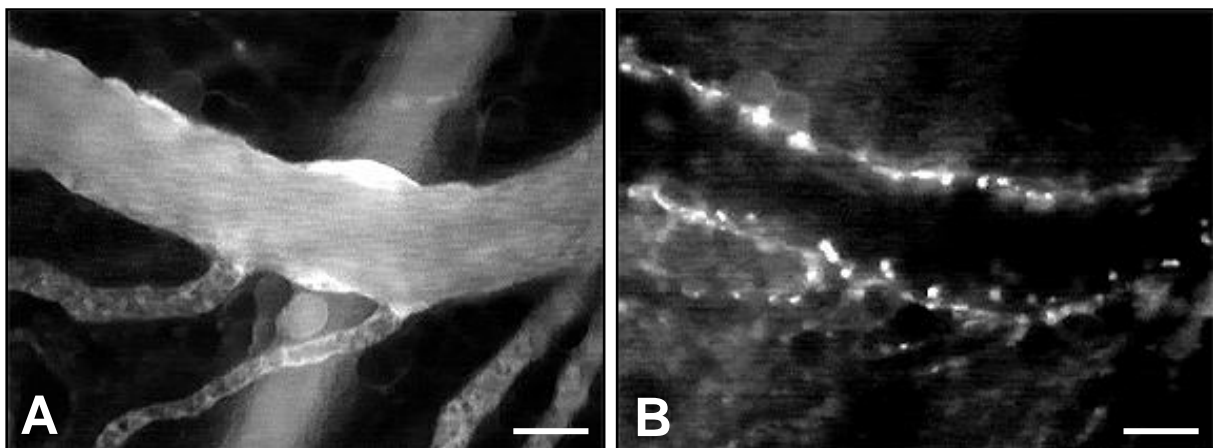


**Abb. 19 und 20: Epitheliale Stammzellen im Medium**

### 3.4 Intravitale Mikroskopie (aus Dr. Arbeit M. Laschke)

Die Revaskularisierung ektopen Lungengewebes wird mittels der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Technik eignet sich besonders gut zur Erfassung dynamischer Prozesse, wie beispielsweise der Angiogenese, weil damit die Möglichkeit der repetitiven, direkten Visualisierung der Mikrozirkulation innerhalb der Transplantate und die anschließende quantitative Auswertung verschiedener mikrohämodynamischer Parameter besteht. Somit ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie im Falle der vorliegenden Studie den indirekten Meßmethoden zur Beurteilung der mikrovaskulären Perfusion, wie zum Beispiel der Laser-Doppler-Flowmetrie (Tooke 1983, Ahn 1986), vorzuziehen.

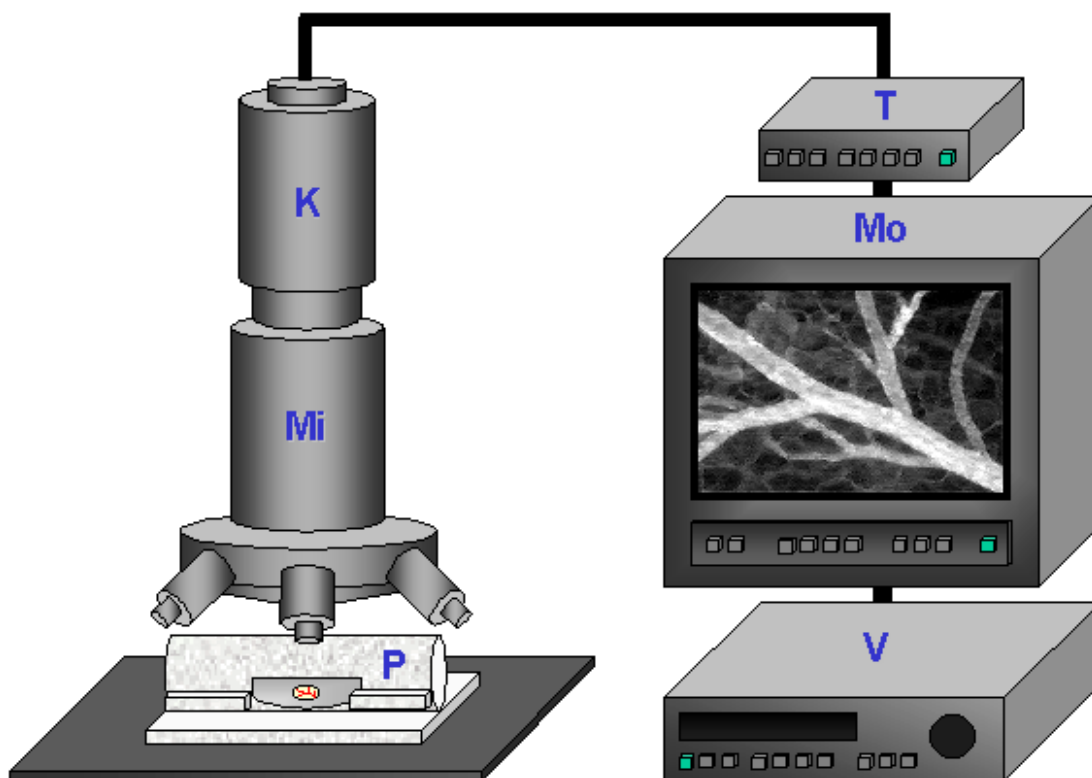
Vor jeder intravitalemikroskopischen Untersuchung wurden den Versuchstieren die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%; 0,1ml; MG 150000; Sigma) zur Kontrastverstärkung durch die Anfärbung des Blutplasmas (*Abbildung 21A*) und im Falle des Charakterisierungsversuches Rhodamin-6G (0,1%; 0,1ml; MG 479; Sigma) zur *in vivo* Kontrastierung von Leukozyten (*Abbildung 21B*) intravenös appliziert. Hierzu wurden unter Narkose mit Rompun®/Ketanest® die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, retrobulbär injiziert.



**Abbildung 21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Sammelvenole und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran werden durch die Anfärbung von Blutplasma die Blutgefäße in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt (A), während Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination (B) selektiv die Leukozyten als helle Punkte markiert.

Zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 21) wurden die Mäuse auf einer Plexiglasbühne immobilisiert und die Rückenhautkammer so fixiert, dass sie sich auf dem Mikroskopisch in horizontaler Lage befand. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines modifizierten Leitz-Orthoplan-Mikroskops (Leitz GmbH, Wetzlar) mit Auflicht- und Durchlicht-Einrichtung durchgeführt. Für die Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz) an ein Ploemopak-Illuminator System adaptiert. Drei zwischengeschaltete Filterblöcke ermöglichten dabei eine Anregung mit Licht der Wellenlänge

330-390nm, 450-490nm bzw. 530-560nm und eine Filterung des emittierten Lichts unterhalb 430nm, 515nm bzw. 585nm. Die intravitalmikroskopischen Bilder konnten unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-Zooms (Leitz) mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (CF 8/1 FMC; Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen-Rheinhausen) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen werden. Unter Zwischenschaltung eines Videotimers (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) zur Dokumentation der Versuchstiernummer und des Untersuchungszeitpunkts nach Transplantation wurden die Bilder auf ein ¾ Zoll Videobandgerät (Panasonic AG 7350; Matsushita Electric Ind. Co., Ltd., Japan) übertragen und auf einem Videomonitor (PVM 1444; Sony, Tokyo, Japan) wiedergegeben. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 4x Objektiv (Numerische Apertur (n.a.): 0.16; Olympus, Graz, Österreich) verwendet. Für Detailaufnahmen der neugebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Transplantate diente ein 10x (n.a.: 0.30; Zeiss) bzw. ein 20x Objektiv (n.a.: 0.32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand. Mittels dieser optischen Systeme konnten Vergrößerungen von x86, x136, x216 bzw. x432 unter Verwendung des Vario-Zooms auf dem Monitor erzielt werden.



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes mit Mikroskop (Mi), Videokamera (K), Videotimer (T), Monitor (Mo) und Videogerät (V). Zur Mikroskopie wird die Maus auf einer Plexiglasbühne (P) immobilisiert und die Rückenhautkammer in horizontaler Lage fixiert.



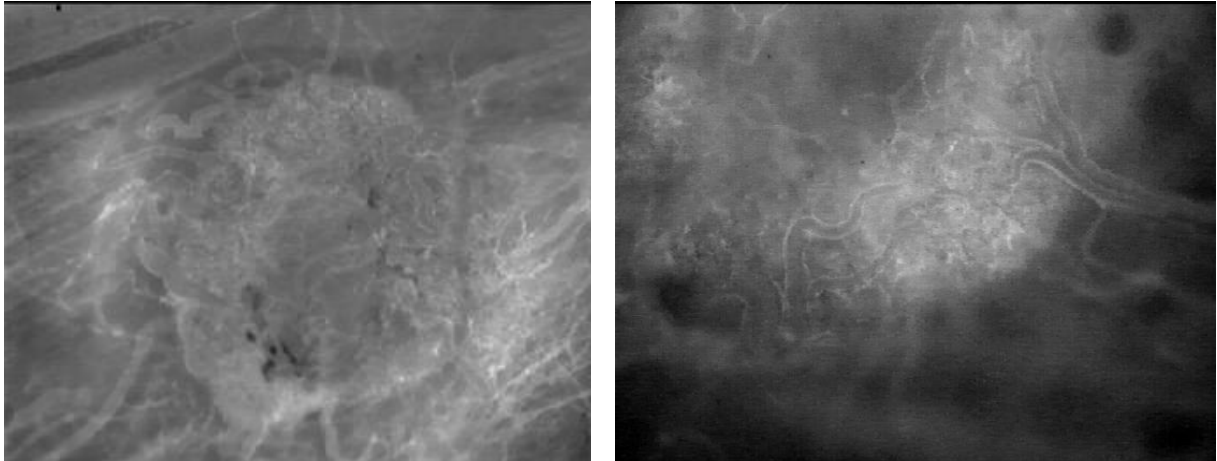
### 3.5 Mikrozirkulatorische Parameter (aus Dr.Arbeit M. Laschke)

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Rückenhautkammer ermöglichte die quantitative Beurteilung der physiologischen Angiogenese innerhalb der Transplantate durch die Erfassung der folgenden Parameter: Unter Verwendung des 4x Objektivs konnte die Fläche der sich neu entwickelnden Gefäßnetzwerke sowie die Fläche der Lungenstücke und ihre Durchmesser bestimmt werden. Das 20x Objektiv diente zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte neu entstandener Gefäßareale und zur Erfassung mikrohämodynamischer Parameter, wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit, innerhalb der individuellen Gefäße. Zusätzlich wurde das Fließverhalten der Leukozyten beurteilt.

Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter wurden off-line, d.h. nach Beendigung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie durch Wiederabspielen der DVD, mit dem computerassistierten Bildverarbeitungssystem CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg) durchgeführt. Dadurch konnte der Untersuchungszeitraum und die Belastung für das Versuchstier auf ein Minimum reduziert werden.

#### **Fläche**

Zur Messung der revaskularisierten Gewebeareale der transplantierten Lungenstücke und der Gesamtfläche der Transplantate wurden die entsprechenden Bereiche am Auswertebildschirm durch Umrandung markiert und durch Erfassung aller sich darin befindlicher Bildpunkte der Flächeninhalt in mm<sup>2</sup> bestimmt. Um dabei die Transplantate vom Empfängergewebe der Rückenhautkammer bis zum Versuchende abgrenzen zu können, wurden die Transplantate vor der Transplantation im DMEM-Medium mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 angefärbt. Dieses Fluorochrom, das sich durch ein Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 340nm und einem Emissionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 450nm auszeichnet, markiert Zellkerne durch Anlagerung an AT-reiche Sequenzen der DNS, wobei die Fluoreszenz bei lebenden, unfixierten Zellen über mehrere Zellgenerationen erhalten bleibt. Die revaskularisierte Fläche der Transplantate (in %) wurde an den einzelnen Untersuchungstagen als das Verhältnis zwischen der jeweils gemessenen mikrovaskulären Netzwerfläche und der initialen Transplantatfläche zum Zeitpunkt der Transplantation berechnet.



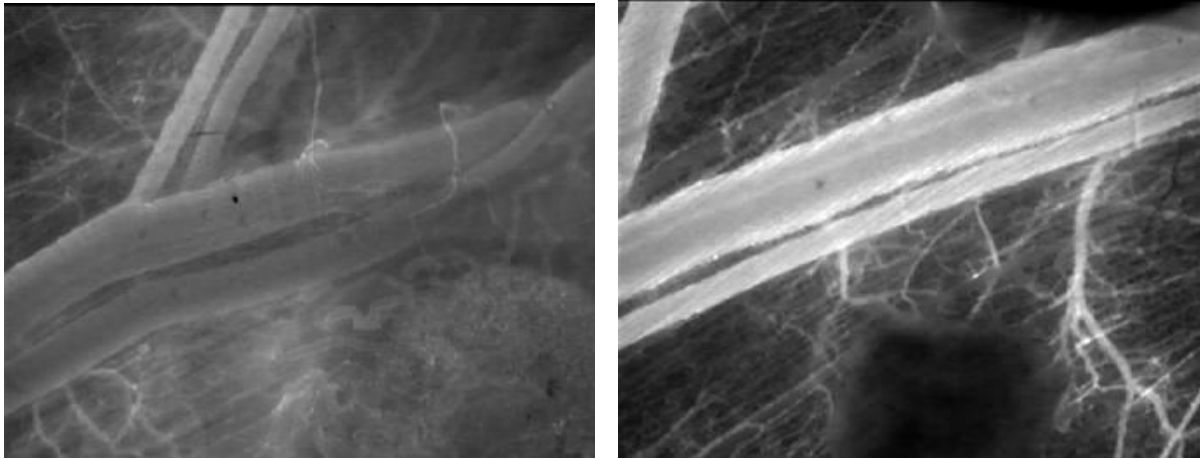
**Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von implantiertem Lungengewebe und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran werden durch die Anfärbung von Blutplasma die Blutgefäße in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt.**

### **Funktionelle Kapillardichte**

Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurde die Länge der neugebildeten Kapillaren pro Beobachtungsfeld in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  errechnet, wobei nur die Gefäße Berücksichtigung fanden, die zum Untersuchungszeitpunkt bereits mit Erythrozyten perfundiert waren. Unberücksichtigt blieben Kapillaren, die ausschließlich Blutplasma enthielten sowie Gefäße mit fehlender Perfusion. Die Messungen erfolgten jeweils in vier repräsentativen, vaskularisierten Beobachtungsfeldern innerhalb der Transplantate. Zu diesem Zwecke wurde das Transplantat in 4 Quadranten unterteilt. Durch Berechnung des arithmetischen Mittels der vier Einzelfelder konnte auf diese Weise für jeden Untersuchungstag die gesamte funktionelle Kapillardichte der neu entstehenden Gefäßnetzwerke innerhalb der transplantierten Lungenstücke bestimmt werden.

### **Durchmesser**

Zur computerassistierten Quantifizierung der Einzelgefäßdurchmesser wurden zwei Randpunkte der jeweils zu messenden Kapillare durch eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Durchmesserstrecke am „stehenden“ Videobild verbunden und deren Länge in  $\mu\text{m}$  bestimmt. Da durch die Verwendung des Plasma-Markers FITC-Dextran für die Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie auch der Erythrozyten-freie Plasmasaum dargestellt werden konnte, waren die Gefäßgrenzen bei dieser Methode eindeutig bestimmbar. Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurde jeweils bei zehn Gefäßen der Einzeldurchmesser bestimmt und aus den Werten das arithmetische Mittel gebildet. Die Auswahl der Gefäße erfolgte dabei standardisiert, so dass in einem vaskularisierten Areal der Transplantate nur solche Kapillaren erfaßt wurden, welche sich im Blickfeld des einzelnen Quadranten befanden.



**Abb. 24:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer Kammerarteriole und ihrer Abgänge. Durch den Farbstoff FITC-Dextran werden durch die Anfärbung von Blutplasma die Blutgefäße in Blaulicht-Epi-Illumination leuchtend weiß dargestellt.

### **Blutzellgeschwindigkeit**

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde in den Gefäßen durchgeführt, an denen zuvor bereits die Bestimmung des Gefäßdurchmessers erfolgte. Aus den Einzelwerten konnte wiederum das arithmetische Mittel zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten gebildet werden. Zur Bestimmung der Blutzellgeschwindigkeit wurde die computerassistierte Line-Shift-Diagramm-Methode angewendet (Klyscz 1997). Hierzu wird entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes eine zentral im Lumen gelegene Messlinie definiert und anschließend die Aufnahme für ca. 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wird fortlaufend für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinander gereihten Grauwertprofilen erzeugt der Computer ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen sind, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Meßlinie bewegt haben. Aus der Steigung dieser Linien kann anschließend die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m}/\text{sec}$  errechnet werden.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Werte wurden anhand von t-Tests und ANOVA-Analysen erhoben. P-Werte  $\leq 0,05$  werden als signifikant angesehen.

Bei Normalverteilung erfolgte der Vergleich zwischen den zu untersuchenden Gruppen mittels „One Way Analysis Of Variance“ (ANOVA) und dem t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten t-Test und Korrektur des Alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft. Im Falle der Nicht- Normalverteilung der Daten wendeten wir den Kruskal Wallis Test an. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter der Verwendung des Softwareprogramms Graph Pad InStat (Version 3.05, © Graph Pad Software Inc.) Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit  $p \leq 0.05$  als signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Nach intravenöser Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%), welcher sich aufgrund seines hohen Molekulargewichts (150.000 kDa) durch eine nur geringe Extravasation auszeichnet, kann mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie die Mikrozirkulation des als Empfängergewebe dienenden, quergestreiften Hautmuskels der Rückenhautkammer an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten während der gesamten Beobachtungszeit kontrastreich dargestellt werden.

Das Gefäßsystem des Hautmuskels besteht aus terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen (Laschke 2002).

### 4.2. Ischämie-Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden an der Rückenhautkammer der Maus wurde mithilfe eines Stempels durch mechanischen Druck auf das Zielgewebe verursacht. Die Schädigung des Gewebes zeigte sich durch die Ausbildung eines Ödems und den Untergang von Gefäßen. Während der Ischämiephase war kein Blutfluss mehr im Gewebe vorhanden, was im Intravitalmikroskop kontrolliert wurde. Ziel der Ischämiesetzung war es immer, den Blutfluss in den nicht betroffenen Arealen der Kammer hiervon unbeeinträchtigt zu lassen. In der Reperusionsphase entsteht in einigen Gefäßen wieder ein träger Fluss. Auffallend war, dass teilweise vor der Ischämie perfundierte Gefäße später nicht mehr auffindbar waren. Nach Ischämie sinkt die Kapillardichte im Vergleich zum Ausgangswert. Im weiteren Zeitverlauf kommt es wieder zu einer besseren Perfusion, wobei sich das oben beschriebene Ödem nur langsam zurückbildet. In manchen Fällen macht es eine Beurteilung des Zielgewebes zu einzelnen Untersuchungszeitpunkten unmöglich. Drei bis vier Tage nach Ischämie unterscheidet sich intravitalmikroskopisch das geschädigte Gewebe optisch jedoch nicht von den anderen Lungenstücken. Es fällt folglich kein Unterschied zu den anderen Lungenstücken auf, wenn nicht explizit nach diesen bestimmten Gefäßstellen gesucht wird, die vor der Ischämie sichtbar waren.

### 4.3. Charakterisierungsversuch

Zur Durchführung des Charakterisierungsversuchs wurden insgesamt vier BI-6-Mäuse verwendet. Jeweils zwei der Versuchstiere erhielten eine einstündige bzw. eine dreistündige Ischämie einer der drei ektopen, transplantierten Lungenwürfel. Es wurden im Anschluss keine Stammzellen gespritzt.

Zirkulatorische Parameter wurden nach vorhergehender *Baseline*-Messung (LA = Leeraufnahme) direkt nach Ischämie, 3h und 24h nach Ischämie am Intravitalmikroskop untersucht.

Simultan fanden Zählungen der adhäsiven Leukozyten in ischämischer/nicht ischämischer Lungengewebe, bzw. ischämischer/nicht ischämischer Kammer statt.

Zur Darstellung der Leukozyten im Grünfilter (Wellenlänge 530-560 nm) des Intravitalmikroskops wurde im Vorfeld eine Mischung aus FITC-Dextran und Rhodamin i.v. appliziert. In dieser Ansicht imponierten die zirkulierenden bzw. adhärenenten Leukozyten als weiß-leuchtende Punkte.

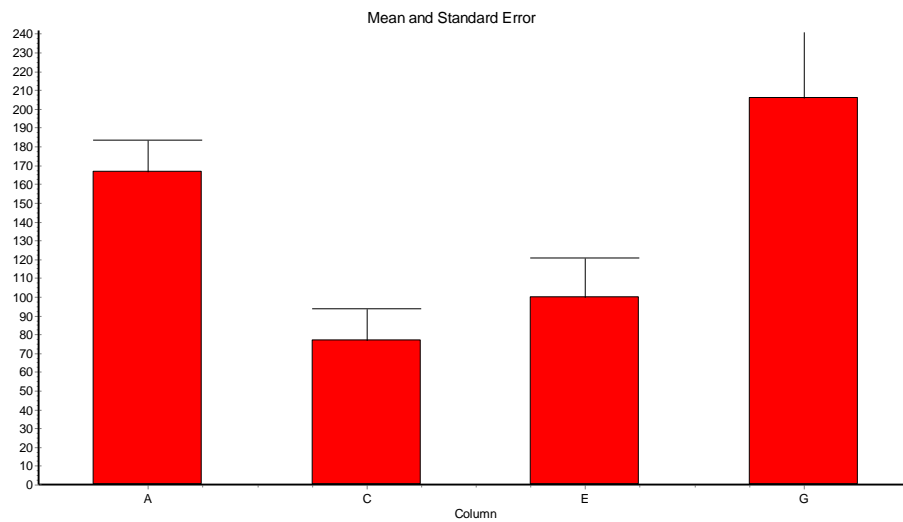
#### 4.3.1. Kapillardichte

Wir verwendeten die intravitalmikroskopische Beobachtung des Blutflusses und die Bestimmung der Kapillardichte um den Erfolg der Ischämie und die Reaktion des Donorgewebes auf diese zu beurteilen. Um einen Referenzwert zu erhalten, wurden bei allen Mäusen vor Ischämie die Kapillardichte des Lungen- und Kammergewebes (Baselinemessungen) erfasst. Da sich die Baselinemessungen der Versuchstiere nicht signifikant voneinander unterschieden, sahen wir die Vergleichbarkeit der 1h- und 3h-Gruppe als gewährleistet ( $p = 0.0908$ ).

Die Effizienz der mechanischen Ischämie wurde mikroskopisch gesichert. Bei den Tieren war eine komplette Stagnation des Blutflusses vor dem Ischämiestempel zu sehen, in seltenen Fällen lag eine Pendelbewegung der Blutsäule vor.

Die Beurteilbarkeit des Gewebes war nach dem Eingriff oft durch massive Ödembildung eingeschränkt.

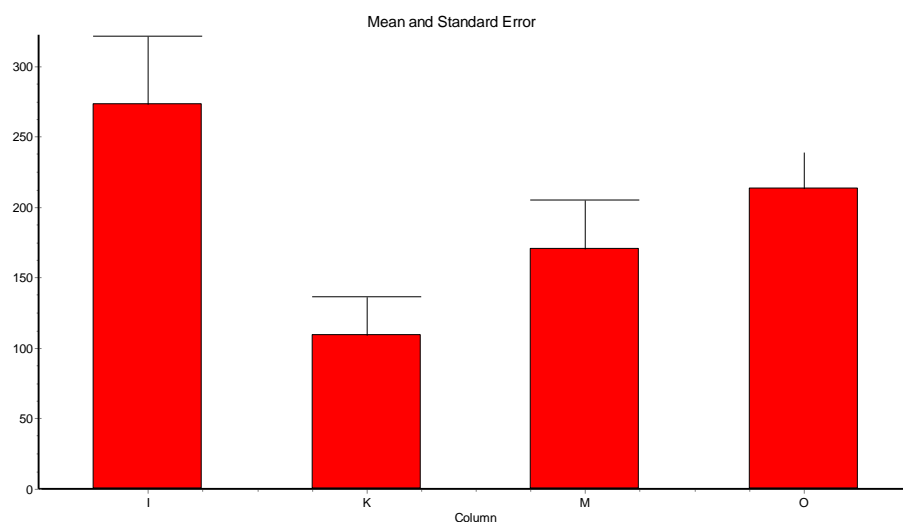
Unsere Untersuchungen zeigen, dass sich die Kapillardichte im Lungengewebe, unabhängig vom Zeitpunkt der Messung, nach einstündiger Ischämie im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ändert ( $p = 0.0055$ ) (Abb. 25).



**Abb. 25:** Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe nach einstündiger Ischämie (Leeraufnahme vs. 1h, 24h und 3d nach Reperfusion) (overall ANOVA:  $p=0.0055$ ; A versus C:  $p=0.0036$ ; Bonferroni post-hoc test). A = Baselinemessung, C = direkt nach Reperfusion, E = 3h nach Reperfusion, G = 24h nach Reperfusion. Ordinatewerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.

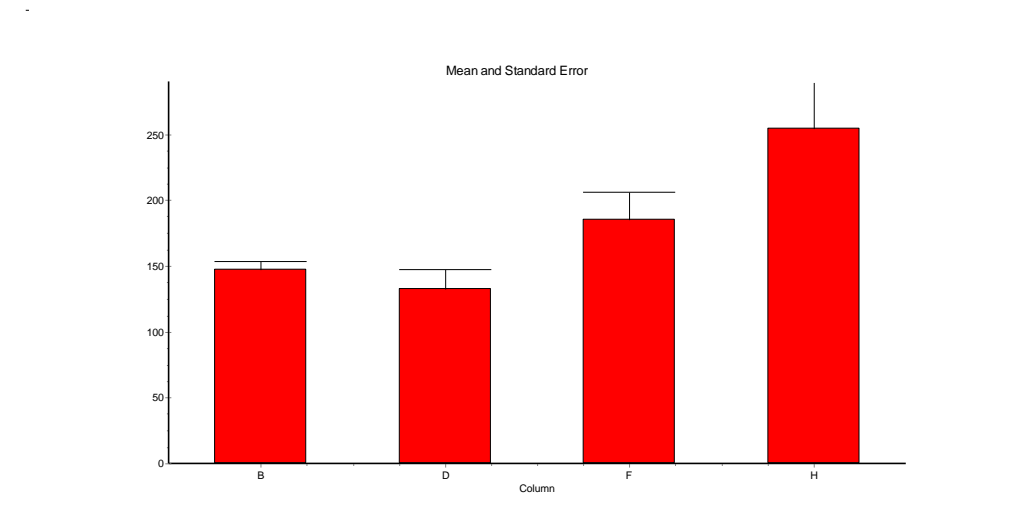
Besonders deutlich wird diese Abnahme wenn man den Messzeitpunkt direkt nach Reperfusion mit der Baselinemessung vergleicht ( $p = 0.0036$ ).

Eine ähnliche Beobachtung machten wir auch bei der dreistündigen Ischämie. Im Vergleich zum Wert vor Ischämie nimmt die Kapillardichte über den gesamten Beobachtungszeitraum (24 h) signifikant ab ( $p=0.0194$ ), besonders deutlich wieder nach der ersten Messung direkt nach Reperfusion des geschädigten Lungengewebes ( $p = 0.0102$ ) (Abb 26).



**Abb. 26:** Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe nach dreistündiger Ischämie (Leeraufnahme vs. 0h, 3h und 24h nach Reperfusion) (overall ANOVA:  $p= 0.0194$ ; A versus C:  $p= 0.0102$ ; Bonferroni post-hoc test). I = Leeraufnahme, K = direkt nach Reperfusion, M = 3h nach Reperfusion, O = 24h nach Reperfusion Ordinatewerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.

Während sich die Kapillardichte im nicht ischämisierten Lungengewebe der 3h-Ischämiegruppe nicht signifikant ändert ( $p = 0.8936$ ), tut sie dieses jedoch in der 1h-Gruppe ( $p = 0.032$ ) (Abb. 27).



**Abb. 27: Veränderung der Kapillardichte im Lungengewebe ohne Ischämie bei 1h-Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels. (Leeraufnahme vs. 0h, 3h und 24h nach Reperfusion) (overall ANOVA:  $p = 0.0032$ ; post-hoc Test nach Dunnett: D vs. H:  $p < 0.01$ ). B= Leeraufnahme, D = direkt nach Reperfusion, F = 3h nach Reperfusion, H = 24h nach Reperfusion. Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.**

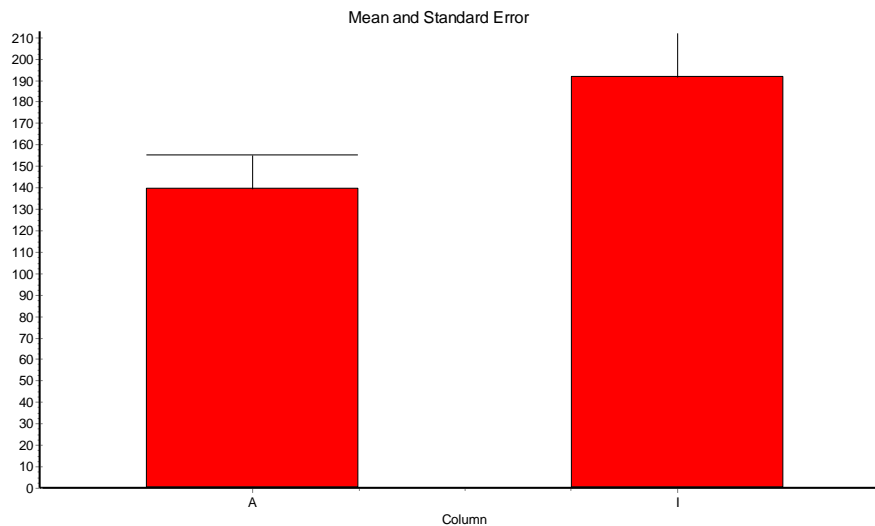
Bei Betrachtung der graphischen Darstellung dieser (Abb. 27) erkennt man jedoch im Gegensatz zu Abbildung 25 und 26, welche die Ischämiegruppen darstellen, dass die Kapillardichte über den gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich steigt. Grund dafür kann die unterschiedliche Stärke des Schadens sein, welcher durch den mechanischen Druck entsteht und sich nicht exakt steuern lässt. Auch ist es möglich, dass proangiogenetische Signale, als Folge der Ischämie im Nachbargewebe, für die Zunahme der Kapillardichte in eben diesem Lungenwürfel verantwortlich sind.

Eine weitere Frage, die wir an den Versuchsaufbau stellten, war, ob der Schaden im ischämischen Gewebe nach dreistündiger Ischämie größer ist als nach einer Stunde.

Da diese Frage in der letzten Konsequenz mit den von uns erhobenen Parametern nicht zu beantworten war, beschränkten wir uns auf die Erörterung ob die Unterschiede der Kapillardichte im Vergleich 3h vs. 1h Ischämie signifikant sind oder nicht.

Das Ergebnis (Abb. 28) zeigt die zueinander nicht signifikanten Mittelwerte der Kapillardichte nach dreistündiger Ischämie ( $191.7 \text{ cm}/\text{cm}^2 \pm 20$ ) und die Kapillardichte nach einstündiger Ischämie ( $139.6 \text{ cm}/\text{cm}^2 \pm 15$ ). Aus dieser Beobachtung folgern wir, dass es im Lungengewebe nach längerer Ischämie nicht zu einer stärkeren Verminderung der Kapillardichte kommt im Vergleich zu einer kürzeren Ischämiezeit.





**Abb. 28:** Ischämisches Lungengewebe im Vergleich der Kapillardichte nach einstündiger bzw. dreistündiger Ischämie (t-Test  $p = 0.056$ ) A = 1h Ischämie der Lunge, I = 3h Ischämie der Lunge Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.

#### 4.3.2 Reaktion des Empfängergewebes

Die qualitative Beurteilung des Fließverhaltens Rhodamin-6G-markierter Leukozyten führte in allen Versuchsserien zu dem Ergebnis, dass die Leukozyten mit dem Gefäßendothel der Lungennetze in Interaktion treten. So ließen sich die Leukozyten im Intravitalmikroskop als ortsständige, weiß-leuchtende Punkte identifizieren.

Eine Beobachtung der Leukozytenzahlen in geschädigtem Lungengewebe nach einstündiger (a) und dreistündiger Ischämie (b), sowie in Kontrolllungengewebe nach dreistündiger (c) Ischämie eines benachbarten Lungenkubus, ergab keine signifikante Veränderung im Verlauf des 24-stündigen Untersuchungszeitraums im Bezug auf die jeweiligen Ausgangswerte ( $p(a) = 0.1467$ ,  $p(b) = 0.5282$ ,  $p(c) = 0.6595$ ).

Im Gegensatz dazu sind die Daten im Kontrolllungengewebe nach einstündiger Ischämie eines benachbarten Lungenkubus signifikant ( $p = 0.0471$ ).

Eine Erklärung für diese Tatsache erschließt sich in diesem Zusammenhang nicht.

Auffallend ist auch die Tatsache, dass in 75% der Fälle bereits vor Ischämie hohe Leukozytenzahlen im Gewebe zu verzeichnen waren.

Ursachen hierfür können Entzündung oder die Implantation des Gewebes per se sein. Gegen letzteren Punkt sprechen zum einen persönliche Erfahrungen und zum anderen frühere Kammermodelle, welche eine inflammatorische Reaktion der Rückenhautkammer auf die Transplantate weitestgehend ausschließen (Laschke 2002, Regelin 2011)

#### 4.4 Stammzellversuche

Ziel der sog. Stammzellversuche war es, das Verhalten epithelialer Stammzellen in der Rückenhautkammer nach Ischämie über einen gewissen Zeitraum zu untersuchen. Zu diesem Zweck bildeten wir zwei Versuchsgruppen mit vier bzw. fünf nu/nu CD1-Mäusen. An den Rückenhautpräparationen der Versuchstiere aus Gruppe 1 (vier Tiere) wurde die gleiche dreistündige Ischämie einer der drei ektopen, transplantierten Lungenparenchymwürfel durchgeführt und nach Ischämieende und einstündiger Reperfusion die identische Menge ( $1 \times 10^6$  SDKer in 2ml Suspensat) an epithelialen Stammzellen intravenös appliziert und diese über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. Zirkulatorische Parameter, wie die funktionelle Kapillardichte, wurden nach vorhergehender *Baseline*-Messung (LA = Leeraufnahme) direkt nach Zellinjektion, 3h, 24h und 3d nach Zellinjektion untersucht.

Die Versuchstiere der Gruppe 2 (fünf Tiere) wurden einer identischen Prozedur unterzogen. Unterschiedlich waren nur die Untersuchungszeitpunkte und der Beobachtungszeitraum, welcher in Gruppe 1 drei Tage und in Gruppe 2 eine Woche umfasste. Die Tiere wurden vor Ischämie, sowie 24h und 8d nach Zellinjektion intravital mikroskopiert.

Simultan zur Erhebung der anderen zirkulatorischen Parameter fanden in beiden Gruppen Zählungen der epithelialen Stammzellen in ischämischem, bzw. nicht ischämischem Lungengewebe und ischämischer, sowie nicht ischämischer Kammer statt.

Die Aufnahmen der mit SP-DiIC<sub>18</sub>-gefärbten epithelialen Stammzellen erfolgten unter Zuhilfenahme des Rotfilterblocks (Wellenlänge 330-390nm) im Intravitalmikroskop. In dieser Ansicht imponierten die zirkulierenden bzw. adhärenen Stammzellen als weiß-leuchtende Punkte.

##### 4.4.1 Kapillardichte

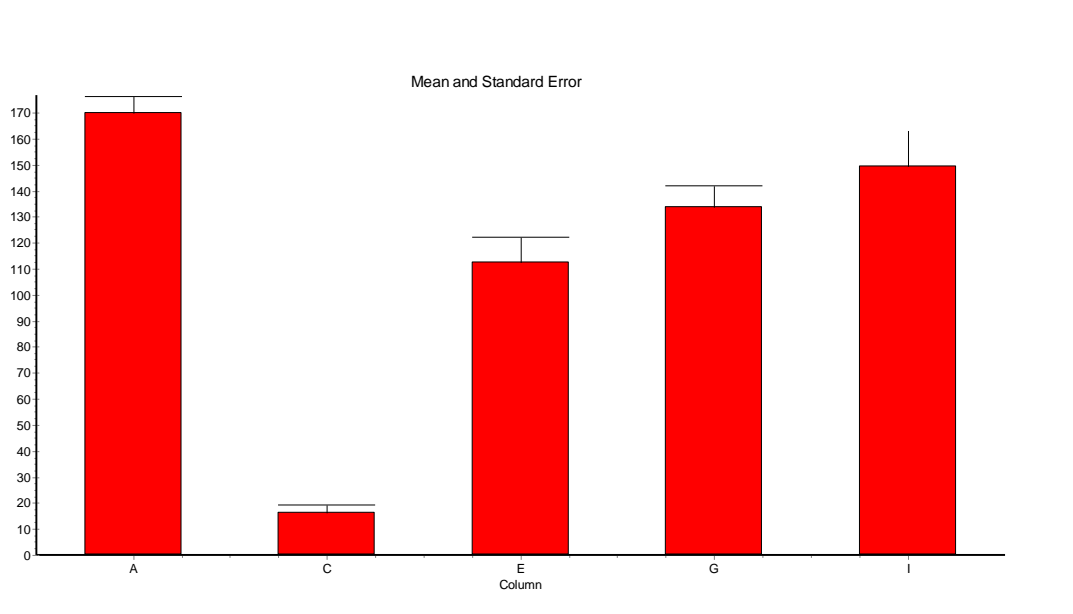
Die Beobachtung der Kapillardichte in ischämischem und nicht-ischämischem Gewebe war auch in dieser Versuchsreihe von Interesse um die Folgen der Ischämie zu charakterisieren und um eine Vergleichbarkeit der Stammzellpopulationen im Zielgewebe nach Injektion zu gewährleisten.

Die Kapillardichte ist auch ein Parameter, der sich gut zur Veranschaulichung der Angionese verwenden lässt, welche als Reparaturmechanismus der Lunge zu besserer Perfusion im Gewebe führt.

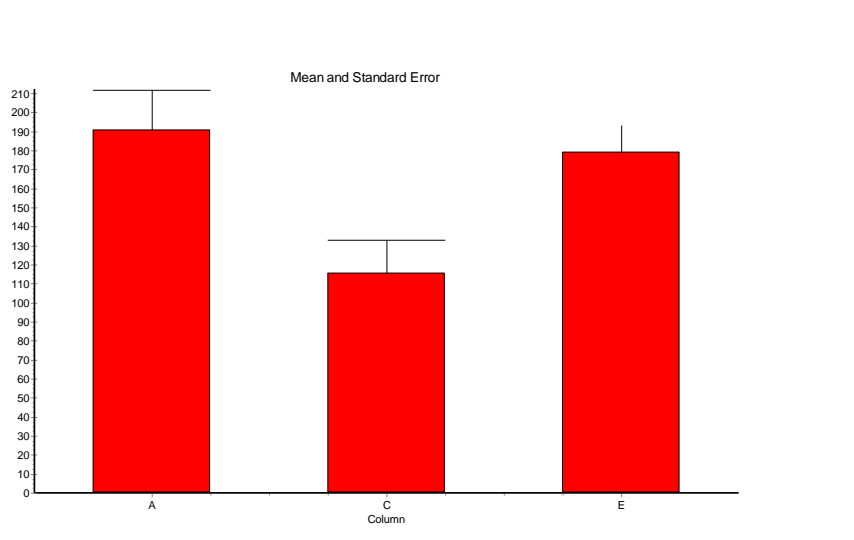
Untersucht wurde die Kapillardichte in ischämischer Lunge, Kontrolllunge, ischämischer Kammer und Kontrollkammer über die Zeit und im Vergleich Ischämie gegenüber Kontrolle.

Um die Vergleichbarkeit des Ischämie- und des Kontrollgewebes untereinander zu beweisen, wurden jeweils die Leeraufnahmen, d.h. vor Ischämiesetzung, durch einen t-Test miteinander verglichen. Die Unterschiede sind in allen Vergleichsgruppen nicht signifikant (Gruppe 1:  $p_{\text{Lunge}}= 0.2615$ ,  $p_{\text{Kammer}}= 0.9927$  ; Gruppe 2:  $p_{\text{Lunge}}= 0.6393$  ,  $p_{\text{Kammer}}= 0.1982$  ).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Änderung der Kapillardichte im Lungengewebe im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf und den Vergleich zwischen Ischämie- und Kontrollgewebe signifikant ist (Abb. 29).



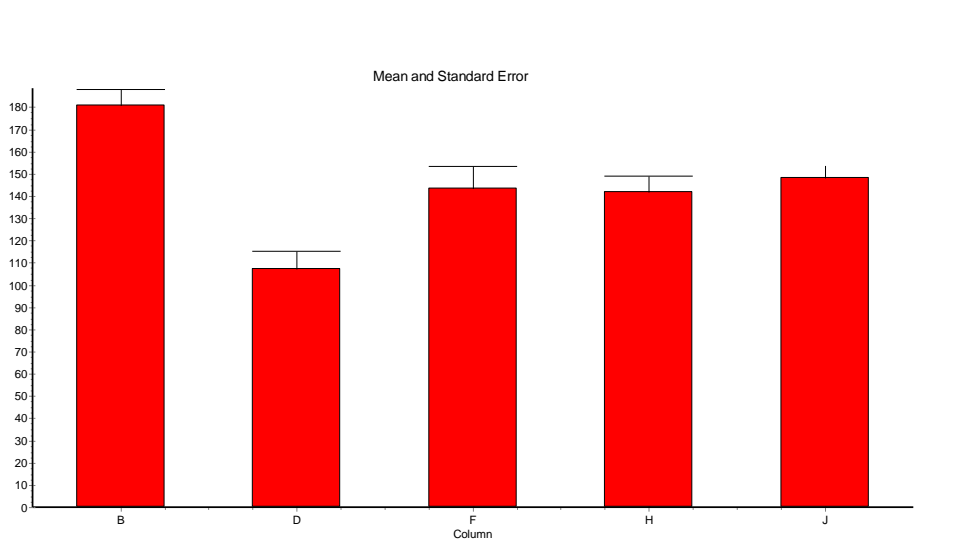
**Abb. 29: Gruppe1: Vergleich der Kapillardichte von Lungenkapillaren vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit (overall ANOVA  $p= 0.0001$ ) A = Leeraufnahme, C = nach Ischämie, E = nach 3h, G = nach 24h, H = nach 3d Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.**



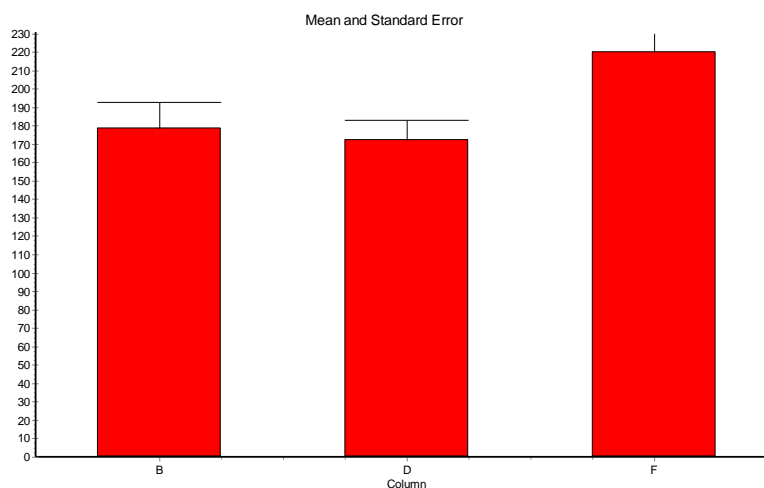
**Abb. 30: Gruppe 2: Vergleich der Kapillardichte in Lungengewebe vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit. (overall ANOVA  $p= 0.0092$ ) A = Leeraufnahme, C = 24h nach Ischämie, D = 8d nach Ischämie Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.**

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, führt die Ischämie zunächst zu einer Abnahme der Kapillardichte, die sich nach ca. 24h wieder langsam erholt und im Zeitraum von drei bis acht Tagen nach Ischämie wieder um den Ausgangswert herum liegt.

Offensichtlich reagiert auch das Kontrollgewebe, was eigentlich unbehelligt von der Ischämie sein sollte, mit einer Änderung der Kapillardichte (Abb. 31 und 32). Diese Tatsache lässt die Überlegung zu, dass die Kontrolllungenstücke eben doch vom verminderten Blutfluss beeinträchtigt waren, ohne dass sich dies vermeiden lies.

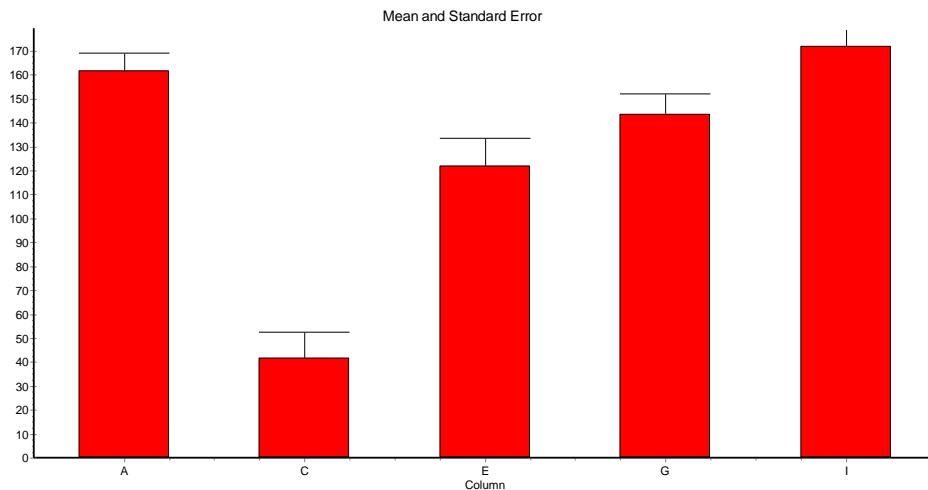


**Abb. 31: Gruppe 1: Vergleich der Kapillardichte von Lungengewebe über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels (overall ANOVA p= 0.0001) B= Leeraufnahme, D = direkt nach Ischämie, F = 3h nach Ischämie, H = 24h nach Ischämie, J = 3d nach Ischämie Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in cm/100 cm² Lungenfläche angegeben.**

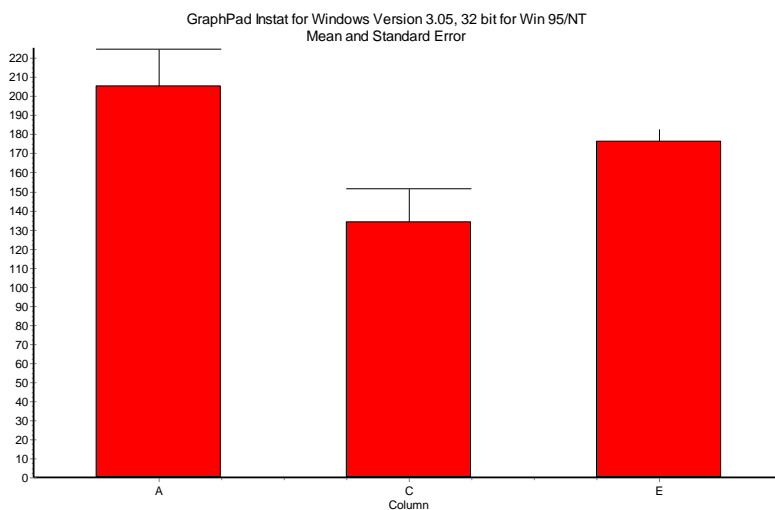


**Abb. 32: Gruppe 2: Vergleich der Kapillardichte von Kontrolllungengewebe vor/nach Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels über die Zeit (overall ANOVA p = 0.0108) B = Leeraufnahme, D = 24h nach Ischämie, F = 8d nach Ischämie Ordinatenergebnisse der Kapillardichte sind in cm/100 cm² Lungenfläche angegeben.**

In den ischämischen Kammerkapillaren verändert sich die Kapillardichte nach Ischämie ähnlich wie in den Lungengefäßen. Es kommt zu einer signifikanten Veränderung der Werte (Abb. 33 und 34), wobei zunächst ein Absinken und im weiteren Verlauf des Versuchs ein erneuter Anstieg der Kapillarisation zu beobachten ist.



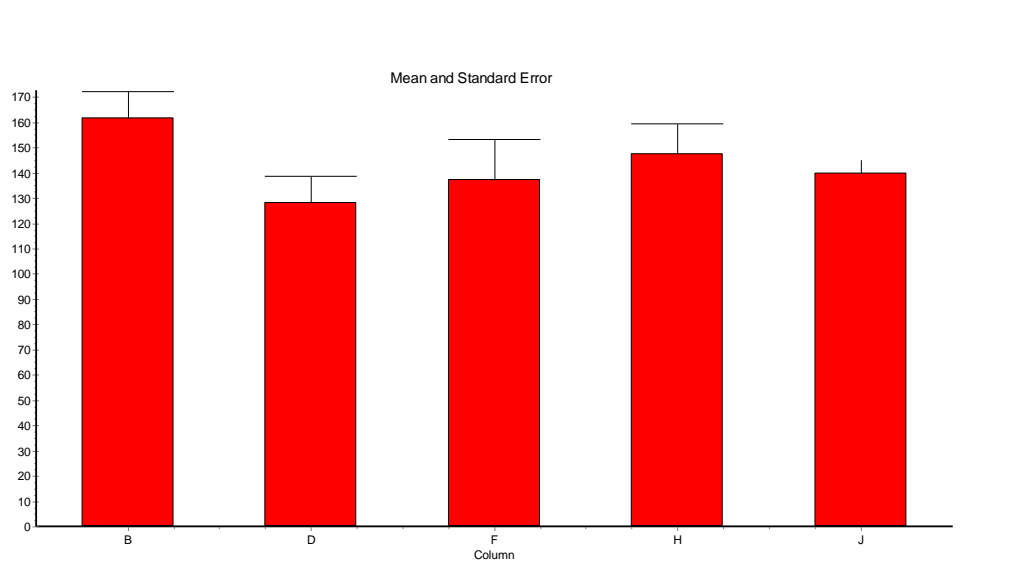
**Abb. 33: Vergleich der Kapillardichte von Kammergefäßen vor/nach dreistündiger Ischämie über die Zeit (overall ANOVA  $p = 0.0001$ ) A = Leeraufnahme, C = direkt nach Ischämie, E = 3h nach Ischämie, G = 24h nach Ischämie, I = 3d Ischämie**  
 Ordinatenwerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.



**Abb. 34: Vergleich der Kapillardichte in betroffenen Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels. (Overall ANOVA  $p = 0.0100$ )**  
 A= Leeraufnahme, C = 24h nach Injektion, E = 8d nach Injektion  
 Ordinatenwerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.

Bei Betrachtung der Kontrollkammergefäße, lässt sich keine signifikante Änderung der Kapillardichte über die Zeit feststellen. In diesem Punkt unterscheidet sich das Gewebe der

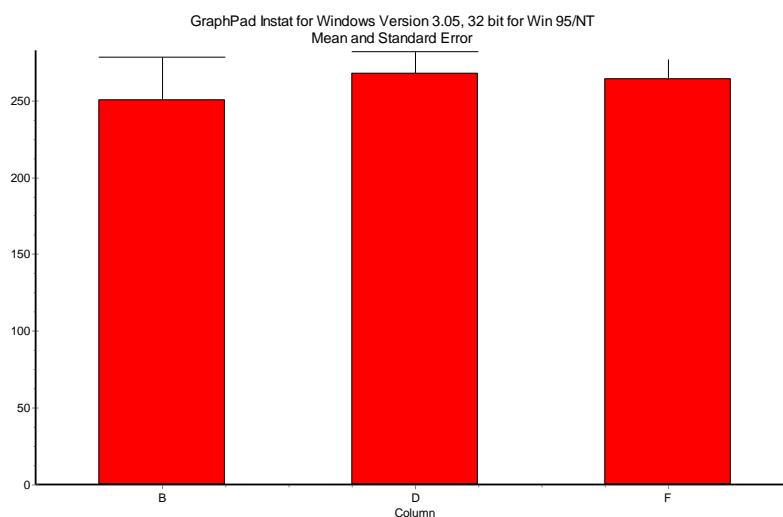
Kontrollkammer von dem der Kontrolllungen. Wie in Abbildung 35 und 36 zu sehen, bleibt die Kapillardichte weitestgehend gleich.



**Abb. 35: Vergleich der Kapillardichte in Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels. (overall ANOVA  $p = 0.2152$ )**

B = Leeraufnahme, D = direkt nach Ischämie, F = 3h nach Ischämie, H = 24h nach Ischämie, J = 3d nach Ischämie

Ordinatenwerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.



**Abb. 36: Vergleich der Kapillardichte in nicht ischämischen Kammerkapillaren über die Zeit vor/nach dreistündiger Ischämie eines benachbarten Lungenwürfels. (Overall ANOVA  $p = 0,7982$ )**

B= Leeraufnahme, D = 24h nach Injektion, F = 8d nach Injektion

Ordinatenwerte der Kapillardichte sind in  $\text{cm}/100 \text{ cm}^2$  Lungenfläche angegeben.

Warum sich die Kapillardichte in den nicht-ischämischen Lungen ändert und in der Kontrollkammer nicht, bleibt zunächst unklar. Eine mögliche Ursache ist, dass die Kontrolllungen entgegen allen Vorsätzen während der Ischämie doch von dem verminderten Blutfluss betroffen waren, während die Kammer tatsächlich unbehelligt blieb. Eine andere Erklärung wäre eine größere Sensibilität des Lungengewebes auf Ischämie im Vergleich zum Kammergewebe, wenn wir davon ausgehen, dass die Perfusion im nicht-ischämischen Gewebe gleich ist.

#### **4.4.2 Verteilung der epithelialen Stammzellen im Gewebe**

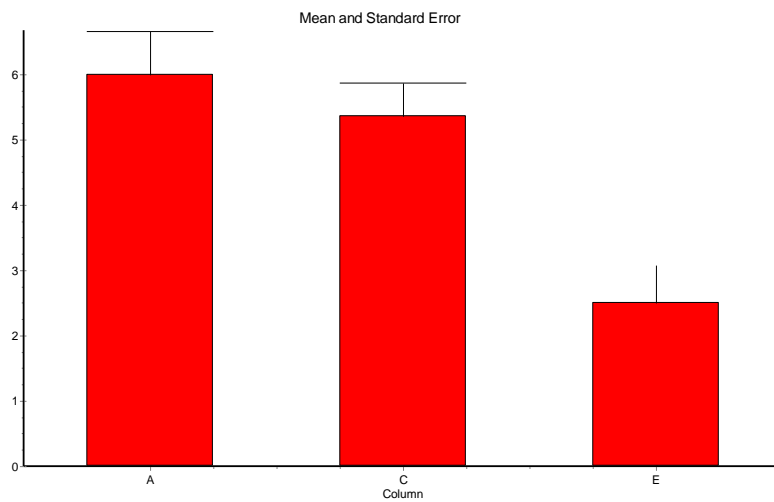
Das Hauptinteresse unserer Versuchsreihe war, das Homing epithelialer Stammzellen in einen Ischämie-Reperfusionsschaden der implantierten Lunge zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden jedem Versuchstier 1h nach Reperfusion  $1 \times 10^6$  Stammzellen auf 2 ml Suspensat über die V. jugularis injiziert. Die mit einem Fluoreszenzstoff gefärbten Stammzellen wurden zu den festgelegten Messzeitpunkten im Intravitalmikroskop auffindig gemacht und imponierten als leuchtend weiße Punkte.

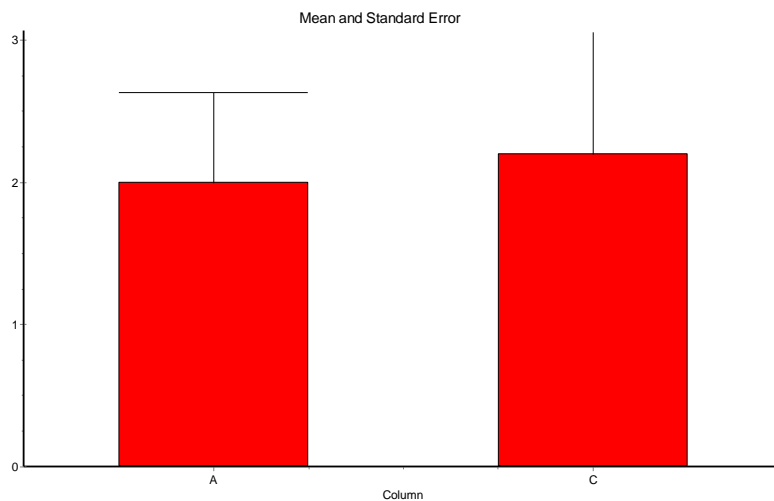
Die numerischen Angaben zu den Stammzellen im Gewebe beziehen sich immer auf ein Feld von  $100 \text{ cm}^2$  Kapillardichte. So konnten wir ausschließen, dass Gewebe mit geringer Durchblutung fälschlicherweise als wenig attraktiv für Stammzellen beurteilt würde, nur weil dort weniger Stammzellen anzutreffen waren als in besser durchblutetem Gewebe.

Die Verteilung der Stammzellen wurde sowohl im Verlauf über die Zeit im jeweiligen Gewebetyp, als auch im direkten Vergleich Ischämie vs. Kontrolle statistisch ausgewertet.

Dabei konnten wir feststellen, dass die Verteilung der Stammzellen in ischämischem Lungengewebe in den ersten drei Tagen zu den Messzeitpunkten signifikant differiert (Abb. 37: (A)  $6 \pm 2,7$  (C)  $5,3 \pm 1,9$  (E)  $2,5 \pm 1,5$ ), während der Vergleich der Werte nach 24h mit denen nach acht Tagen (Abb. 38: (A)  $2 \pm 0,6$  (C)  $2,1 \pm 1,3$ ) keine aussagekräftigen Unterschiede vorweist.



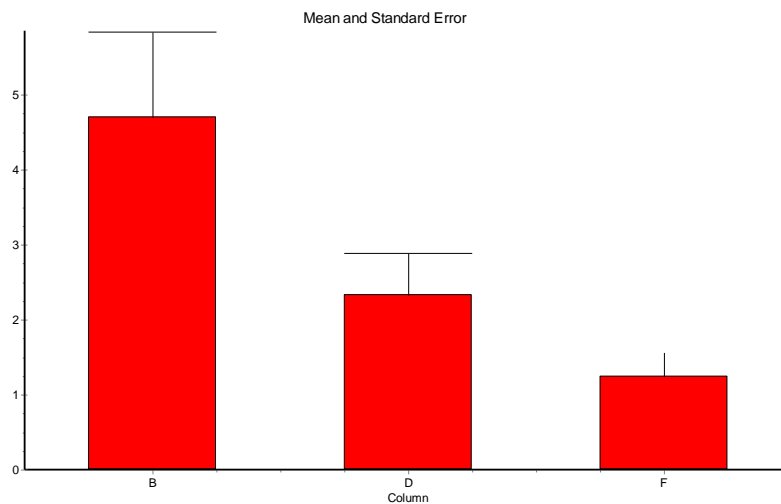
**Abb. 37: Verteilung der epithelialen Stammzellen im ischämischen Lungengewebe über die Zeit. (overall ANOVA  $p = 0.0015$ ) A = 3h nach Ischämie, C = 24h nach Ischämie, E = 3d nach Ischämie Ordinatewerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**



**Abb. 38: Epitheliale Stammzellen in ischämischem Lungengewebe nach 24h und 8d im Vergleich (t-Test  $p = 0,8651$ ) A = Isch. Lunge nach 24h, B = Isch. Lunge nach 8d Ordinatewerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**

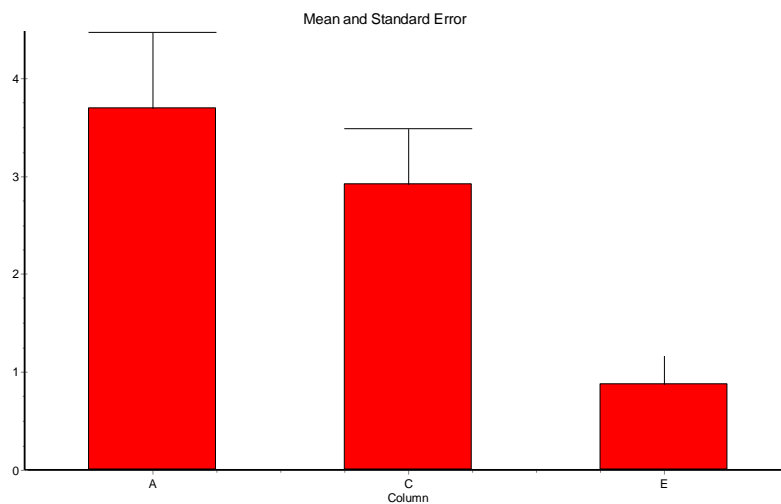
Auch in nicht-ischämischem Lungengewebe unterscheiden sich die Werte während der ersten drei Tage signifikant voneinander (Abb. 39: (B)  $4,7 \pm 3,5$  (D)  $2,3 \pm 1,6$  (F)  $1,2 \pm 0,8$ ). Die Werte nach 24h im Vergleich zu acht Tagen unterscheiden sich nur geringfügig.



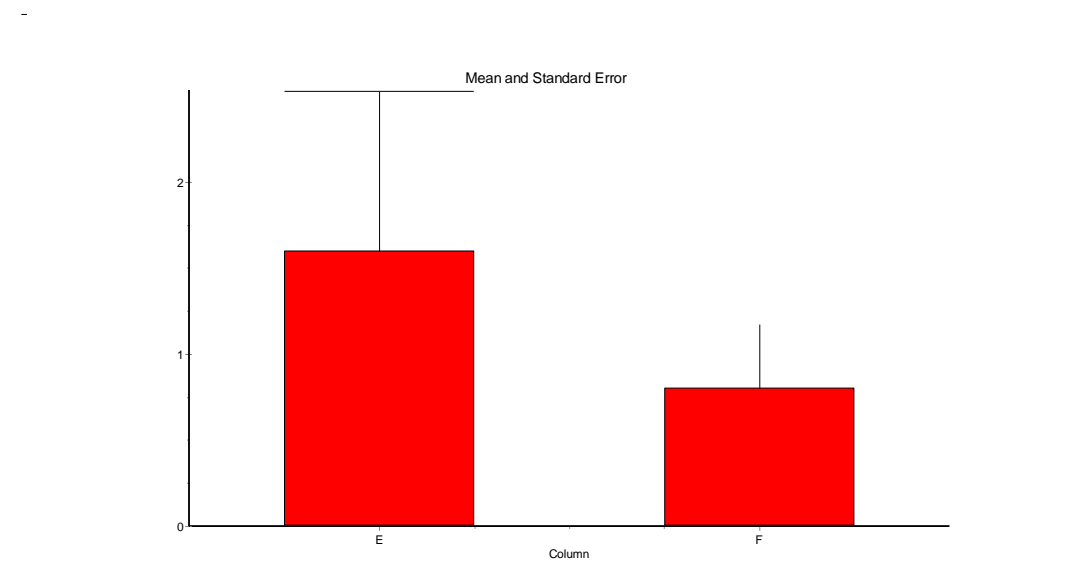


**Abb. 39: Verteilung der Stammzellen im Kontrolllungengewebe über die Zeit (overall ANOVA  $p = 0.0180$ )  
B = 3h nach Ischämie, D = 24h nach Ischämie, F = 3d nach Ischämie  
Ordinatenwerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**

Ein mit den oben genannten Ergebnissen konformes Resultat liefert auch die ischämische Kammer (Abb. 40: (A)  $3,7 \pm 2,8$  (C)  $2,9 \pm 1,9$  (E)  $0,8 \pm 0,8$ ).

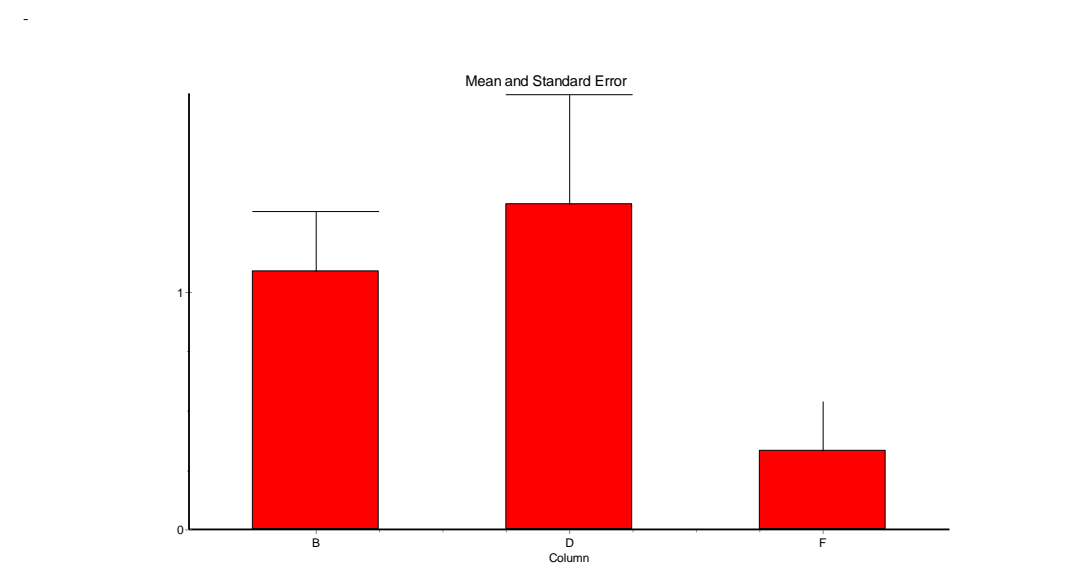


**Abb. 40: Verteilung der Stammzellen im ischämischen Kammergewebe über die Zeit. (t-Test  $p = 0.0245$ )  
A = 3h nach Ischämie, C = 24h nach Ischämie, E = 3d nach Ischämie  
Ordinatenwerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**



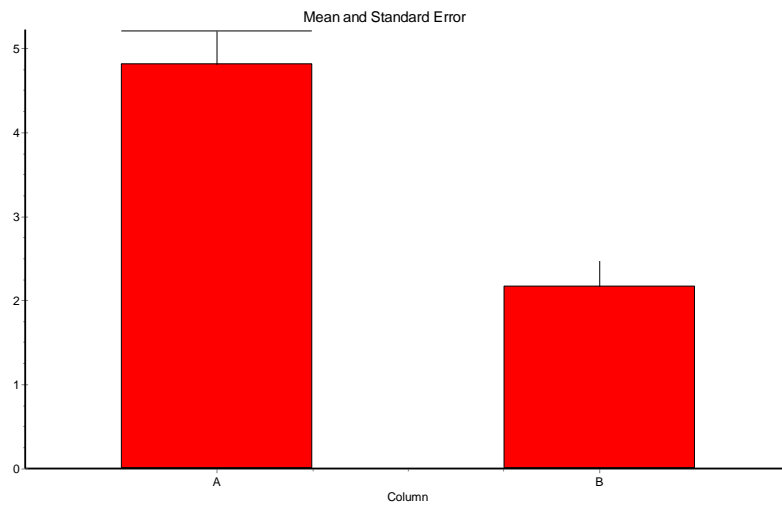
**Abb. 41: Epitheliale Stammzellen im ischämischen Kammergewebe nach 24h und 8d im Vergleich (t-Test  $p = 0.4468$ ) A = Isch. Kammer nach 24h, B = Isch. Kammer nach 8d Ordinatenergebnisse der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**

In der Kontrollkammer weisen die Werte weder in den ersten drei Tagen, noch im Vergleich der Daten nach 24h und acht Tagen signifikante Unterschiede auf.

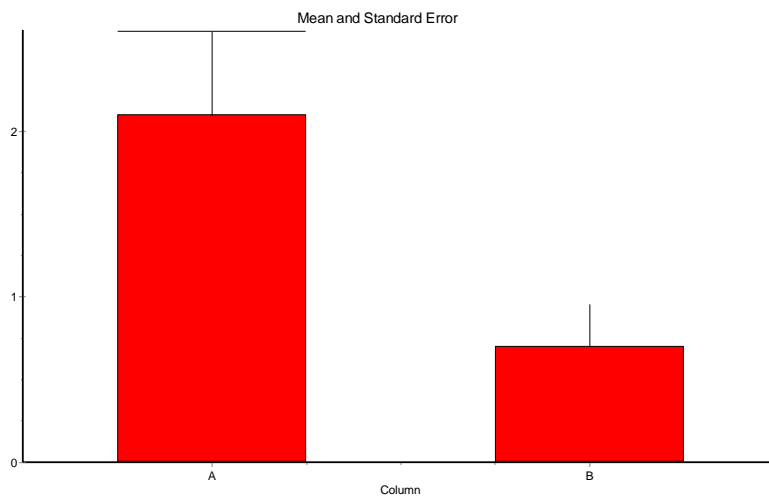


**Abb. 42: Verteilung der Stammzellen im Kontrollkammergewebe über die Zeit. (overall ANOVA  $p = 0.1435$ ) B = 3h nach Ischämie, D = 24h nach Ischämie, F = 3d nach Ischämie Ordinatenergebnisse der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**

Im Vergleich der ischämischen Gebiete mit den Kontrollgebieten, unabhängig vom Zeitpunkt der Messung, konnten wir zeigen, dass im Lungengewebe beider Versuchsgruppen signifikant mehr Zellen den Weg in die geschädigte Lunge finden als in der Kontrolle (Abb. 43/Gruppe 1: (A)  $4,8 \pm 2,5$  (B)  $2,1 \pm 1,4$  - Abb. 44/Gruppe 2: (A)  $2,1 \pm 1,6$  (B)  $0,7 \pm 0,8$ )

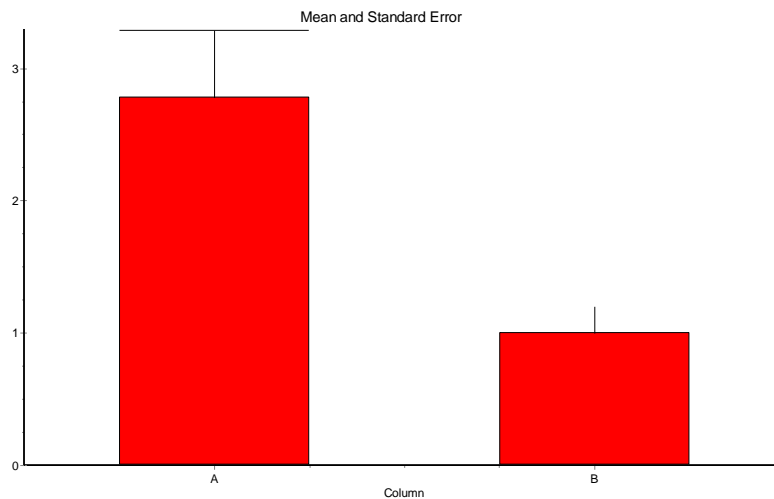


**Abb. 43: Gruppe 1: Verteilung der Stammzellen im Lungengewebe: Ischämie vs. Kontrolle (t-Test  $p = 0.0001$ ) A = ischämisches Lungengewebe, B = Kontrollgewebe**  
Ordinatenwerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.

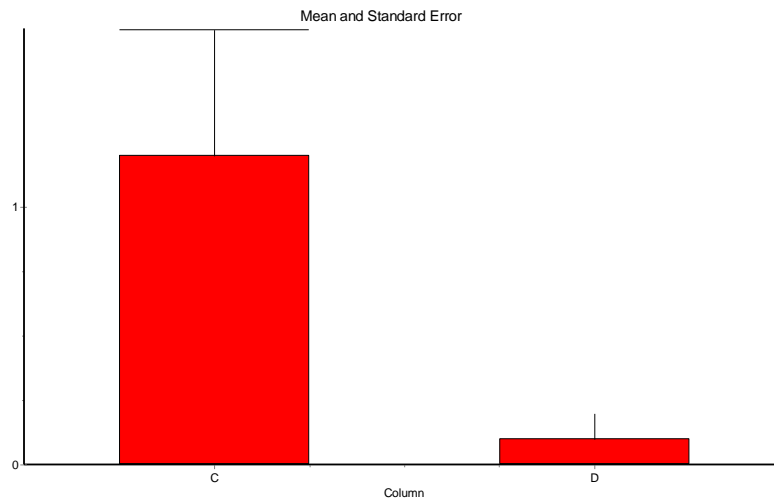


**Abb. 44: Gruppe 2: Vergleich der Verteilung epithelialer Stammzellen zwischen Kontroll- und Ischämiegebieten unabhängig vom Zeitpunkt (t-Test  $p = 0.0239$ ) A = Ischämisches Lungengewebe, B = Kontrollgewebe**  
Ordinatenwerte der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.

Ebenso verhält es sich im Kammergewebe. Auch hier sind die Stammzellen signifikant stärker in den ischämischen Arealen zu sehen als im intakten Gewebe (Abb. 45 (A)  $2,8 \pm 0,5$  (C)  $1 \pm 0,2$  – Abb. 46 (A)  $1,2 \pm 1,5$  (C)  $0,1 \pm 1,3$ )



**Abb. 45: Gruppe 1: Verteilung der Stammzellen im Kammergewebe, Ischämie vs. Kontrolle unabhängig von der Zeit (t-Test  $p = 0.078$ ) A = Ischämisches Kammergewebe, B = Kontrollkammer Ordinatenergebnisse der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**



**Abb. 46: Gruppe 2: Vergleich der Verteilung epithelialer Stammzellen zwischen Kontroll- und Ischämiegebieten unabhängig vom Zeitpunkt (t-Test  $p = 0.0411$ ) C = Ischämisches Kammergewebe, D = Kontrollgewebe Ordinatenergebnisse der Stammzellen sind in absoluten Zahlen angegeben.**

Abschließend versuchten wir die Frage zu beantworten ob die Art des Gewebes einen Einfluss auf die Migration der Stammzellen haben würde. Zu diesem Zweck verglichen wir die absoluten Stammzellcounts zwischen Lunge und Kammer unter Berücksichtigung der Ischämie zum Einen (a) und ohne Berücksichtigung dieser zum Anderen (b). Wir konnten zeigen, dass die Mittelwerte der Stammzellcounts in Lungengewebe ( $a = 2.1 \pm 0.5$ ;  $b = 1.4 \pm 0.3$ ) und Kammergewebe ( $a = 1.2 \pm 0.5$ ;  $b = 0.65 \pm 0.3$ ) keine signifikanten Unterschiede aufweisen ( $p_a = 0.2168$ ;  $p_b = 0.828$ ). So lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Unterschiedlichkeit des Gewebes keinen Einfluss auf das Verhalten der Stammzellen hat.

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde das Modell zur Transplantation pulmonalen Gewebes in die Rückenhautkammer der Nacktmaus fortgeführt. Es konnten die folgenden Ergebnisse über die Auswirkungen eines Ischämie-Reperfusionsschadens für die Kapillardichte im Gewebe und das Homing epithelialer Stammzellen in geschädigtes Gewebe erarbeitet werden:

1. Das Gewebe der Rückenhautkammer, sowie das der ektopen Lungenstücke reagiert im Charakterisierungsversuch und in den Stammzellversuchen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden mit einer Verringerung der Kapillardichte. Die veränderte Kapillardichte ist dabei Ausdruck der Schädigung im Gewebe. Umbauvorgänge im Sinne eines Reparaturmechanismus führen innerhalb weniger Tage zu einer Rückkehr der Kapillardichte auf das Ausgangsniveau vor Ischämiesetzung.
2. Wenn man davon ausgeht, dass eine längere Ischämiezeit, z.B. drei Stunden im Gewebe einen stärkeren Schaden hervorruft, als eine kürzere, einstündige Ischämie, dann zeigt sich dies jedoch nicht in einer signifikant stärkeren Minderung der Kapillardichte. Zur Beurteilung der Schwere des Ischämie-Reperfusionsschadens scheint die Kapillardichte kein geeigneter Parameter zu sein.
3. Die Zahl der Leukozyten wurde über einen Zeitraum von drei Tagen in ischämischen und nicht ischämischen Lungenarealen beobachtet. Dabei konnte im Vergleich zum Ausgangswert vor Ischämie im jeweiligen Gewebe keine signifikante Änderung der Leukozyten über die Zeit festgestellt werden. Daraus schließen wir, dass die Anzahl der Leukozyten nicht mit der Schwere eines Lungenschadens korreliert, sondern eher allgemein für die Schädigung des Gewebes spricht.
4. Epitheliale Stammzellen zeigen sowohl in den ektopen Lungen, als auch in der Kammer eine signifikante Tendenz in ischämisches Gewebe einzuwandern. Das jeweilige Kontrollgewebe zeigte im Vergleich dazu eine deutlich schwächere Einwanderung von Progenitorzellen.  
Welche molekularen Mechanismen dieses Homing epithelialer Stammzellen in Schadensareale vermitteln, geht über die Aussagekraft des durchgeführten *in vivo* Versuchs hinaus.

5. Epitheliale Stammzellen zeigen keine Präferenz für einen bestimmten Gewebetyp. So ließen sich keine signifikanten Abweichungen der Stammzellverteilung zwischen Lunge und Kammer feststellen, weder mit noch ohne Berücksichtigung der Ischämie.

Offensichtlich ist der Schaden und nicht das Gewebe selbst adäquater Stimulus für eine Wanderung epithelialer Stammzellen in das jeweilige Organ.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **5.1.1 Diskussion des Modells**

Die Rückenhautkammer der Maus hat sich seit ihrer Erstbeschreibung durch Lehr et al. [1993] in den vergangenen Jahren als ein vielseitiges Modell zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen erwiesen.

Durch die Präparation des in der Rückenhaut lokalisierten, quergestreiften Skelettmuskels (*Musculus cutaneus maximus*) ist es unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich, die gesamte Mikrozirkulation bestehend aus terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen einzusehen und ihre mikrohämodynamischen Parameter quantitativ zu erfassen (Laschke 2002).

Ein großer Vorteil des Kammermodells, im Gegensatz zu sog. „Akut-Modellen“, ist die Möglichkeit den Einfluss des mikrochirurgischen Traumas und der Anästhesie auf ein Minimum zu beschränken, da sich an die Kammerpräparation erst eine Erholungsphase von einigen Tagen anschließt. Außerdem handelt es sich um ein chronisches Mikrozirkulationsmodell, soll heißen, dass repetitive Untersuchungen auch in kürzeren Abständen möglich sind.

Da das schützende Deckglas der Rückenhautkammer kurzzeitig entfernt werden kann und somit die Möglichkeit besteht, auf einfache Weise verschiedene Gewebearten in die Kammer zu transplantieren und deren Neovaskularisierung zu beobachten, eignet sich das Modell insbesondere auch für Studien zur Angiogenese (Asaishi 1981, Endrich 1982, Reinhold und Endrich 1986).

Nachteilig am Kammermodell der Maus ist die große Fragilität der Versuchstiere. Zahlreiche Schritte der Kammerpräparation und die nachfolgenden Untersuchungsmethoden sind mit intraperitonealer Anästhesie der Tiere verknüpft und führen nicht selten zu einem vorzeitigen Ableben dieser. Daraus resultieren neben höheren Kosten, v.a. bei den Nacktmäusen, auch Verzögerungen in der Planung und Durchführung der Versuche.

In der vorliegenden Studie wurde ektopes Lungengewebe in die Rückenhautkammer verpflanzt. In einer vorgeschalteten Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Neueinsprossung von Gefäßen aus der Kammer die Lungenwürfel nach ungefähr zehn Tagen optimal durchblutet sind. Das Setzen eines Ischämie-Reperfusionsschadens simuliert die

Verhältnisse einer Gewebereaktion, wie sie z.B. bei myokardialem oder zerebralem Infarkt auftritt oder bei der Transplantation solider Organe (Hamacher 2007).

Das Setzen der Ischämie mit einem Gummistempel führt optimalerweise lediglich zu einer Kompression der zuführenden Arteriolen des Zielgewebes. Praktisch ist dieses Ziel jedoch kaum zu realisieren und es kommt häufig auch zu einer Mitbeteiligung der umliegenden Kammer und im schlechtesten Fall auch zu einer Mitbeteiligung der Kontrolllungen, bzw. ihrer versorgenden Gefäße.

Die Beurteilung der Perfusionsverhältnisse der geschädigten Lunge erfolgt über intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Die Mitbeteiligung des Kammergewebes ist nicht selten von einer Ödembildung begleitet, welche die Qualität der Bilder im Mikroskop und damit die Beurteilbarkeit der Zirkulation stark behindert, wenn nicht sogar unmöglich macht. Hier bestehen noch Möglichkeiten das Modell zu verbessern.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein Xenograftmodell. Bei diesen Versuchen werden lebens- und funktionstüchtige Zellen oder Zellverbände (einschließlich ganzer Organe oder Körperteile) zwischen verschiedenen Spezies übertragen. In unserem Versuch injizierten wir epitheliale Stammzellen, sog. „skin derived keratinocytes“ welche zuvor aus der Epidermis adulter Ratten gewonnen wurden, in das venöse System transgener CD1 Nacktmäuse.

Xenograftmodelle finden häufig Verwendung in der Tumorforschung. Meist werden hier spezies-fremde, oft humane Tumorzelllinien in immundefiziente Mäuse transplantiert. Der Einsatz immundefizienter Empfängertiere ist bei Xenograftmodellen erforderlich, um einer Abstoßungsreaktion vorzubeugen.

In-vivo Modelle, zu denen auch die Xenograftmodelle gehören, ermöglichen eine realistische Annäherung an komplexe biologische Abläufe im Organismus der Säugetiere. Im Fall der Tumorforschung geht es dabei u.a. um Metastasierungskaskaden, insbesondere die Interaktionen zwischen der Tumorzelle und dem sie umgebenden Gewebe. In unserer Studie versuchten wir die Mechanismen von Adhäsion und Migration epithelialer Progenitorzellen in geschädigtem Lungengewebe nachzuziehen.

Bei der Untersuchung der Ergebnisse von Xenograft-Modellen ist zu beachten, dass nicht von absoluter Homologie zwischen Wirt und Spender ausgegangen werden kann. Obwohl sich die Genome von Ratten, Mäusen und Menschen sehr ähneln (40% des Erbguts und 90% der Gene sind bei Mensch, Maus und Ratte gleich), so besteht doch Grund zur Annahme, dass auf molekularer Ebene Unterschiede bestehen (Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004).

In einer Studie gelang Goodwin et al. die Isolierung und Charakterisierung von komplementärer DNA (cDNA), welche die genetische Information für beide TNF-Rezeptoren



der Maus beinhaltet. Ähnlich wie im Fall der humanen Form ist die Ähnlichkeit der Rezeptoren untereinander gering (28 % Identität) und beschränkt sich auf die extrazellulären Domänen, während sich die transmembranen und zytoplasmatischen Regionen unterscheiden. Im Gegensatz dazu ist die Homologie zwischen den analogen Rezeptoren beider Spezies wesentlich höher (65% Identität) und bezieht sich auf das gesamte Protein. Auch scheint das Bindungsverhalten zwischen den analogen Rezeptoren beider Spezies weitestgehend gleich zu sein, wobei von bis zu 3 verschiedenen Bindungsaffinitäten auszugehen ist. (Goodwin 1991).

TNF- $\alpha$  gehört zur TNF Superfamilie von Molekülen, zu denen u.a. auch TNF-  $\beta$  gehört. Sie binden an spezifische membranständige Rezeptoren, die zur TNF-Rezeptor Superfamilie gehören (Gravestain und Borst, 1998). Die biologische Hauptaufgabe von TNF- $\alpha$  ist die Induktion von Genen, die einen wichtigen Beitrag zu Differenzierung, Proliferation und antiviraler Aktivität, zu Immunmodulation und bei Entzündungsprozessen leisten. TNF besitzt außerdem noch diverse zytotoxische Effekte (Beyaert und Fiers, 1998). In Anbetracht der o.g. Erkenntnisse ist anzunehmen, dass einige der Effekte von der Nager- Form des Tumornekrosefaktors auch im Menschen und vice versa übermittelt werden können, obwohl sicherlich nicht die Liganden von einer Spezies zur Anderen an TNF-Rezeptoren I und II gebunden werden können. Ein zentrales Thema der vorliegenden Arbeit war das Homing von Stammzellen in xenogenes Gewebe.

Homing ist ein koordinierter, in verschiedenen Stufen ablaufender Prozess, in den u.a. Signalwege von SDF-1 (stromal derived factor 1) und SCF (stem cell factor), die Aktivierung des LFA-1 (lymphocyte-function-associated antigen 1), VLA 4/5 (very late antigen 4/5) und CD 44, Rearrangement des Zytoskeletts, sowie Aktivierung der MT1-MMP (membrane type 1-matrix metallo proteinase) und Sekretion von MMP 2/9 involviert sind (Lapidot 2005).

In zwei großen präklinischen Studien wurde das Homing humaner Progenitorzellen in Mäusen untersucht. Zanjani et al. etablierten ein Modell, in dem unreife humane CD34+ und CD34- in präimmune Schaffeten implantiert wurden. Nach 24 und 48 h konnten die implantierten Stammzellen im Knochenmark der Wirtstiere gefunden werden (Zanjani 1999).

Das zweite Modell bediente sich immundefizienter Mäuse, welche zuvor mit subletalen Dosen bestrahlt wurden (total body irradiation, TBI). Nachdem normale und leukämische humane Stammzellen transplantiert worden waren, konnte im Knochenmark der Empfängertiere humane Hämatopoese festgestellt werden (Lapidot 1994).

Trotz der Diversität zwischen der menschlichen Spezies und der von Ratte und Maus, lassen sich wie beschrieben viele biologische Mechanismen anhand geeigneter Maus- und Rattenmodelle simulieren. Die Studienlage legt nahe, dass von weitestgehender Homologie ausgegangen werden kann.

### 5.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie angewendet, da sie gerade für die Untersuchung dynamischer Prozesse, wie der Angiogenese transplantierten Gewebes, eine ideale Untersuchungstechnik darstellt (Laschke 2002).

In der Vergangenheit machte man sich diese Methode bereits zur Beurteilung anderer Organsysteme zunutze, beispielsweise zur Untersuchung der Mikrozirkulation von Herz (Tillmanns 1989), Hirn (Kawamura 1990), Lunge (Kuhnle 1990), Leber (Vollmar 1998), Pankreas (Endrich 1990), Pankreas-Inseln (Vajkoczy 1999a), Milz (McCuskey 1977), Magen (Koo 1982), Darm (Koo und Leung 1990), Skelettmuskel (Henrich 1978) und Knochen (Winet 1989). In der vorliegenden Studie konnten damit sowohl sämtliche Gefäßabschnitte der Rückenhautkammer-Präparation als auch die sich entwickelnden mikrovaskulären Netzwerke innerhalb der transplantierten Lungen über einen längeren Zeitraum detailliert dargestellt und Veränderungen der Angioarchitektur und Mikrohämodynamik erfasst werden.

Die Intravitalmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation in transgenen Mäusen eröffnet für die Zukunft eine potente Methode um neue Einblicke in Mechanismen zu erlangen, welche Gefäßtonus und Perfusion pulmonaler Gefäße, Zellinteraktionen und Zellmigration regulieren (Tabuchi 2008).

Die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie erlaubt außerdem unter Zuhilfenahme der Epiluminationstechnik die Analyse verschiedener zellulärer und molekularer Phänomene. Nach intravenöser Verabreichung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe besteht beispielsweise die Möglichkeit, das Fließverhalten von Leukozyten und Thrombozyten optisch darzustellen (Menger 1992b, Hoffmann 1999 und 2000), zelluläre Schädigungen wie Apoptose (Westermann 1999) und Nekrose (Harris 1997) zu beurteilen und Veränderungen der Gefäßpermeabilität zu erkennen (Pries 1988).

In unserer und vorangehenden Studien konnten wir zeigen, dass auch Stammzellen, sowohl epithelialer, als auch endothelialer Herkunft, im Intravitalmikroskop in Kombination mit einem Rotlichtfilter visualisierbar sind. Bei Einsatz der intravitale Fluoreszenzmikroskopie sollte darauf geachtet werden, dass die Untersuchungszeit so kurz wie möglich gehalten wird, um phototoxische Effekte auf das betreffende Gewebe zu vermeiden.

Phototoxische Effekte können direkt durch Überwärmung bei einer hohen Intensität bzw. langen Einwirkungsdauer des Lichts oder indirekt durch die Anregung der verwendeten Fluorochrome induziert werden, die das Gewebe durch Bildung freier Sauerstoffradikale schädigen (Laschke 2002).

Ein limitierender Faktor intravitale Mikroskopie ist der Umstand, dass nur Gefäßnetzwerke an der Organoberfläche beurteilt werden können. Diese sind in ihrem Verhalten nicht notwendigerweise repräsentativ für tiefer im Parenchym lokalisierte Blutgefäße (Tabachi 2008). In unserer Studie wurde ebenfalls nach Entfernen der Pleura, subpleurales Lungparenchym entnommen und in die Rückenhautkammer implantiert. Subpleurale Gefäßnetzwerke der Lunge sind im Vergleich zu tiefer liegenden Organschichten weniger dicht und bestehen aus großlumigeren Kapillaren (Schraufnagel 1986, Short 1996).

In histologischen Studien und auch in Analysen des regionalen Blutflusses unter Zuhilfenahme radiomarkierter Mikrosphären, konnte gezeigt werden, dass subpleurale Gefäße grundsätzlich den gleichen Prinzipien vaskulärer Regulation folgen, wie z.B. Charakteristiken des „capillary recruitment“ (Short 1996) oder hypoxischer Vasokonstriktion mit Umverteilung des regionalen Blutflusses (Groh 1995).

Diese Umstände müssen bedacht werden, wenn man Rückschlüsse des reaktiven Verhaltens subpleuraler Gefäße auf die gesamte Lunge zieht, da es dort quantitative Unterschiede betreffend Gefäßtonus und Vasoaktivität geben kann (Hakim 1992).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Transplantation und Revaskularisierung ektopen Lungengewebes**

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ektop transplantiertes Lungengewebe nach ca. 10 Tagen seine optimale Revaskularisierung in der Rückenhautkammer der Maus erreicht. Innerhalb des zehntägigen Untersuchungszeitraums konnten in der Mikrozirkulation der Rückenhautkammer keine Entzündungszeichen im Rahmen einer möglichen Gewebeabstoßung nachgewiesen werden. (Promotionsarbeit N. Regelin) Lediglich nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden, welcher an Tag 10 gesetzt wird, ist eine Ödembildung zu beobachten, welche am ehesten auf eine Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität zurückzuführen ist.

Der zu Anfang erwähnte fehlende Nachweis einer inflammatorischen Reaktion während der Revaskularisierungsphase ist gerade in einem Modell zur Untersuchung physiologischer Angiogenese von elementarer Bedeutung, da aus anderen Studien bekannt ist, dass durch eine Entzündung mit leukozytärer Aktivierung und Gewebeeinfiltration die pathologische Bildung neuer Blutgefäße induziert werden kann (Laschke 2002).

Darüber, ob die nach Ischämie verzeichnete Zunahme der Kapillardichte in der geschädigten Lunge ggfs. zu Teilen auf das Konto pathologischer Gefäßbildung geht, lässt sich noch keine Aussage machen. Die Beobachtung, daß die Transplantate in der Rückenhautkammer nicht abgestoßen wurden, kann dabei an der geringen Immunreaktivität der in Inzucht gezüchteten Empfängertiere liegen (Handler 1974).

### 5.2.2 Homing epithelialer Stammzellen in geschädigtem Lungengewebe

Die wichtigste Beobachtung dieser Studie war, dass in dem durch den Ischämie-Reperfusionsschaden induzierten schweren akuten Lungenschaden des ektopen Lungengewebes der Rückenhautkammer, die Inkorporation von intravenös verabreichten epithelialen Stammzellen im geschädigten pulmonalen Gefässbett und im geschädigten Gewebe stattfand. Dieses „Homing“ der ex vivo generierten epithelialen Stammzellen war signifikant deutlicher im ischämisierten Lungen- und Kammergewebe zu sehen als im Kontrollgewebe.

Wir konnten auch erarbeiten, dass ein Tropismus dieser Zellen zu vaskulogenen oder Wundheilungsgebieten besteht, welcher unabhängig vom Typ des Gewebes ist. Für diese Beobachtung spricht, dass auch andere Organe wie Leber, Milz, Niere, Magen oder Darm

kein detektierbares Homing zeigten. Einzige Ausnahme dabei war subkutan appliziertes Matrigel, in welches wenige Zellen in vivo einwanderten (Hamacher 2007).



**Abb. 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme epithelialer Stammzellen im Lungengewebe.** Durch die Inkubierung der Progenitorzellen mit dem Farbstoff SP-DiIC<sub>18</sub>, lassen sich diese unter Grünlicht-Epiillumination als weiße Punkte darstellen.

Die adulte Lunge ist ein vitales und komplexes Organ mit einem äußerst langsamen Zellumsatz. Das Epithel, welches die oberen und unteren Atemwege auskleidet ist einer konstanten Belastung durch potenziell toxische Substanzen und Pathogene der Umwelt ausgesetzt. In den vergangenen Jahren zielten zahlreiche Studien darauf ab diese Gegebenheiten in der Maus zu imitieren. Dabei entdeckte man, dass sich die jeweiligen Regionen des Respirationstraktes, d.h. Trachea und große Bronchien bzw. Bronchiolen und Alveolen, unterschiedlicher Stammzellen und Strategien bedienen um das Gewebe instand zu halten und nach Schädigung zu reparieren. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass differenzierte Epithelzellen unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind zu proliferieren und zu transdifferenzieren (Rawlins 2006).

Unter Transdifferenzierung versteht man hierbei die Transformation eines exakt definierten und differenzierten Zellphänotyps in einen ebenso exakt definierten anderen Zelltyp ohne vorhergehende Zellproliferation (Rawlins 2006).

Im Kontext der vorliegenden Studie fällt unser Augenmerk jedoch weniger auf die ortsständige Stammzellfunktion, als vielmehr auf zirkulierende *ex vivo* generierte epitheliale Zellen.

In anderen Organsystemen konnte ein regeneratives Potenzial selbiger bereits bewiesen werden:

So gelang es, bei nach Bestrahlung ablatierten Patienten, alle Zellreihen des hämatopoetischen Systems nach intravenöser Stammzellapplikation zu regenerieren.

Ebenso können dissoziierte Hepatozyten, nach Injektion in die Portalvene, geschädigtes Lebergewebe ersetzen (Overturf 1999).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Shackleton 2006 gelang es eine komplette Mäusebrustdrüse aus einer einzelnen Epithelzelle zu züchten, nachdem sie in mammäres Fettgewebe implantiert worden war.

Vergleichbare *in vivo* Studien existieren bisher nicht für die Lunge.

Dennoch scheint ein generelles regeneratives Potenzial in epithelialen Zellen und Progenitorzellen vorhanden zu sein. Diese Beobachtungen sind konform mit denen, welche in einer Studie mit endothelialen Stammzellen (EPC) gemacht wurden:

Hamacher et al. konnten untermauern, dass EPC, nach linksseitiger Lungentransplantation mit einseitigem akuten Lungenschaden durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden, selektiv in der geschädigten linksseitigen, nicht aber in der transplantierten Lunge vorhanden waren (Hamacher 2007).

Ein dem unseren nahezu identisches Modell bediente sich ebenfalls endothelialer Stammzellen (EPC) um das Verhalten dieser nach intravenöser Applikation zu beobachten.

Auch hier fanden sich die Zellen in dem durch Ischämie-Reperfusion geschädigten Gewebe wieder, während die Kontroll-Lungenwürfel der Rückenhautkammerpräparation, sowie Organsysteme wie Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge und Darm ausgespart wurden (Diplomarbeit S.Muralt 2007).

Das Homing der ex vivo gezüchteten endothelialen und epithelialen Stammzellen in geschädigtes Lungengewebe legt die Hypothese nahe, dass es Reparaturmechanismen in der Lunge gibt, welche bei akutem Lungenschaden auftreten und Signalkaskaden initiieren, welche zur Migration derselben führen. Zu einem solchen Defekt gehören nicht nur die kapilläre Schrankenstörung, welche die Grundlage des transmuralen Lungenschadens ist, sondern auch der Zelltod (Bachofen und Weibel 1977, Bernard 1994).

Eine grosse Anzahl von Kapillaren geht jedenfalls während eines akuten Lungenschadens, z.B. bei Sepsis, zugrunde, und Endothelzellen gehen dabei in Apoptose oder Nekrose. Ebenso kommt es zu vaskulären und alveolären Epithelschäden. Deshalb ist es konzeptuell nachvollziehbar, dass EPC und SDKer an denjenigen pulmonalen und pulmonal-vaskulären Stellen ein Homing machen könnten, wo adulte Endo- und Epithelzellen untergegangen sind (Hamacher 2007).

### **5.2.3 Einfluss der Ischämie auf Kapillardichte in Lungen- und Kammergewebe**

Die Ischämie, welche durch mechanischen Druck der Stempelapplikation auf das Gewebe der Rückenhautkammer verursacht wird, führt sowohl in Lungen- als auch in Kammergewebe zu einer Reduktion der messbaren Kapillardichte.

Im Charakterisierungsversuch, in dem einstündige und dreistündige Ischämie einander gegenübergestellt wurden, konnten wir keinen Zusammenhang zwischen Dauer der Ischämie und Ausmaß des Kapillarverlusts, gemessen an der Kapillardichte, feststellen.

So kann man zwar sagen, dass es generell nach Ischämie zu einer Abnahme der Kapillardichte kommt, jedoch nicht dass ein großer Kapillarverlust gleichbedeutend mit einem größeren Gewebsschaden ist.

Da es sich in unserem Modell um einen Gummistempel handelte, dessen Druck auf das Gewebe über eine manuell eingestellte Schraube reguliert wurde, kann man nicht von einem standardisierten Verfahren sprechen. Diese Tatsache erklärt auch eventuelle Mitbeteiligungen von Kontrollgewebe, die durch einen zu starken Druck auf das Zielgewebe verursacht wurden.

#### **5.2.4 Einfluss der Ischämie auf Leukozytencounts im Lungen- und Kammergewebe**

Im Charakterisierungsversuch konnten wir feststellen, dass die Ischämie in den betroffenen Lungenabschnitten zu einer ausgeprägten Leukozytenantwort führt, welche sich jedoch nicht signifikant von der im Kontrollgewebe unterscheidet und somit nicht zur Beurteilung der Schwere eines Ischämie-Reperfusionsschadens herangezogen werden kann.

Hierfür spricht auch die Tatsache, dass bereits vor Ischämie in unseren Versuchstieren viele Leukozyten in den transplantierten Lungenstücken gefunden werden konnten. Dass Leukozyten auch in Kontrollabschnitten zu sehen waren, kann auch durch akzidentelle Mitbeteiligung ihrer Blutversorgung während der Ischämie geschehen sein.

Dieser Problematik liegt zugrunde, dass in der kleinen Rückenhautkammer immer drei Lungenwürfel anzuordnen waren. Es entstand häufig die Situation, dass die einzelnen Lungen eine nicht voneinander unabhängige Blutzufuhr besaßen.

Die Mitbeteiligung der Kontrolllunge/n bei der Ischämisierung war daher bisweilen unumgänglich.

#### **5.3 Schlussfolgerung**

Die Forschung der letzten Jahre und die aktuelle Datenlage machen die Annahme, zirkulierende Stammzellen könnten in geschädigtes Lungengewebe migrieren, sehr wahrscheinlich. Auch unsere Studie gibt uns Anlass die Integration von Vorläuferzellen in die geschädigte Lunge als gesichert zu betrachten. Diese intravenös applizierten epithelialen Stammzellen könnten bei der Wiederherstellung des respiratorischen Epithels, v.a. in den Alveolen, eine wichtige Rolle spielen. Der Nachweis einer solchen Aktivität ging über den Umfang des vorliegenden Experiments hinaus, es wurde jedoch bereits in zwei Studien (Krause 2001, Kotton 2001) beschrieben, dass kulturell angezüchtete Knochenmarkszellen nach Transplantation als Vorläufer für Typ I Pneumozyten dienen können und insofern die Fähigkeit besitzen Alveolarepithel zu formen. Die Arbeit von Rawlins aus dem Jahr 2006 zeigt eine andere Seite der Lungenreparatur auf: So gelang es, mit Hilfe eines Xenograft-Modells an der Ratte und einer Migrationsstudie zu beweisen, dass auch ortsständiges Epithel die Fähigkeit zu physiologischem Zellersatz im Sinne einer physiologischen Gewebemöostase, sowie nach Schädigung der Lunge, beibehalten hat.

Diese Diversität der Reparaturmechanismen ist ungewöhnlich im menschlichen Organismus, erscheint jedoch als einleuchtend, wenn man bedenkt, dass im Falle eines Epithelschadens dieser so schnell wie möglich repariert werden muss.

Die Möglichkeit, dass multiple Zelltypen innerhalb der Lunge proliferieren können und als Vorläufer für neues Gewebe zur Verfügung stehen, ist wahrscheinlich von Vorteil (Rawlins 2006).

#### **5.4 Aktuelle Studienlage und klinische Perspektiven**

Es bestehen große Hoffnungen, dass es eines Tages möglich sein wird, durch exogene oder mobilisierte endogene Stammzellen akute und chronische Lungenkrankheiten verhindern oder behandeln zu können und eventuell sogar abnorm entwickeltes oder untergegangenes Gewebe zu regenerieren.

Unser Verständnis von pulmonalen Stammzellen und der Regulation von Lungenmorphogenese ist nach wie vor rudimentär und die komplexen, integrierten Funktionen verschiedener Zelltypen in der normalen Lunge stellen uns vor große Herausforderungen.

So wird es nötig sein bessere Zellmarker zu entwickeln um die einzelnen Zelltypen der Lunge ganz unmissverständlich identifizieren zu können (Rawlins 2006).

Auch dürfte das Studium von embryonaler, fetaler und nicht zuletzt auch frühkindlicher Entwicklung und von entsprechend abgeleiteten Schadensmodellen (Martin 2003), aber auch das Nachvollziehen von Verbindungen verschiedener Zelllinien und derer Bestimmungswege in Embryonen und adulten Organismen (Rawlins 2006) neue Erkenntnisse zu Reparatur und Regeneration liefern (Kusano 2005, Asai 2006, Pola 2003).

Stammzellbasierte Therapien könnten bei nicht-hämatologischen Krankheiten zum Teil zu einer Alternative gegenüber gentherapeutischen Ansätzen werden. Kombinationen aus gentherapeutischen Ansätzen zur Mobilisation von Zellen oder zur Angiogenese, zusammen mit einer Stammzellmobilisation oder -therapie, sowie weitere Therapiekombinationen dürften neue pathophysiologische und therapeutische Erkenntnisse bieten (Kusano 2005, Asai 2006, Pola 2003).



## 6 Literaturverzeichnis

**Aarif, Y.**, Khakoo, Finkel, T.: Endothelial Progenitor Cells. *Ann.Rev.Med.* 56:79-101, 2005.

**Abe, S.**, C. Boyer, X. Liu, F.Q. Wen, T. Kobayashi, Q. Fang, X. Wang, M. Hashimoto, J.G., Sharp, S.I., Rennard. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1158-1163, 2004.

**Abraham, E.**, Arcaroli, J., Carmody, A., Wang, H., Tracey, K.J.: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 165:2950-2954, 2000a.

**Adamson, I.Y.R.**, Hedgecock, C., Bowden, D.H.: Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am. J. Pathol.* 137: 385-392, 1990.

**Algire, G.H.** An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 4:1-11, 1943.

**Arfors, K.E.**, Jonsson, J.A., McKenzie, F.N. A titanium rabbit ear chamber: assembly, insertion and results. *Microvasc. Res.* 2:516-519, 1970.

**Asahara, T.**, Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J.M. VEGF contributes to postnatal vascularization by mobilizing bone marrow derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964- 3972, 1999.

**Asahara, T.**, Masuda, H., Takahashi, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85:221-228, 1999.

**Asai, J.**, Takenaka, H., Kusano, K.F., Ii, M., Luedemann, C., Curry, C., Eaton, E., Iwakura, A., Tsutsumi, Y., Hamada, H., Kishimoto, S., Thorne, T., Kishore, R., Losordo, D.W.: Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 113:2413-2424, 2006.

**Asaishi, K.**, Endrich, B., Götz, A., Messmer, K.: Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 41: 1898-1904, 1981.

**Assmus, B.**, Schachinger, V., Teupe, C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106:3009-3017, 2002.

**Bachofen, M.**, Weibel, E.R.: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116:589-615, 1977.

**Barker, J.H.**, Hammersen, F., Bondar, I., Uhl, E. The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plastic Reconstructive Surg.* 83:948-959, 1989.

**Baumhueter, S.**, Dybdal, N., Kyle, C., Lasky, L. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucine-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84:2554-2565, 1994.

**Benninghoff**, Drenckhahn: Anatomie 16. Auflage, Urban & Fischer Verlag München, Jena, 2003.

**Bernard, G.R.**, Artigas, A., Brigham, K.L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J.R., Morris, A., Spragg, R.: The American European consensus conference on ARDS: definitions mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination.

Am J Respir Crit Care Med:149:818–824, 1994.

**Beyaert, R.**, Fiers, W.: Tumor necrosis factor and lymphotoxin. Cytokines, edited by Mire-Sluis, A. & Thorpe, R., Academic Press, 1998.

**Bjornson, C.R.**, Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., Vescovi, A.L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science 283 534-537, 1999.

**Bogers, A.J.J.C.**, Gittenberger-de-Groot, A.C., Poelmann, R.E., Péault, B.M., Huysmans, H.A. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? Anat Embryol 180:437-441, 1989.

**Bompais, H.**, Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X.H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., Uzan, G. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties as compared to mature vessel wall endothelial cells. Blood 103:2577-2584, 2004.

**Borovikova, L.V.**, Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J.: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature 405:458-462, 2000.

**Briel, M.**, Meade, M., Mercat, A., Brower, R.G., Talmor, D., Walter, S.D., Slutsky, A.S., Pullenayegum, E., Zhou, Q., Cook, D., Brochard, L., Richard, J-C.M., Lamontagne, F., Bhatnagar, N., Stewart, T. E., Guyatt, G.: Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Systematic review and meta-analysis, JAMA 303(9): 865-873, 2010.

**Bühling, K.J.**, Lepenies, J., Witt, K. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, Urban & Fischer, 3. Auflage, 2004.

**Bull, T.M.**, Golpon, H., Hebbel, R.P., Solovey, A., Cool, C.D., Tuder, R.M., Geraci, M.W., Voelkel, N.F.: Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. Thromb Haemost 90:698-703, 2003.

**Carmeliet, P.**, Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Kendraprasad, H., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380:435-439, 1996.

**Carmeliet, P.** Angiogenesis in health and disease. Nat med 9:653-660, 2003.

- Carpenter, T.C.**, Schomberg, S., Stenmark, K.R.: Endothelin-mediated increases in lung VEGF content promote vascular leak in young rats exposed to viral infection and hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L1075-L1082, 2005.
- Clauss, M.**, Pipp, F., Issbrucker, K., Weich, H., Heil, M., Schaper, W.: Dissection of monocyte and endothelial activities by using VEGF-receptor specific ligands. *Adv Exp Med Biol* 522:75-82, 2003.
- Coffin, J.D.**, Poole, D.J. Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development. *Anat Rec* 231:383-395, 1991.
- DeLisser, H.M.**, Newman, P.J., Albelda, S.M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today* 15:490-495, 1994.
- Deveraux, Q.L.**, Reed, J.C.: IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252, 1999.
- Deveraux, Q.L.**, Schendel S.L., Reed, J.C.: Antiapoptotic proteins: the bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 19:57-74, 2001.
- Dieterlen-Lievre, F.** Hemopoietic cell progenitors in the avian embryo: origin and migrations. *Ann NY Acad Sci* 511:77-87, 1987.
- Donovan, P. J.**, Gearhart, J.: The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97, 2001.
- Eglitis, M.A.** and Mezey, E.: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4080-4085, 1997.
- Endrich, B.**, Klar, E., Messmer, K.: The microcirculation of the pancreas: State of the art. *Prog Appl Microcirc: Clin Exp* 17: 144-174, 1990.
- Endrich, B.**, Hammersen, F., Götz, A., Messmer, K.: Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst* 68: 475-485, 1982.
- Epperly, M.W.**, H. Guo, J.E. Gretton, and J.S. Greenberger. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:213-224, 2003.
- Everett, M.M.**, King, R.J., Jones, M.B., Martin, H.M.: Lung fibroblasts from animals breathing 100% oxygen produce growth factors for alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* 259: L247-L254, 1990.
- Feinberg, R.N.**, Noden, D.M. Experimental analysis of blood vessel development in the avian wing bud. *Anat Rec* 231:136-144, 1991.
- Ferrara, N.**, Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442, 1996.
- Ferrari, G.**, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.

Science 279: 1528-1530,1998.

**Fiebig, E.**, Ley, K., Arfors, K.E. Rapid leukocyte accumulation by „spontaneous“ rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int. J. Microcirculation: Clin. Exp.*, 10: 127-144, 1991.

**Fiuza, C.**, Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, J.H., Suffredini, A.F.: Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101:2652-2660, 2003.

**Folkman, J.**, Shing, Y., Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934, 1992.

**Flamme, I.** and Risau, W. Introduction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 116:435-439, 1992.

**Fosse, E.**, Pillgram-Larsen, J., Svennevig, J.L., Nordby, C., Skulberg, A., Mollnes, T.E., Abdelnoor, M.: Complement activation in injured patients occurs immediately and is dependent on the severity of the trauma. *Injury* 29:509-514, 1998.

**Fuchs, E.**, Tumber, T., Guasch, G.: Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778, 2004.

**Fuchs-Buder, T.**, de Moerloose, P., Ricou, B., Reber, G., Vifian, C., Nicod, L., Romand, J.A., Suter, P.M.: Time course of procoagulant activity and D dimer in bronchoalveolar fluid of patients at risk for or with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 153:163-167, 1996.

**Gattinoni, L.**, Caironi, P.: Refining ventilatory treatment for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *JAMA*, 299(6) 691-693, 2008.

**Gehling, U.M.**, Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schunch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D.K., and Fiedler, W., in vivo differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112, 2000.

**Giangreco, A.**, Reynolds, S. D. and Stripp, B. R.: Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am. J. Pathol.* 161, 173-182, 2002.

**Godzich, M.**, Hodnett, M., Frank, J.A., Su, G., Pespeni, M., Angel, A., Howard, M.B., Matthay, M.A., Pittet, J.F.: Activation of the stress protein response prevents the development of pulmonary edema by inhibiting VEGF cell signaling in a model of lung ischemia-reperfusion injury in rats. *FASEB J* 20:1519-1521, 2006.

**Gonzalez-Crussi, F.** Vasculogenesis in the chick embryo: An ultrastructural study. *Am J Anat* 130:441-460, 1971.

**Grant, M.B.**, May, W.S., Caballero, S. et al.: Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8:607-612, 2002.

- Gravestein, L.A.**, Borst, J.: Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin. Immunol.* 10: 423-434, 1998.
- Greene, A.K.**, Alwayn, I.P., Nose, V., Flynn, E. Prevention of intra-abdominal adhesions using the antiangiogenic COX-2 inhibitor celecoxib. *Ann. Surg.* 242:140-146, 2005.
- Grimm, S.** Die Apoptose: Programmierter Zelltod. *Chemie in unserer Zeit*, 37(3): 172-178, 2003.
- Groh, J.**, Kuhnle, G.E., Ney, L., Sckell, A., Goetz, A.E.: Effects of isoflurane on regional pulmonary blood flow during one-lung ventilation. *Br J Anaesth* 74: 209–216, 1995.
- Haar, J.L.**, Ackerman, G. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 170:199-224, 1971.
- Hagimoto, N.**, Kuwano, K., Kawasaki, M., Yoshimi, M., Kaneko, Y., Kunitake, R., Maeyama, T., Tanaka, T., Hara, N.: Induction of Interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation. *Am J Respir Cell Moll Biol* 21:436-445, 1999.
- Hakim, T.S.:** Is flow in subpleural region typical of the rest of the lung? A study using laser-Doppler flowmetry. *J Appl Physiol* 72: 1860–1867, 1992.
- Halter, J.M.**, Steinberg, J.M., Gatto, L.A. et al.: Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. *Crit. Care*, 11(1): R20, 2007.
- Hamacher, J.:** Molekulare und zelluläre Therapieansätze zur Behandlung der pulmonalen endothelialen und epithelialen Dysfunktion. Habilitationsschrift, 2007.
- Hamacher, J.**, Sadallah, S., Schifferli, J.A., Villard, J., Nicod, L.P.: Soluble complement receptor type 1 (CD35) in bronchoalveolar lavage of inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 11:112-119, 1998.
- Handler, A.H.**, Cosman, E.B.: Skin allograft exchange among inbred strains of hamsters. *Life Sci* 14: 1455-1462, 1974.
- Harris, A.G.**, Steinbauer, M., Leiderer, R., Messmer, K.: Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 273: H989-H996, 1997.
- Henrich, H.**, Johnson, P.C.: Influence of arterial pressure on reactive hyperemia in skeletal muscle capillaries. *Am J Physiol* 234: H352-H360, 1978.
- Hillebrands, J.L.**, F.A. Klatter, B.M. van den Hurk, E.R. Popa, P. Nieuwenhuis, and J. Rozing. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 107:1411-1422, 2001.
- His, W.** Lecithoblast und Angioblast der Wirbeltiere. *Abhandl K S Ges Wiss Math-Phys* 22:171-328, 1900.
- Höffeler, F.** Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes. *Biologie in unserer Zeit* 34(1):16-23, 2004.

**Hoffmann, J.N.**, Vollmar, B., Inthorn, D., Schildberg, F.W., Menger, M.D.: The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock* 14: 528-534, 2000.

**Hoffmann, J.N.**, Vollmar, B., Inthorn, D., Schildberg, F.W., Menger, M.D.: A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock* 12: 355-364, 1999.

**Hong, K. U.**, Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hurley, C. M. and Stripp, B. R.: Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 671-681, 2001.

**Horgan, M.J.**, Palace, G.P., Everitt, J.E., Malik, A.B.: TNF-alpha release in endotoxemia contributes to neutrophil-dependent pulmonary edema. *Am J Physiol* 264:H1161-H1165, 1993.

**Hug, H.** Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 30(3):128-135, 2000.

**Huwer, H.**, Nikoloudakis, N., Rissland, J., Vollmar, B. et al. In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia. *J. Surgical Res.* 79:1-7, 1998.

**Imai, Y.**, Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B. et al.: Angiotensin-converting-enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112-116, 2005.

**Imai, Y.**, Kuba, K., Penninger, J.M.: The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *J Exp. Phys.* 93.5: 543-548, 2008.

**Intaglietta, M.**, Tompkins, W.R., Richardson, D.R. Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc. Res.* 2:462-473, 1970.

**Itoh, N.**, Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:223-243, 1991.

**Jackson, K.A.**, Mi, T. Goodell, M.A.: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad, sci USA* 96 14482-14486, 1999.

**Kabrun, N.**, Buhning, H., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., Keller, G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124:2039-2048, 1997.

**Kalka, C.**, Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S.I., Isner, J.M., and Asahara, T. Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *circ Res* 86:1198-1202, 2000.

**Kalka, C.**, Tehrani, H., Laudenberg, B., Vale, P.R., Isner, J.M., Asahara, T., and Symes J.F. Mobilization of endothelial progenitor cells following gene therapy with VEGF165 in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* 70:829-834, 2000.

- Kalka, C.** et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7):3422-3427, 2000.
- Kaner, R.J.**, Crystal, R.G.: Pathogenesis of high altitude pulmonary edema: does alveolar epithelial lining fluid vascularendothelial growth factor exacerbate capillary leak? *High Alt Med Biol* 5:399-409, 2004.
- Kawamoto, A.**, Gwon, H.C., Iwaguro, H., et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103:634-637, 2001.
- Kawamura, S.**, Schürer, L., Goetz, A., Kempski, B., Schmucker, B., Baethmann, A.: An improved closed cranial window technique for investigation of blood brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int J Microcirc: Clin Exp* 9: 369-383, 1990.
- Kerr, J.F.R.**, Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239-257, 1972.
- Khakoo A.Y.**, and Finkel, T.: Endothelial progenitor cells. *Annual Review of medicine* 56:79-101, 2005.
- Kiener, P.A.**, Davis, P.M., Rankin, B.M., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A., Starling, G.C., Liles, W.C.: Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol* 159:1594-1598, 1997.
- Kocher, A.A.**, Schuster, M.D., Szabolcs, M.J. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7:430-436, 2001.
- Konopleva, M.**, Zhao, S., Xie, Z., Segall, H., Younes, A., Claxton, D.F., Estrov, Z., Kornblau, S.M., Andreeff, M.: Apoptosis: molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 457:217-236, 1999.
- Koo, A.**, Leung, F.W.: Microcirculation of the colon: Macromolecular permeability and loss of endothelial viability in experimental colitis in rats. *Prog Appl Microcirc* 17: 90-100, 1990.
- Koo, A.**: Vagotomy attenuates histamine-induced vasodilatation in rat gastric microcirculation. *J Physiol Lond* 325: 23-24, 1982.
- Kotton, D.N.**, Ma, B.Y., Cardoso, W.V., Sanderson, E.A., Summer, R.S., Williams, M.C., Fine, A.: Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128:5181-5188, 2001.
- Kuebler, W.M.**, Parthasarathi, K., Lindert, J., Bhattacharya, J.: Real-time lung microscopy. *J Appl Physiol* 102: 1255–1264, 2007.
- Kuhnle, G.E.**, Leipfinger, F.H., Goetz, A.E.: Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 74: 1462–1471, 1993.

- Kuhnle, G.**, Goetz, A.E., Leipfinger, F.H., Groh, J., Kübler, W.M., Conzen, P.C., Peter, K., Brendel, W.: Microhemodynamics in arteriolar networks of the ventilated lung. *Int J Microcirc: Clin Exp* 9: 21, 1990.
- Kunig, A.M.**, Balasubramaniam, V., Markham, N.E., Seedorf, G., Gien, J., Abman, S.H.: Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L1068-L1078, 2006.
- Kurz, H.**, Gartner, T., Egli, P., Christ, B. First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Dev Biol* 133-147, 1996.
- Kusano, K.F.**, Pola, R., Murayama, T., Curry, C., Kawamoto, A., Iwakura, A., Shintani, S., Ii, M., Asai, J., Tkebuchava, T., Thorne, T., Takenaka, H., Aikawa, R., Goukassian, D., von, S.P., Hamada, H., Yoon, Y.S., Silver, M., Eaton, E., Ma, H., Heyd, L., Kearney, M., Munger, W., Porter, J.A., Kishore, R., Losordo, D.W.: Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* 11:1197-1204, 2005.
- Kwon, J.**, Chung, I.Y., Benveniste, E.N.: Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *J. Biol. Chem.* 132, 227-236 ,1993b.
- Labastie, M.C.**, Poole, T.J., Peault, B.M., LeDouarin, N.M.MB1, a quail leukocyte-endothelium antigen: partial characterization of the cell surface and secreted forms in cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9016-9020, 1986.
- Lagasse, E.**, H. Connors, M. Al Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X.Wang, M. Finegold, I.L. Weissman, and M. Grompe. Purified hematopoietic stem cells can differentiate in hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6:1229-1234, 2000.
- Lanza, R.**: *Essentials of Stem Cell Biology*. New York: Academic Press, 2006.
- Lapidot, T.**, Sirard, C., Vormoor, J. et al.: A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648, 1994.
- Laschke, M.W.**, Physiologische Angiogenese im ovariellen Zyklus der Follikulogenese und Lutealphase; Doktorarbeit, 2002.
- Lawson, G. W.**, Van Winkle, L. S., Toskala, E., Senior, R. M., Parks, W. C. and Plopper, C. G.: Mouse strain modulates the role of the ciliated cell in acute tracheobronchial airway injury-distal airways. *Am. J. Pathol.* 160, 315-327, 2002.
- Lehr, H.A.**, Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D., Messmer, K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am. J. Pathol.* 143:1055-1062.
- Li, X.**, Shu, R., Filippatos, G., Uhal, B.D.: Apoptosis in lung injury and remodeling. *J Appl Physiol* 97:1535-1542, 2004.
- Mailänder, V.**, Rojewski, M., Burkhart, J., Körper, S., Schrezenmeier, H.: Adulte Stammzellen: Hoffnung für die regenerative Medizin. *Hämotherapie* 4:4-21, 2005.



- Martin, T.R.**, Hagimoto, N., Nakamura, M., Matute-Bello, G.: Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2:214-220, 2005.
- Martin, P.:** Repair mechanisms in embryos: wound healing and learning from how embryos repair perfectly. *Eur Respir J* 22 (Suppl 44):39S, 2003.
- Mason, R.J.**, Leslie, C.C., McCormick-Shannon, K., Deterding, R.R., Nakamura, T., Rubin, J.S., Shannon, J.M.: Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:561-567, 1994.
- Matsuno, H.**, Yudoh, K., Watanabe, Y., Nakazawa, F., Aono, H., Kimura, T.: Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol* 28:22-28, 2001.
- McCuskey, R.S.**, McCuskey, P.A.: In vivo microscopy of the spleen. *Bibl Anat* 16: 121-125, 1977.
- McGann, J.**, Silver, L., Liesveld, J., Palis, J. Erythropoietin-receptor expression and function during the initiation of murine yolk-sac erythropoiesis. *Exp Hematol* 25:1149-1157, 1997.
- McNagny, K.M.**, Pettersson, I., Rossi, F., Flamme, I., Shevchenko, A., Mann, M., Graf, T. Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and hematopoietic progenitors. *J Cell Biol* 138:1395-1407, 1997.
- Menger, M.D.**, Pelikan, S., Steiner, S., Messmer, K.: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow-paradox". *Am J Physiol* 263: H1901-H1906, 1992b.
- Menger, M.D.**, Marzi, I., Messmer, K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur. Surg. Res.* 23:158.169, 1991a.
- Metz, C.N.**, Tracey, K.J.: It takes nerve to dampen inflammation. *Nature Immunology* 6:756-757, 2005.
- Mezey, E.**, K.J. Chandross, G. Harta, R.A. Maki, and S.R. McKercher (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782.
- Mikawa, T.**, Fischman, D.A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9504- 9508, 1992.
- Moldovan, N.I.**, Asahara, T. Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, presence and future. *Trends cardiovasc Med.*13:265-269, 2003.
- Muralt, S.:** The adhesion and migration of endothelial progenitor cells, Diplomarbeit, 2007.
- Murray, P.D.F.** The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *R Soc Lond Ser B* III:1932.
- Muzio, M.**, Salvesen, G.B., Dixit, V.M.:FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogene. *J Biol Chem* 272: 2952-2956, 1997.

- Noden, D.M.** Development of craniofacial blood vessels. In: Feinberg, R.N., Sherer, G.K., Auerbach, R., eds. *The Development of the vascular system*. Basel: Karger, 1991, pp 1-24
- Orlic, D.**, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S.M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D.M. Bodine, A. Leri, Anversa, P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705, 2001.
- Overturf, K.**, Al-Dhalimy, M., Finegold, M., Grompe, M.: The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am. J. Pathol.* 155, 2135-2143, 1999.
- Papaoannou, A.I.**, Kostikas, K., Kollia, P., Gourgoulialis, K.I.: Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 7:128.:128, 2006.
- Pardanaud, L.**, Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., Buck, C.A. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349, 1987.
- Pardanaud, L.**, , Yassine, F., Dieterlen-Lievre, F. relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105:473-485, 1989.
- Park, K. S.**, Wells, J. M., Zorn, A. M., Wert, S. E., Laubach, V. E., Fernandez, L. G. and Whitsett, J. A.: Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34, 151-157, 2005.
- Peichev, M.**, Naiyer, A.J., Pereira, D., Ahu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., and Moore MAS. Expression of VEGFR-2 and AC133 by human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958, 2000 .
- Perreira, R.F.**, Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O., Prockop, D.J.: Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4857-4861, 1995.
- Petty, T.L.:** Overview. In: Matthay, M.A., editor. *Acute Respiratory Distress Syndrome*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.p 1-6, 2003b.
- Pola, R.**, Ling, L.E., Aprahamian, T.R., Barban, E., Bosch-Marce, M., Curry, C., Corbley, M., Kearney, M., Isner, J.M., Losordo, D.W.: Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation* 108:479-485,2003.
- Polunovsky, V.A.**, Chen, B., Henke, C., Snover, D., Wendt, C., Ingbar, D.H., Bitterman, P.B. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J. Clin. Invest* 92: 388-397, 1993.
- Poole, T.J.**, Coffin, J.D. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 251:224-231, 1989.

- Powell, W.C.**, Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M., Matrisian, L.M.: The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9:1441- 1447, 1999.
- Prewitt, R.L.** and Johnson, P.C.: The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. *Microvasc. Res.* 12:59-70, 1976.
- Pries, A.R.**: A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc: Clin Exp* 7: 327-345, 1988
- Rafii, S.**: Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105:17-19, 2000.
- Rawlins, E.L.**, Hogan, B.L.: Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 133, 2455-2465, 2006.
- Reinhold, H.S.**, Endrich, .B: Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2: 111-137, 1986.
- Risau, W.** :Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9:926-933, 1995
- Risau, W.**, Flamme, I.: Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11:73-91, 1995
- Risau, W.** : Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997
- Rochefort, G.Y.**, P. Vaudin, N. Bonnet, J.C. Pages, J. Domenech, P. Charbord, And V. Eder.: Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymale stem cells after infusion into rats: Possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies? *Respir Res.* 6:125.:125, 2005.
- Rotman, H.H.**, Lavelle Jr., T.F., Dimcheff, D.G., Van den Belt, R.J., Weg, J.G. Long-term physiologic consequences of the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 72:190-192, 1977.
- Sabin, F.R.**, Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Carnergie Contrib Embryol* 6:61-124, 1917
- Saeed, R.W.**, Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., Tracey, K.J., Al Abed, Y., Metz, C.N.: Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 201:1113-1123, 2005.
- Salven, P.**, Mustjoki, S., Alitalo, R. et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*, 101:168-172, 2003.
- Sapru, A.**, Wiemels, J.L., Witte, J.S., Ware, L.B., Matthay, M.A.: Acute lung injury and the coagulation pathway: potential role of gene polymorphisms in the protein C and fibrinolytic pathways. *Intensive Care Med* 32:1293-1303, 2006.
- Sata, M.**, A. Saiura, A. Kunisato, A. Tojo, S. Okada, T. Tokuhisa, H. Hirai, M. Makuuchi, Y. Hirata, and R. Nagai. 2002. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Nat Med* 8:403-409

- Schneider, H.:** Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene in B-Zellen und Charakterisierung des Genproduktes LAPTM 5, Dissertationsarbeit 2002.
- Schraufnagel, D.E.,** Mehta, D., Harshbarger, R., Treviranus, K., Wang, N.S.: Capillary remodeling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 125: 97–106, 1986.
- Shackleton, M.,** Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., Wu, L., Lindeman, G. J., Visvader, J. E.: Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84-88, 2006.
- Shalaby, F.,** Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitmann, M.L., and Schuh, A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 376:62-66, 1995.
- Shi, Q.,** Rafii, S., Wu, M.H.-D. et al. Evidence for circulating bone marrow derived progenitor cells. *Blood*, 1998, 92:362-367
- Shoji, S.,** Rickard, K.A., Ertl, R.F., Linder, J., Rennard, S.I.: Lung fibroblasts produce chemotactic factors for bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 257: L71-L79, 1989.
- Short, A.C.,** Montoya, M.L., Gebb, S.A., Presson, R.G. Jr, Wagner, W.W. Jr, Capen, R.L.: Pulmonary capillary diameters and recruitment characteristics in subpleural and interior networks. *J Appl Physiol* 80: 1568–1573, 1996.
- Smith, B.T.** and Post, M.: Fibroblast-pneumocyte factor. *Am J Physiol* 257: L174 – L178, 1989.
- Spencer, H.,** Rampling, D. Aurora, P., Bonnet, D., Hart, S.L., Jaffe, A.: Transbronchial biopsies provide longitudinal evidence for epithelial chimerism in children following sex mismatched lung transplantation. *Thorax* 60:60-62, 2005.
- Stamm, C.,** Westphal, B., Kleine, H.D., et al.: Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361:45-46, 2003.
- Steinberg, K.P.,** Milberg, J.A., Martin, T.R., Maunder, R.J., Cockrill, B.A., Hudson, L.A.: Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 150:113-122, 1994.
- Stern, J.B.,** Jaffre, S., Dehoux, M., Crestani, B.: Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor: their roles in alveolar epithelial repair. *Rev Mal Respir* 20:896-903, 2003.
- Stripp, B. R.,** Maxson, K., Mera, R. and Singh, G.: Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am. J. Physiol.* 269, L791-L799, 1995.
- Suda, T.,** Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75:1169-1178, 1993.
- Suda, T.,** Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179:873-879, 1994.

- Suratt, B.T.**, C. D. Cool, A. E. Serls, L. Chen, M. Varella-Garcia, E.J. Shpall, K.K. Brown, and G.S. Worthen. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Resp Crit Care Med* 168:318-322, 2003.
- Sylvester, K. G.**, Longaker, M. T.: Stem cells: review and update. *Arch Surg* 139, 93-99, 2004.
- Tanaka, M.**, Suda, T., Takahashi, T., Nagata, S.: Expression of the functional soluble form of human Fas-ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* 14:1129-1135, 1995.
- Tanaka, M.**, Itai, T., Adachi, M., Nagata, S.: Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4:31-36, 1998.
- Thaler, K.**, Mack, J.A., Berho, M., Grotendorst, G. Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation. *Eur. Surg. Res.* 37: 235-241, 2005.
- Thickett, D.R.**, Armstrong, L., Christie, S.J., Millar, A.B.: Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1601-1605, 2001.
- Thome, M.**, Tschopp, J.: Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 89:1645-1655, 2001.
- Tillmanns, H.**, Leinberger, H., Neumann, F.J., Steinhausen, M., Parekh, N., Zimmermann, R., Dussel, R., Kübler, W.: Microcirculation of the heart during postischemic reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 13: 71-77, 1989.
- Toth, I.**, Leiner, T., Mikor, A., Szakmany, T., Bogar, L., Molnar, Z.: Hemodynamic and respiratory changes during lung recruitment and descending optimal end-expiratory pressure titrations in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Medicine*; 35 (3): 787-793, 2007.
- Tracey, K.J.**: The inflammatory reflex. *Nature* 420:853-959, 2002.
- Tsukada, H.**, Ying, X., Fu, C., Ishikawa, S., McKeown-Longo, P., Albelda, S., Bhattacharya, S., Bray, B.A., Bhattacharya, J.. Ligation of endothelial alpha beta 3 integrin increases capillary hydraulic conductivity of rat lung. *Circ Res* 77: 651-659, 1995.
- Vajkoczy, P.**, Vollmar, B., Wolf, B., Menger, M.D.: Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J Mol Med* 77: 111-114, 1999a.
- Van Winkle, L. S.**, Buckpitt, A. R., Nishio, S. J., Isaac, J. M. and Plopper, C. G.: Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *Am. J. Physiol.* 269, L800-L818, 1995.
- Van Westerloo, D.J.**, Giebelen, I.A., Florquin, S., Daalhuisen, J., Bruno, M.J., de Vos, A.F., Tracey, K.J., Van Der, P.T.: The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 191:2138-2148, 2005.

**Vollmar, B.**, Morgenthaler, M., Amon, M., Menger, M.D. In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am. J. Pathol.* 159:1661-1670, 2000.

**Vollmar, B.**, Burkhardt, M., Minor, T., Klauke, H., Menger, M.D.: A correlation of intravital microscopically assessed NADH fluorescence, tissue oxygenation, and organ function during shock and resuscitation of the rat liver. *Adv Exp Med Biol* 454: 95-101, 1998

**Wagner, W.W. Jr.:** Pulmonary microcirculatory observations in vivo under physiological conditions. *J Appl Physiol* 26: 375–377, 1969.

**Wang, H.**, Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Al Abed, Y., Wang, H., Metz, C., Miller, E.J., Tracey, K.J., Ulloa, L.:Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10:1216-1221, 2004.

**Wang, H.**, Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al Abed, Y., Czura, C.J., Tracey, K.J.: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421:384-388, 2003a.

**Wang, R.**, Zagariya, A., Ang, E.:Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am J Physiol* 277:L1245-L1250, 1999a.

**Ware, L.B.**, Kaner, R.J., Crystal, R.G., Schane, .R, Trivedi, N.N., McAuley, D., Matthay, M.A.: VEGF levels in the alveolar compartment do not distinguish between ARDS and hydrostatic pulmonary oedema. *Eur Respir J* 26:101-105, 2005.

**Ware, L.B.**, Fang, X., Matthay, M.A.: Protein C and thrombomodulin in human acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L514-L521, 2003.

**Ware, L.B.**, Conner, E.R., Matthay, M.A.: von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury. *Crit Care Med* 29:2325-2331, 2001

**Werner, N.**, Junk, S., Laufs, U. et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 93:17-24, 2003.

**West, J.A.**, Daley, G.Q.: Human embryonic stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 33:135, 2004.

**Westermann, S.**, Vollmar, B., Thorlaciuss, H., Menger, M.D.: Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881-889, 1999.

**Winet, H.:** A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 37: 105-114, 1989

**Wood, H.**, May, G., Healy, L., Enver, T., Morris-Kay, G. CD34 expression patterns during early mouse development are related to models of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood* 90:2300-2311, 1997.

**Xi, X.**, Jiang, L., Zhu, B.: Clinical efficacy and safety of recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome using low tidal volume ventilation: a multicenter randomized controlled clinical trial. *Chin Med J*; 123 (21): 3100-3105, 2010.

**Yamada, M.**, Kubo, H., Ishizawa, K., Kobayashi, S., Shinkawa, M., Sasaki, H.. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax* 60:410-413, 2005.

**Yano, M.**, Iwama, A., Nishio, A., Suda, J., Takada, G., Suda T. Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood* 89:4317-4326, 1997.

**Zanjani, E.D.**, Flake, A.W., Almeida-Prada, G., Tran, N., Papayannopoulou, T.: Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* 94: 2515-2522, 1999.

**Zhang, Z.G.**, Zhang, L., Jiang, Q., et al. Bone marrow derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularisation after focal cerebral ischemia in adult mouse. *Circ Res* 90:284-288, 2002.

**Zweifach, B.W.** Direct observation of the mesenteric microcirculation in experimental animals. *Anatomical Record* 120:277-291,1954.

## 7 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. Jürg Hamacher, danken, der mir die Durchführung des interessanten Projekts im Institut für Experimentelle Chirurgie ermöglicht hat.

Vielen Dank für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit, deinen stets positiven Zuspruch, die zahlreichen Anregungen und für die vielen „Rescue“-Besuche bei dir in Bern, die sich aufgrund der herzlichen Atmosphäre immer mehr wie Urlaub als wie Arbeitsbesuche angefühlt haben. Hier auch einen lieben Gruß an Verena, die tatkräftig dazu beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön gebührt auch den Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Uniklinik Homburg, die mir in zahlreichen Situationen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Claudia Scheuer, Dr. Mathias Laschke, Janine Becker, Jan Slotta und Sarah Kirsch.

Ein ganz großes Dankeschön an Stephi Muralt, die meinen ersten Stammzellversuch maßgeblich zum Erfolg geführt hat und an Nora Regelin, für die großartige Einarbeitung und Hilfestellung über den gesamten Zeitraum meiner Dissertation.

Danken möchte ich auch Frau Ong, Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik, für Einblicke in die Welt der Statistik.

Diese Arbeit, die zuweilen eine größere Herausforderung war als mein Studium, hätte ich nie ohne ein klares Ziel vor Augen fertig stellen können. Hier möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mir im Laufe meines medizinischen Heranwachsens ein Vorbild waren und im Besonderen bei meiner Familie und allen lieben Freunden die mich motiviert haben und an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt haben. Eine große Umarmung haben sich an dieser Stelle meine Mama, meine Schwestern und Claudia Schneider verdient für gute Ideen, tröstende Gespräche und die zahlreichen Stunden Korrekturlesen.

Die letzten und wichtigsten Worte dieser Arbeit möchte ich an meine Eltern richten. Mama und Papa, ihr habt mir dieses Studium ermöglicht, habt mir immer den Rücken gestärkt und alle wichtigen Entscheidungen mit mir getragen. Dank euch habe ich mein Studium als wunderschöne Zeit genießen können.