

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Klinikum rechts der Isar (MRI) der Technischen Universität München (TUM)
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler)**

in Zusammenarbeit mit

**III. Medizinische Klinik - Hämatologie / Onkologie (MRI TUM)
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)**

**Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie (MRI TUM)
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny)**

**Transplantation von humanen CD34+ Zellen in Balb/c Nacktmäuse:
Verfolgung der Zellwanderung in vivo mittels Kernspintomographie und
anschließender histologischer Auswertung**

Sebastian Timmer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer
2. Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer

Die Dissertation wurde am 22.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
2 Fragestellung.....	8
2.1 Optimierung bestehender Protokolle zur Markierung von HSC mit MRT-Kontrastmittel für die Anwendung an CD34+ Zellen.....	8
2.2 Lokalisation von humanen CD34+ Zellen nach Markierung mit Eisenoxidkontrastmittel in der Kernspintomographie.....	8
2.3 Histologischer Nachweis der CD34+ Zellen im Versuchstier post sectionem.....	9
3 Material und Methoden.....	10
3.1 Isolierung der CD34+ Zellen.....	10
3.1.1 Patientengut.....	10
3.1.2 Abnahmetechnik.....	10
3.1.3 Transport und Aufbewahrung mittels Kryokonservation.....	11
3.1.4 CD34+ Isolierung aus kryokonserviertem Nabelschnurblut.....	11
3.2 Markierung der CD34+ Zellen mit MRT-Kontrastmittel.....	13
3.2.1 Verwendete Kontrastmittel.....	13
3.2.2 Zellmarkierung.....	13
3.2.3 Vergleich Endorem® vs. Resovist®.....	14

3.3	Tierversuch	16
3.3.1	Modellorganismus Maus.....	16
3.3.2	Haltung.....	16
3.3.3	Narkose.....	17
3.3.4	Injektionstechnik.....	19
3.4	MRT-Untersuchung	20
3.4.1	Versuchsanordnung.....	20
3.4.2	Bildgebung.....	21
3.5	Histologische Untersuchungen	22
3.5.1	Materialgewinnung.....	22
3.5.2	Konservierung und Entkalkung.....	22
3.5.3	Herstellung der Präparate.....	22
3.5.4	Färbung für Lichtmikroskopie.....	23
3.5.5	Färbung für Fluoreszenzmikroskopie.....	23
3.5.6	Lichtmikroskopie.....	25
3.5.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	26
3.5.8	Durchflusszytometrie / FACS-Analyse.....	28
4	Ergebnisse	31
4.1	Ergebnisse der Markierung und Kontrastmittelaufnahme	31
4.1.1	Kontrastmittelaufnahme frischer und aufgetauter CD34+ Zellen.....	31
4.1.2	Proliferationsfähigkeit SPIO markierter CD34+ Zellen.....	32
4.1.3	Funktionalität und Überleben SPIO markierter CD34+ Zellen.....	33
4.1.4	Überleben kontrastmittelmarkierter CD34+ Zellen.....	34
4.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellmarkierung.....	35
4.2	Ergebnisse der MRT-Untersuchung	36
4.2.1	MRT-Signaländerung kryokonservierter Zellen in vitro.....	36
4.2.2	MRT-Signaländerung kryokonservierter Zellen in vivo.....	37
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der MRT-Untersuchung.....	39

4.3	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	39
4.3.1	Lichtmikroskopie.....	39
4.3.2	Fluoreszenzmikroskopie Screening (Zeiss Axioplan 2).....	41
4.3.3	Fluoreszenzmikroskopie Dokumentation (Zeiss Apotom Axiovert 200M).....	43
4.3.4	Durchflusszytometrie / FACS-Analyse des Knochenmarks.....	44
4.3.5	Lichtmikroskopie der mittels FACS separierten CD34+ Zellen.....	46
4.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.....	46
5	Diskussion	48
5.1	Methodendiskussion.....	48
5.2	Ergebnisdiskussion.....	52
5.3	Fragestellungsdiskussion.....	56
5.4	Kritische Diskussion.....	58
6	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis.....	66
	Danksagung.....	77
	Appendix (Veröffentlichung im European Radiology).....	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Prinzip der Zellisolation mit MACS® (Visualisierung S. Timmer).....	12
Abb. 2	Intraperitoneale Injektion für Narkose und Narkoseausleitung der Versuchstiere.....	17
Abb. 3	i.v. Injektion einer Suspension Resovist® markierter CD34+ Zellen....	19
Abb. 4	Versuchsordnung im MRT.....	20
Abb. 5	Strukturformel von FITC (Grafik S. Timmer).....	24
Abb. 6	Strukturformel von DAPI (Grafik S. Timmer).....	25
Abb. 7	Schema eines Fluoreszenzmikroskops und des Versuchsaufbaus bei der Fluoreszenzmikroskopie (Visualisierung S. Timmer).....	27
Abb. 8	Auswertung der Durchflusszytometrie zur Apoptoserate.....	34
Abb. 9	Reagenzgläser mit Suspensionen aufgetauter CD34+ Zellen im MRT.....	36
Abb. 10	MRT-Bilder (dargestellt jeweils ein Femur eines Versuchstiers) vor Injektion und nach Injektion im zeitlichen Verlauf nach 2h und nach 24h.....	38
Abb. 11	Präparate unter dem Lichtmikroskop jeweils von Versuchstieren nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen.....	40
Abb. 12	Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) jeweils von Versuchstieren nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen.....	41

Abb. 13	Knochenmarksausschnitte von Versuchstieren unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen.....	42
Abb. 14	Knochenmarksausschnitt eines Versuchstiers unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen.....	42
Abb. 15	Knochenmarksausschnitte von Versuchstieren unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Apotom Axiovert 200M) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen.....	43
Abb. 16	Durchflusszytometrie des Knochenmarks eines Versuchstiers (MI) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten humanen CD34+ Zellen.....	44
Abb. 17	Vergleich der Durchflusszytometrieergebnisse.....	45
Abb. 18	Zellausstrich unter dem Lichtmikroskop nach FACS.....	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Dosierungsschema: Narkose bei Mäusen mit MMF.....	18
Tab. 2	Dosierungsschema: Narkoseausleitung bei Mäusen mit AFN.....	18
Tab. 3	Verwendete Antikörper und Fluoreszenzmarker.....	30
Tab. 4	Markierte Zellen nach Inkubation mit Lipofectamin® - Resovist® oder Lipofectamin® - Endorem®.....	31
Tab. 5	Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) auf Methylcellulose pro 100 Zellen.....	32
Tab. 6	CAFCs pro 100 CD34+ Zellen nach zwei Wochen (w2), nach sechs Wochen (w6), nach acht Wochen (w8), nach zwölf Wochen (w12)	33

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
CAFC	cobblestone area forming cells
CD	cluster of differentiation (=Zelloberflächenantigene)
CD34+	CD34-positive Zelle
CFU	colony-forming units
CI	Konfidenzintervall
CLP	common lymphoid progenitor (lymphoide Stammzelle)
CMP	common myeloic progenitor (myeloische Stammzelle)
CPD	Citrat-,Phosphat-,Dextrose-(Lösung)
CSF	colony-stimulating factors
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FS	Forward Scatter
G-CSF	Granulozyten colony-stimulating factor
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin
GvHD	graft-versus-host-disease
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigene
HSC	hematopoietic stem cell (hämatopoetische Stammzelle)
HTG	Herz-Thorax-Herznahe-Gefäßchirurgie Universitätsklinik Regensburg
i.d.F.	in der Form
K	Kelvin
IgG	Immunglobulin G

i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
lx	Lux
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MNZ	mononukleäre Zellen
MPB	mobilisiertes peripheres Blut
MRT	Magnetresonanztomographie / Kernspintomographie
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
p	probability (Wahrscheinlichkeit)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
®	registriertes Warenzeichen
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide
SS	Side Scatter
STEMMAT	Projektname, Akronym aus: <u>stem</u> cells und <u>materials</u>
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TU(M)	Technische Universität (München)
U	Units
UCB	umbilical cord blood (Nabelschnurblut)
UK	United Kingdom
ZIMT	Zentralinstitut für Medizintechnik der TUM

1 Einleitung

Im Jahr 1909 postulierte Maximow in seiner *Folia haematologica VIII* die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen. Seine Untersuchungen legten nahe, dass diese morphologisch den Lymphozyten ähnlich seien und in der Lage seien, im Blutstrom zu wandern und sich in speziellen Nischen nieder zu lassen, in welchen Proliferation und Differenzierung stattfinden könne [34]. 60 Jahre später konnten Becker, McCulloch und Till erstmals die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen aus Mäuseknochenmark experimentell zeigen [4]. Die Forschung mit Stammzellen ist zukunftsorientierte Wissenschaft, die bereits klinische Anwendung findet.

Pluripotente Stammzellen, die sich dadurch auszeichnen, sich selbst durch Zellteilung unbegrenzt erneuern zu können und gleichzeitig Nachkommen zu generieren, sind die Grundlage für eine effektive Hämatopoese. Diese findet im roten Knochenmark statt, welches sich beim Erwachsenen in Wirbelkörpern, Rippen, Sternum, Os Ilium, und den proximalen Enden von Humerus und Femur befindet. Hier sorgen fibroblastische Retikulumzellen, Endothelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten und die umgebende Bindegewebsmatrix für ein „Mikroklima“, in dem sich die Stammzellen einnisten und differenzieren [67]. Die pluripotente Stammzelle ist in der Lage sich in alle Reihen der myeloischen und lymphatischen Hämatopoese zu differenzieren. Damit ist sie Ursprung von Erythrozyten, Megakaryozyten bzw. Thrombozyten, neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen sowie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Unter dem Einfluss von Zytokinen (verschiedene Interleukine, Erythropoetin, Thrombopoetin etc.) [65] entstehen zunächst myeloische Stammzellen (CMP, common myeloic progenitor) und lymphoide Stammzellen (CLP, common lymphoid progenitor). Während sich CLP durch weiteren Zytokineinfluss zu determinierten lymphoiden Stammzellen entwickeln, sog. committed stem cells oder Pro-B, Pro-T und Pro-NK-Zellen, entstehen aus CMP über ein Zwischenstadium (CFU-GEMM) uni- und bipotente Stammzellen. Aufgrund ihrer Eigenschaft, sich häufig zu Zellkolonien zusammenzulagern, werden sie auch CFU, colony-forming units, genannt. CFU-G/M ist damit die bipotente Stammzelle der Granulozytopoese

und der Monozytopoese, CFU-ME eine bipotente Stammzelle, die sich weiter differenziert zu CFU-E für die Erythropoese und CFU-Meg für die Megakaryozytopoese. Unipotente Stammzellen CFU-Eo und CFU-Baso sind Vorläufer von eosinophilen und basophilen Granulozyten [8]. Neben verschiedenen Zytokinen stimulieren bestimmte hämatopoetische Wachstumsfaktoren sog. CSF, colony-stimulating factors, die Differenzierung der unterschiedlichen Stammzellreihen. Praktische Verwendung finden diese Erkenntnisse bereits, wenn es z.B. um die Diagnostik und Therapie von Knochenmarkserkrankungen geht. Die Anregung der Bildung von Blutzellen mit EPO (Erythropoetin) oder G-CSF (Granulozyten colony-stimulating factor) sei hier nur stellvertretend genannt.

Für viele klinische Fragestellungen und mögliche Therapieansätze ist es notwendig, Mechanismen, wie Proliferation, Determination oder Migration auf Stufe der pluripotenten Stammzelle genauer zu erforschen.

Eine zentrale Rolle spielen hierbei CD34 positive Zellen (CD34+), da gezeigt werden konnte, dass sowohl multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSC, hematopoietic stem cells) als auch frühe Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe das Antigen CD34 exprimieren [26]. 1982 wurde zum ersten Mal eine internationale Konferenz in Paris abgehalten (International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA)), um eine Systematik in die Vielzahl von Antigenen und entsprechenden Antikörpern zu bringen. Seitdem werden Antigene in Gruppen und Untergruppen eingeteilt und mit CD (Cluster of Differentiation) bezeichnet [69]. Das Oberflächenglycoprotein CD34 ist ein sicheres Erkennungsmerkmal für HSC und wird als solches in Diagnostik und Therapie verwendet. Nach autologer [23], allogener [61] und xenogener [30] Transplantation können menschliche CD34+ Zellen im jeweiligen Empfänger die myeloischen und lymphatischen Zellreihen wieder aufbauen. Allerdings ist laut Guo, Lübbert und Engelhardt der Umkehrschluss, alle HSC seien CD34 positiv, nicht zulässig, da ruhende HSC CD34 meist nicht exprimieren. Diese CD34 negativen Zellen (CD34-) können aber durch Aktivierung den CD34+-Status erlangen [18].

Zur Gewinnung der HSC können im Allgemeinen drei unterschiedliche Quellen herangezogen werden: Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut.

Gewinnung aus Knochenmark

Die Knochenmarkentnahme, meist in Form einer Punktion der Spina iliaca posterior superior, gehört in Transplantationszentren zur klinischen Routine. Sie stellt die „invasivste“ Methode der Stammzellgewinnung dar und ist mit entsprechenden Risiken behaftet. Auch wenn die prozentual geringe Menge der entnommenen blutbildenden Zellen keine signifikanten Blutbildveränderungen hervorruft, können doch Komplikationen wie Sensibilitätsstörungen, Infektionen oder Blutungen an der Punktionsstelle nicht ausgeschlossen werden. Die Häufigkeit von lebensbedrohlichen Komplikationen wurde in einer Studie mit 0,5% angegeben [6].

Gewinnung aus peripherem Blut

1971 konnten McCredie et al. im peripheren Blut eine geringe Anzahl HSC nachweisen [36]. Um für eine Transplantation geeignete Zellzahlen zu erreichen, kann der Donor mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, z.B. G-CSF, stimuliert werden. Im so „mobilisierten“ peripheren Blut (MPB) können bis zu 1000fach höhere HSC-Zahlen nachgewiesen und transplantiert werden. In Studien ist MPB dem Knochenmarkstransplantat überlegen, was die Geschwindigkeit der Rekonstitution der Knochenmarksfunktion des Empfängers betrifft [29, 59], jedoch wurde auch eine höhere Rate an „Graft-versus-Host-Diseases“ (GvHD) festgestellt [49, 54].

Gewinnung aus Nabelschnurblut

Die Abnahme von Nabelschnurblut (UCB, umbilical cord blood) unmittelbar nach der Geburt ist die Methode mit dem geringsten Risiko für den Donor, da die Nabelschnur erst nach Abnabelung des Kindes punktiert wird. Im Vergleich zu MPB und BM ist die Aufbewahrung günstiger und die Verfügbarkeit schneller [2]. Die so gewonnenen Proben sind kleiner, die Konzentration an HSC ist dagegen höher als in MPB oder BM [64]. Bezüglich der Anzahl der CD34+ Zellen konnten vergleichbare Ergebnisse gefunden werden [32,43]. Es können nicht alle Nabelschnurproben sofort verwendet werden und müssen daher konserviert werden. Dies geschieht mit flüssigem Stickstoff als sog. Kryokonservierung. Die so gelagerten UCB-Proben sind auch nach 15 Jahren noch in Bezug auf Zellzahl und Zellqualität vergleichbar mit frisch gewonnenen Proben [5]. Mehrere kommerzielle Unternehmen bieten diese Form der Aufbewahrung an, meist für den Fall, dass der Spender selbst oder ein Familienmitglied die Stammzellen für eine Therapie benötigt. Es gibt auch eine Reihe

meist universitärer Stammzell- oder Nabelschnurbanken, die die Proben zum einen für die Stammzelltherapie, zum anderen für wissenschaftliche Zwecke nutzen. Einen weiteren Vorteil der UCB-Transplantation stellt die geringere GvHD-Rate [31, 50, 60] dar. Die relativ geringe Zellzahl einer UCB-Probe lässt eine Transplantation bisher nur bei Kindern oder kleinen Erwachsenen zu [12]. Aus diesem Grund wird versucht, Stammzellen ex vivo zu vermehren [11, 58], um eine höhere Zahl zur Transplantation zur Verfügung zu haben.

Die Eingliederung eines Transplantats im Empfängerorganismus, was sich durch Wachstum und Vermehrung der transplantierten Zellen ausdrückt, wird als Engraftment bezeichnet. Untersuchungen zufolge läuft das Engraftment von Zellen aus UCB im Knochenmark des Empfängers langsamer ab als bei Transplantaten aus MPB und BM. Dadurch verlängert sich die Zeitspanne der Knochenmarksunterfunktion, in der der Patient anfällig für Infektionen und Blutungen ist. Hat das Engraftment erfolgreich stattgefunden, zeigen Zellen aus UCB eine bessere Wiederaufnahme der Knochenmarksfunktionen als Zellen anderer Herkunft [16].

Die Transplantation der Stammzellen erfolgt durch intravenöse Infusion, nachdem zuvor das Knochenmark bzw. die blutbildenden Zellen des Empfängers mittels geeigneter Chemotherapie und/oder Strahlentherapie zerstört worden sind. Die infundierten humanen CD34+ Zellen zirkulieren nur kurz im Blutkreislauf des Empfängers [19], im Anschluss kommt es zum „Homing“ der Stammzellen. Mit „Homing“, wörtl. Zielsuche, werden Prozesse zusammen gefasst, die am Anfang der Knochenmarksbesiedelung und Rekonstitution der Knochenmarksfunktion stehen und die aktive Überquerung der Blut/Knochenmark-Schranke durch zirkulierende HSC sowie deren Ansiedlung im Knochenmark umfasst. Hierbei laufen vielerlei Adhäsions-Interaktionen zwischen den beteiligten Zellen ab [28]. Zunächst nähern sich die HSC der Wand kleiner Knochenmarkssinusoide an und treten in Kontakt mit dem Endothel über die Selectine E und P [56]. Darauf kommt es zur festen Bindung der Zellen an die Gefäßwand, vermittelt durch Integrine VLA-4, VLA-5 und LFA-1 und ihre vaskuläre Liganden VCAM-1 und ICAM-1 [17]. Der von Osteoblasten im Bereich des Endostiums exprimierte SDF-1 (stromal-derived factor-1) [48] wirkt chemotaktisch und reguliert über den Rezeptor CXCR4 den transendothelialen Übertritt der Stammzellen ins Knochenmark [47]. Dort nisten sich die HSC in

spezialisierten Nischen ein [42]. Wie oben erklärt, spricht man von Engraftment, wenn sich die HSC in ihrem Mikroklima fest etabliert haben, sich teilen und die Hämatopoese unterhalten.

Bei vielen Knochenmarkserkrankungen ist die Stammzelltransplantation eine wichtige Therapie-Option. Bisher kann der Erfolg einer Stammzell-Transplantation im Sinne einer schnellen und dauerhaften Einnistung der übertragenen Zellen klinisch nur indirekt über Thrombozyten- und Neutrophilenzahlen im peripheren Blut überprüft werden [41]. Um genauere Aussagen über den Therapieverlauf machen zu können, wäre eine direkte Kontrolle der Vorgänge im Knochenmark oder im entsprechenden Zielorgan hilfreich. Knochenmarks-Biopsien wären hier eine direkte, allerdings auch invasive und die Patienten beeinträchtigende Methode für die Verlaufskontrolle.

Eine schonendere Möglichkeit der klinischen Erfolgskontrolle einer Stammzell-Transplantation stellt die Kernspin- oder Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Hierbei ist es von Vorteil, dass Untersuchungen mit gutem Weichteilkontrast und hoher Auflösung [14] ohne Strahlenbelastung durchgeführt und im Verlauf kontrolliert werden können, ohne die Gesundheit des Patienten zu gefährden oder das Zelltransplantat zu schädigen.

Vor Anwendung dieser Methode am Patienten muss sichergestellt sein, dass die Stammzellen mittels MRT nachweisbar sind und dass durch die notwendige Markierung mit Kontrastmittel keine Funktionseinschränkung auftritt. Daher ist es notwendig, in-vivo-Versuche mit Versuchstieren durchzuführen. Wegen ihrer geringen Größe und der fehlenden Immunkompetenz gegen Transplantate sind immunsupprimierte Nacktmäuse hierfür gut geeignet.

Voraussetzung für das Monitoring einer Stammzelltransplantation mittels MRT in einem Organismus ist eine entsprechende Markierung der transplantierten Zellen. Dieses sogenannte „Labeling“ mit Kontrastmittel kann im Prinzip auf drei Arten erfolgen:

- durch einfache Endozytose in einer Zellsuspension mit Eisenoxiden
- durch rezeptorvermittelte Endozytose magnetischer Nanopartikel, die an Transferrin gebunden sind
- durch Transfektion anionischer Kontrastmittel in Liposomen [9]

Verschiedene Forschungsgruppen konnten bereits zeigen, dass Zellen wie beispielsweise Monozyten [40], Lymphozyten [55], T-Zellen [69], embryonale, neuronale Stammzellen [51] etc. markiert und im MRT in Mäusen verfolgt werden können. Auch HSC konnten bereits effektiv mit Kontrastmittel beladen und deren Migration im MRT dokumentiert werden [10, 33, 66]. Die CD34+ Zelle nimmt dabei im Gegensatz zu den weiterentwickelteren CD34- Zellen das Kontrastmittel nicht über einfache Endozytose auf, sondern benötigt die Unterstützung von Liposomen [10]. Daldrup-Link et al. konnten bei Zellsuspensionen von HSC, die mit Eisenoxid-Kontrastmittel markiert worden waren, bei Zellzahlen ab $2,5 \times 10^5$ eine Signaländerung mit einem 1,5T MRT nachweisen [9]. Für eine Verfolgung der Zellen in vivo sind dagegen deutlich höhere Zellzahlen notwendig. Für einen Nachweis von SPIO markierten HSC mit dem 1,5T MRT nach i.v. Injektion in Nacktmäuse konnten erst ab einer Zellzahl von 3×10^7 signifikante Veränderungen gefunden werden [10]. Die Lebensfähigkeit der Zellen wird nachweislich durch keines der bisher verwendeten klinisch zugelassenen Kontrastmittel signifikant gemindert [1, 9, 10]. Somit scheint die Verlaufskontrolle eines Transplantationserfolges über kontrastmittelmehrte Zellen eine zukunftssträchtige Vorgehensweise zu sein.

Bisher wurden verschiedene Zellpopulationen, wie oben ausgeführt, untersucht. Der Versuch der selektiven Darstellung einer gelabelten CD34+ Fraktion in vivo mittels MRT ist allerdings noch nicht unternommen worden. Ein Grund hierfür ist die Zellzahl, die, wie bereits mehrfach erwähnt, immer noch ein limitierender Faktor für den Erfolg einer Transplantation sowie auch für den Nachweis von Zellen in vivo mit klinischen Methoden wie beispielsweise mit dem MRT ist. Bei relativ variablem Probenvolumen nach der Nabelschnurblutentnahme und einem durchschnittlichen Anteil von 0,1-0,5% CD34+ Zellen an mononukleären Zellen im Nabelschnurblut [10] sind oft 20-70 Spender notwendig, um eine CD34+ Zahl von 1×10^7 zu erreichen (eigene Erfahrung im laufenden Experiment). Versuche mit relativ hohen CD34+ Zellzahlen sind daher nur bei Zugriff auf eine entsprechend große und strukturierte Aufbewahrungseinrichtung möglich.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines übergeordneten interdisziplinären Projekts, das das Wissen über „cell-tracking“ der humanen CD34+ Zellen im Tiermodell erweitern soll. Dieses Forschungsprojekt knüpft dabei an das STEMMAT-Projekt an, über welches die für diese Arbeit verwendeten Nabelschnurblutproben zur Verfügung

gestellt wurden. STEMMAT ist ein Grundlagenforschungsprojekt zur Untersuchung von Nabelschnur und Nabelschnurblut mit der Zielsetzung, eine optimale Logistik von der Probenentnahme über die Verteilung an die involvierten Forschungspartner bis hin zur fachgerechten Lagerung aufzubauen [20]. Dabei sollen Abnahme- und Weiterverarbeitungstechniken sowie die anschließende Kryokonservierung optimiert werden.

Aufgrund der besonderen Stellung der CD34+ Zellen, was die Stammzellpotenz betrifft, sowie ihrer zentralen Rolle bei der Neubesiedelung eines Empfänger Knochenmarks ist die Dokumentation der Migration dieser Zellen von besonderem Interesse. Arbeiten hierzu, speziell für CD34+ Zellen, wurden nach der von uns gesichteten Literatur bisher nicht veröffentlicht. Daher soll diese Studie einen Teil dazu beitragen, mit geeigneter Methodik die injizierten Zellen am Zielort wieder zu detektieren und den Transplantationserfolg zu quantifizieren. Diese Ergebnisse könnten später beispielsweise für eine Korrelation mit einer Signalveränderung im MRT verwendet werden, wodurch die Kernspintomographie möglicherweise als Methode zur Verlaufskontrolle einer Transplantation herangezogen werden kann. Daher widmet sich die vorliegende Arbeit diesem Thema.

2 Fragestellung

Diese Arbeit hat zum Ziel, humane CD34+ hämatopoetische Stammzellen in vivo nichtinvasiv in immunsupprimierten Mäusen in der Kernspintomographie mit einem 1,5T Kernspintomographen, nachzuweisen. Die Ergebnisse sollen anschließend histologisch mittels Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie überprüft werden.

Folgende Fragen und Problemstellungen sind Gegenstand dieser Arbeit:

2.1 Optimierung bestehender Protokolle zur Markierung von HSC mit MRT-Kontrastmittel für die Anwendung an CD34+ Zellen

- Vergleich der Aufnahme verschiedener MRT-Kontrastmittel (Resovist® und Endorem®) bei frischen CD34+ Zellen und bei nach Kryokonservierung wieder aufgetauten CD34+ Zellen
- Überprüfung der Proliferationsfähigkeit der CD34+ Zellen nach Markierung mit o.g. Kontrastmitteln
- Kontrolle der Funktionalität und des Überlebens der markierten Zellen
- abschließender Vergleich der MRT-Kontrastmittel Resovist® und Endorem® und Auswahl des Kontrastmittels mit der besseren Verträglichkeit

2.2 Lokalisation von humanen CD34+ Zellen nach Markierung mit Eisenoxidkontrastmittel in der Kernspintomographie

- Überprüfung des MRT-Signals in vitro anhand einer Suspension markierter CD34+ Zellen
- Verfolgung von MRT-Signaländerungen nach i.v. Injektion markierter CD34+ Zellen in immunsupprimierte Nacktmäuse

- Dokumentation der unteren Nachweisgrenze für injizierte Zellzahlen und Versuch diese möglichst gering zu halten
- Versuch der Korrelation von Signaländerung und tatsächlicher Zellzahl in Verbindung mit anschließenden histologischen Untersuchungen

2.3 Histologischer Nachweis der CD34+ Zellen im Versuchstier post sectionem

- Überprüfung der Präparate auf Vorliegen größerer intra- oder extrazellulärer Eisenansammlungen zur Erkennung möglicher Artefaktquellen
- fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der injizierten CD34+ Zellen in verschiedenen Organen der Versuchstiere mit speziellem Augenmerk auf das Knochenmark
- Nachweis der CD34+ Zellen und Zellzählung anhand von Untersuchungen des Empfänger Knochenmarks im Durchflusszytometer
- Untersuchung injizierter und mittels Durchflusszytometrie wieder extrahierter CD34+ Zellen auf ihre weiterhin bestehende Markierung mit Eisenoxid-Kontrastmittel

3 Material und Methoden

3.1 Isolierung der CD34+ Zellen

3.1.1 Patientengut

Insgesamt wurden im Zeitraum von 2003-2005 in der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der TU-München 1905 Nabelschnurblutproben gesammelt. Davon wurden 729 Proben vom Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU-München kryokonserviert. Aus diesem Kollektiv wurden Zellen für die nachfolgenden Versuche verwendet. Alle Patientinnen waren volljährig und hatten nach eingehender Aufklärung und ausreichender Bedenkzeit der Spende zugestimmt. Die Proben wurden sowohl bei natürlichen Geburten als auch bei geplanten Sectiones Caesareae abgenommen. Kam es bei der Geburt zu Komplikationen, musste eine Notoperation durchgeführt werden oder war das Wohl der Patientin und des Kindes in anderer Weise gefährdet, wurde von einer Nabelschnurspende abgesehen. Auch bei Nachweis infektiöser Krankheiten der Mutter wie z.B. Hepatitis oder HIV wurde aus Laborsicherheitsgründen auf eine Abnahme verzichtet.

3.1.2 Abnahmetechnik

Die Abnahme des Nabelschnurblutes erfolgte nach vollständiger Entwicklung des Kindes. Dabei wurde in Hinblick auf die bevorstehende Spende von Nabelschnurblut nicht in den natürlichen Verlauf der Geburt eingegriffen. Nach Abnabelung des Neugeborenen wurde eine Vene der abgeklemmten Nabelschnur nach ausreichender Sprühdesinfektion mit Cutasept®F (Fa. Bode Chemie, Hamburg) von Hebammen steril punktiert. Der Schwerkraft folgend, gelangte das Blut über einen Schlauch in den tiefer liegenden Blutabnahmebeutel (Fa. MACO Pharma International GmbH, Langen oder später: Blutabnahmebeutel 1-BB-150-CPD-NP; Gerätezentrale für Bluttransfusion des Österreichischen Roten Kreuzes, Eugendorf, Österreich). Die Beutel waren vom Hersteller mit CPD-Lösung (Citrat-Phosphat-Dextroselösung) als Stabilisator präpariert.

Während der Abnahme verblieb im Regelfall die noch ungeborene Plazenta in der Mutter, um durch die Kompression der natürlichen Nachwehen ein möglichst großes Blutvolumen zu gewinnen. Nach Sistieren des Blutflusses wurde die Nadel entsorgt und der Schlauch des Abnahmesystems verschlossen. Auf dem Beutel wurden Geburtsdatum und –uhrzeit sowie eine fortlaufende Identifikationsnummer vermerkt.

3.1.3 Transport und Aufbewahrung mittels Kryokonservation

Die Proben wurden an einer eigens eingerichteten Sammelstelle im Kreißsaal der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der TU-München gesammelt und zeitnah an die Kooperationspartner weitergegeben.

Im Labor wurden mononukleäre Zellen über einen Dichtegradienten (Ficoll; $d=1,077$ g/ml) aus dem Nabelschnurblut isoliert, auf 5×10^7 /ml konzentriert und zusammen mit 10% DMSO (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und 2% Humanalbumin im Flüssigstickstofftank bei 77K / -193°C eingefroren. Zuvor waren die Erythrozyten mit Hilfe von Ammoniumchlorid lysiert und entfernt worden. Bei relativ geringem Probenvolumen wurden in einem Gefäß zur Konservierung teilweise die Zellen von bis zu fünf Spendern vereint.

3.1.4 CD34+ Isolierung aus kryokonserviertem Nabelschnurblut

Die gefrorenen mononukleären Zellen wurden schonend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden sie mit verdünnter Hepes-Lösung, bestehend aus HBSS (Fa. Gibco® / Invitrogen, Paisley, UK), 1% Glucose, 10mmol Hepes und 2% fetalem Kälberserum (Fa. PAN Biosystems, Aidenbach) gewaschen und 5 min. bei 1600 Umdrehungen zentrifugiert. Zusätzlich zugesetzte DNase mit einer Konzentration von 3000 U/ml schützte die Proben vor Verklumpung.

In einer Neubauer-Zählkammer (Glasplättchen mit definierter Vertiefung und definierten Rasterlinien) wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und über eine Hochrechnung die Zahl der mononukleären Zellen ermittelt.

Nach einem weiteren Waschvorgang (s.o.) wurden je 1×10^9 Zellen folgende Reagenzien zugegeben:

-1ml DNase,

-1ml Fc-Rezeptorblocker („CD 34 direct isolation kit“ Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach),

-2ml Hepes-Lösung und

-1ml CD34-MicroBeads („CD 34 direct isolation kit“ Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Für die Inkubation mit den CD34-MicroBeads verblieben die Zellen 30 min. im Kühlschrank. Im Anschluss wurden die Zellen noch einmal gewaschen, je 1×10^9 Zellen wurden 1ml DNase und 2ml Hepes-Lösung beigegeben. Das Gemisch wurde durch einen Filcon®-Filter 030-33 (Porengröße $30 \mu\text{m}$) gefiltert und die CD34+ Zellen wurden über den Besatz mit magnetischen Antikörpern beim Durchfluss durch magnetische Säulen (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) sog. MACS®-Technologie (Magnetic-Activated Cell Sorting) isoliert (Abb. 1).

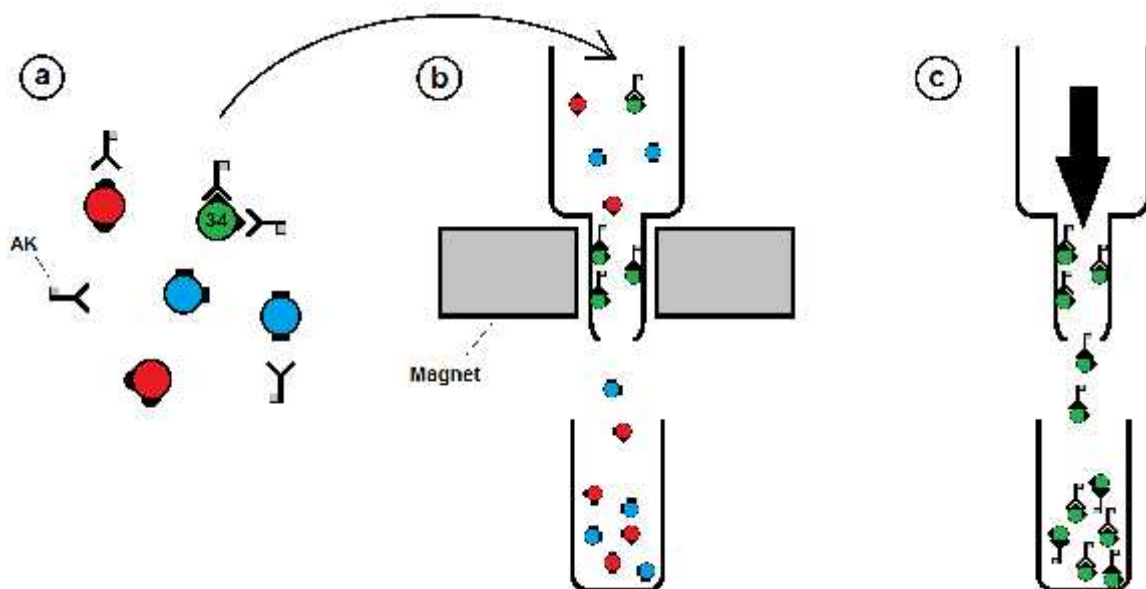


Abb. 1 Prinzip der Zellisolation mit MACS®

a: Markierung der Zellen (grün) mit magnetischen Antikörpern (AK) sog. MicroBeads

b: Isolierung der markierten Zellen im Magnetfeld

c: Ausspülen und Auffangen der isolierten Zellen

3.2 Markierung der CD34+ Zellen mit MRT-Kontrastmittel

3.2.1 Verwendete Kontrastmittel

Die in den Versuchen verwendeten Kontrastmittel Resovist® (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) und Endorem® (Guerbet S.A., Roissy, Frankreich) sind sog. SPIO-Kontrastmittel (superparamagnetic iron oxide). Sie enthalten kleinste ferromagnetische Partikel, die sich in einem starken Magnetfeld sehr gut in Feldrichtung ausrichten. Im MRT wird so das lokale Magnetfeld verzerrt und ein Signalverlust verzeichnet. Man spricht auch von Signalabsenkung durch das Kontrastmittel, die sich in der Bildgebung durch eine Abdunkelung des entsprechenden Bereichs bemerkbar macht.

Resovist® ist im Wesentlichen eine wässrige Lösung, die ca. 60nm große, mit Carboxydextran beschichtete Eisenoxidpartikel enthält. Seit 2001 ist es für den klinischen Gebrauch zugelassen, vornehmlich zur Darstellung von fokalen Leberläsionen. Die T1-Relaxationszeit bei 37°C und 1,5T liegt bei $9,7\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, die T2-Relaxationszeit bei $189\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ [22].

Endorem® ist eine Dispersion Dextran-umhüllter Eisenoxide, zugelassen seit 1996 für die klinische Anwendung, und wird hauptsächlich in der Leberdiagnostik verwendet. Der Durchmesser der Partikel ist durchschnittlich 150nm (120-180nm), die T1-Relaxationszeit liegt bei $10,1\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, die T2-Relaxationszeit bei $120\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei 37°C und 1,5T [62].

3.2.2 Zellmarkierung

Für die Markierung der CD34+ Stammzellen wurden 20µl Lipofectamin® (Fa. Invitrogen, Paisley, UK) in 100µl DMEM gelöst und für 30 min. mit einem der beiden superparamagnetischen Kontrastmittel für MRT, Endorem® oder Resovist® bei 37°C inkubiert. Die dabei entstandenen Liposomenkomplexe wurden mit weiteren 800µl DMEM verdünnt und zusammen mit den isolierten CD34+ Zellen vier Stunden bei 37°C zur Inkubation in den Brutschrank gegeben. Danach wurden die Zellen dreimal

mit HF/2+Lösung (Hank's balanced salt solution (Fa. Invitrogen, Berlin, Deutschland) + 2% Kalbsserum (PAN Biosystems), Penicillin/Streptomycin (Fa. Invitrogen, Berlin, Deutschland) und 10mmol/l HEPES-Lösung (Fa. Invitrogen, Berlin, Deutschland)) gewaschen. Dabei wurden die Röhrchen jeweils sieben Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zuletzt wurden die Zellen mit HF/2+ zu einem Gesamtvolumen von 300µl aufgefüllt und durch einen 30µm Filcon-Spritzenfilter (Fa. BD-Immunocytometry Systems, Erembodegem, Belgien) gefiltert. Nach erneuter Zählung mit der Neubauer-Zählkammer konnte die Zahl der CD34+ Zellen rechnerisch ermittelt werden. Für die Injektion in die Versuchstiere wurden Proben mit 1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7 CD34+ Zellen in Suspension hergestellt. Für die zellfreien Kontrollinjektionen wurde Resovist® mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt, so dass 0,4µl Resovist® in einem vergleichbaren Injektionsvolumen von 300µl verabreicht werden konnten.

3.2.3 Vergleich Endorem® vs. Resovist®

Um ein optimales Markierungsergebnis zu gewährleisten, wurden vor Festlegung der endgültigen Vorgehensweise die MRT-Kontrastmittel Endorem® und Resovist® hinsichtlich der Apoptoserate und Funktionalität der CD34+ Zellen überprüft.

Zur Untersuchung des Zelluntergangs nach Markierung wurden die CD34+ Zellen zweimal mit eiskalter PBS-Pufferlösung (phosphate buffered saline) gewaschen und anschließend mit FITC-Annexin V (Fa. BD Biosciences) nach Herstellerprotokoll markiert. Als Apoptosemarker wurde Propidiumiodid (PI) (Fa. Invitrogen) verwendet. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD34+ Zellen ohne Markierung mit CD34+ Zellen, nach vierstündiger Inkubation mit Lipofectamin® oder Lipofectamin® und einem der beiden oben genannten Kontrastmittel verglichen. Pro Versuchsaarm wurden dabei jeweils n=5 Proben untersucht. Die Auswertung erfolgte am Computer (FlowJo-Software, Fa. Tree Star, Ashland, OR, USA).

Zusätzlich wurden frische und aufgetaute CD34+ Zellen auf ihre Teilungs- und Regenerationsfähigkeit vor und nach Kontrastmittelmarkierung untersucht. Entsprechende Zellkulturen wurden nach bestehenden Protokollen [10, 60] angelegt.

Es wurden hierbei 250 CD34+ Zellen auf Methylcellulose ausgebracht und die sich bildenden Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM [8]) ausgezählt.

Funktionalität und Überleben wurden in Langzeitkulturen auf halbfesten Nährmedien mit Wachstumsfaktor H4345 (Fa. Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) mit FBMD-1 (Flask Bone Marrow Dexter-1) Stromazellen geprüft. Es wurde hierzu die Zahl der CAFC (cobblestone area forming cells) nach zwei, sechs, acht und zwölf Wochen bestimmt und am Computer ausgewertet (L-Calc-Software, Fa. Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) [4].

3.3 Tierversuch

3.3.1 Modellorganismus Maus

Dieser Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß dem Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl | S. 1105) über die Genehmigung von Tierversuchen unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-99/01 genehmigt.

Im folgenden Experiment wurden Nacktmäuse verwendet. Dabei handelte es sich um männliche Tiere des Stammes Balb/c Nude (Fa. Charles River Laboratories, Sulzfeld), genaue Nomenklatur: CanN.Cg-Foxn1nu/Crl, die homozygote Träger einer Mutation für den Transkriptionsfaktor Foxn1nu sind. Diese spontane Mutation beschrieb Flanagan 1966 [15]. Mäuse des im Versuch verwendeten Stammes sind durch Kreuzung und Rückkreuzung von CanN.Bon-Foxn1nu und CanN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj entstanden [7]. Charakteristisch für die Tiere ist eine gestörte Haarentwicklung trotz normal angelegter Haarfollikel, des Weiteren eine Aplasie des Thymus und somit ein Fehlen der T-Zellen [7, 37]. Aufgrund der daraus resultierenden Immunschwäche können Experimente wie Xenotransplantation von menschlichen Stammzellen in die Maus vorgenommen und eine Abstoßung des Fremdmaterials weitgehend verhindert werden. Zum Zeitpunkt des Versuchs waren die Tiere zwischen 8 und 12 Wochen alt und wogen ca. 20-25g.

3.3.2 Haltung

Jeweils drei Versuchstiere wurden in einem Macrolon®-Käfig (Fa. Ehret, Emmendingen) mit Gitterabdeckung und IVC-Filterdeckel (Hygiene-/Allergieschutz bei Individually Ventilated Cages = einzelbelüfteten Käfigen) gehalten. Das Einstreu, feines entstaubtes Faserstreu (Fa. Altromin, Lage), wurde zweimal pro Woche ausgetauscht, ebenso der unbehandelte Zellstoff, der zum Nestbau dient und Nacktmäusen ein wichtiger Schutz gegen Unterkühlung ist. Die Temperatur im Tierstall betrug ca. 23°C, Licht (60 – 100lx) und Dunkelheit wechselten im 12h-Takt ohne Dämmerungsphasen. Sterilisiertes Leitungswasser und spezialbehandeltes

Zuchtfutter 1324 für Ratten und Mäuse (Fa. Altromin, Lage) waren ad libitum für die Tiere verfügbar, beides wurde einmal pro Woche gewechselt. Der Zustand der Mäuse und des Käfigs wurde täglich kontrolliert.

3.3.3 Narkose

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte gewichtsadaptiert mit einer Kombination aus Medetomidin / Dormitor® (Fa. Pfizer, New York, USA), Midazolam / Dormicum® (Fa. Roche Austria, Wien, Österreich) und Fentanyl / Fentanyl® Janssen (Fa. Janssen-Cilag, Neuss), kurz MMF. Während der Injektion des Narkosegemisches wurde die Maus mit einer Hand fixiert und in Kopftieflage gehalten, um den Darm nach kranial zu verlagern. Dabei wurde die Einstichstelle im lateralen Unterbauch des Tieres gewählt, um eine Verletzung von Verdauungstrakt oder Blase zu vermeiden (Abb. 2). Gemäß Dosierungsschema (Tab. 1) wurde MMF mit einer 1-ml-Spritze (Fa. Codan Medical Aps, Dänemark) über eine 27G BD Microlance™-Nadel (Fa. BD Drogheda, Irland) intraperitoneal verabreicht. Bei unzureichender Narkotisierung konnten 0,2-0,4ml MMF nachinjiziert werden. Die MMF-Dosis vor der letzten MR-Untersuchung wurde höher gewählt, um die Mäuse später während der Narkose töten zu können. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu verhindern, wurden diese mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Fa. Roche, Grenzach) benetzt.



Abb. 2 Intraperitoneale Injektion für Narkose und Narkoseausleitung der Versuchstiere

Gewicht g	Dosierung			Menge			Mischung ml
	Medetomidin µg/kg	Midazolam mg/kg	Fentanyl µg/kg	Dormitor 1 mg/ml	Dormicum 5 mg/ml	Fentanyl 0,05 mg/ml	
14	7	0,07	0,7	0,007	0,014	0,014	0,035
16	8	0,08	0,8	0,008	0,016	0,016	0,040
18	9	0,09	0,9	0,009	0,018	0,018	0,045
20	10	0,10	1,0	0,010	0,020	0,020	0,050
22	11	0,11	1,1	0,011	0,022	0,022	0,055
24	12	0,12	1,2	0,012	0,024	0,024	0,060
26	13	0,13	1,3	0,013	0,026	0,026	0,065
28	14	0,14	1,4	0,014	0,028	0,028	0,070
30	15	0,15	1,5	0,015	0,030	0,030	0,075

Tab. 1 Dosierungsschema: Narkose bei Mäusen mit MMF

Ein auf ca. 35°C erwärmtes und mit Zellstoff umhülltes Gelpaket diente als wärmende Lagerungsschiene, auf der drei Nacktmäuse nebeneinander angeordnet werden konnten. Mit einem Pflasterklebeband wurden die Tiere am Schwanz auf der Unterlage fixiert. Die Atemluft der Mäuse wurde mit Sauerstoff angereichert.

Im Anschluss an den MRT-Scan folgte die Ausleitung der Narkose analog zur Einleitung mit einer Kombination aus Atipamezol / Antisedan® (Fa. Pfizer, New York, USA), Flumazenil / Anexate® (Fa. Roche Austria, Wien, Österreich) und Naloxon / Narcanti® (Fa. Janssen-Cilag, Neuss), kurz AFN, gemäß Dosierungsschema (Tab. 2). Während des Erwachens wurden die Tiere auf einem mit ca. 35°C Wasser gefüllten Einweglatexhandschuh gewärmt.

Gewicht g	Dosierung			Menge			Mischung ml
	Atipamezol mg/kg	Flumazenil µg/kg	Naloxon µg/kg	Antisedan 5 mg/ml	Anexate 0,1 mg/ml	Narcanti 0,4 mg/ml	
14	0,035	7	16,8	0,007	0,07	0,042	0,119
16	0,040	8	19,2	0,008	0,08	0,048	0,136
18	0,045	9	21,6	0,009	0,09	0,054	0,153
20	0,050	10	24,0	0,010	0,10	0,060	0,170
22	0,055	11	26,4	0,011	0,11	0,066	0,187
24	0,060	12	28,8	0,012	0,12	0,072	0,204
26	0,065	13	31,2	0,013	0,13	0,078	0,221
28	0,070	14	33,6	0,014	0,14	0,084	0,238
30	0,075	15	36,0	0,015	0,15	0,090	0,255

Tab. 2 Dosierungsschema: Narkoseausleitung bei Mäusen mit AFN

3.3.4 Injektionstechnik

Zum Zeitpunkt der Injektion befanden sich die Mäuse noch in Narkose aus der vorangegangenen MRT-Untersuchung (s. unten). Zur Erleichterung der Injektion wurde der Schwanz der Tiere zur Dilatation der Venen in einem Wasserbad von ca. 40°C erwärmt und mit Cutasept®F (Fa. Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert. Das Probenmaterial in der Spritze (Fa. Codan, Nadel: 27G BD Microlance™) wurde noch einmal durch Schwenken der Spritze und Vor- und Zurückbewegung des Kolbens vorsichtig gemischt und der Maus über eine der beiden Schwanzvenen verabreicht (Abb. 3).

Gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz wurde bei der i.v.-Applikation auf eine besonders geringe Injektionsgeschwindigkeit geachtet sowie das empfohlene Maximalvolumen von 5ml/kg KG bzw. 5µl/g KG [53] möglichst eingehalten. Zuletzt wurden die Mäuse, wie bereits beschrieben, aus der Narkose erweckt.

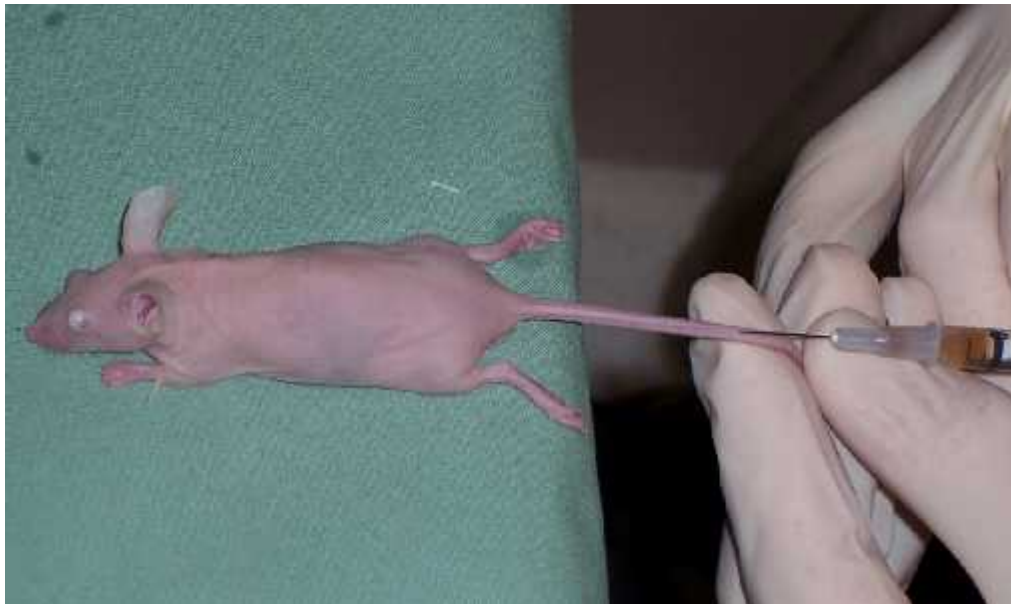


Abb. 3 i.v. Injektion einer Suspension Resovist® markierter CD34+ Zellen

3.4 MRT-Untersuchung

3.4.1 Versuchsanordnung

Für die in vivo Bildgebung wurde ein 1,5T Kernspintomograph (ACS NT; Phillips, Best, Niederlande) eingesetzt.

Dem in vivo Versuch vorangegangen war eine demonstrative in vitro Untersuchung. Zellsuspensionen von 5×10^6 Resovist® markierten CD34+ Zellen und von 5×10^6 unmarkierten CD34+ Zellen waren im Reagenzglas in der Kernspintomographie mit T2*-Wichtung untersucht worden.

Nach Narkose und entsprechender Lagerung (s.o.) wurden jeweils drei Versuchstiere in einer Handgelenksspule für MRT (Medical Advances, Milwaukee, WI, USA) platziert und diese auf der MRT-Liege ausgerichtet (Abb. 4).

Pro Versuchsreihe wurden jeweils drei zuvor eindeutig gekennzeichnete Mäuse untersucht. Als Ausgangsbefund wurde ein MRT-Scan vor Probeninjektion durchgeführt. Die Verlaufsaufnahmen wurden unter gleicher Anordnung der Tiere zwei Stunden und 24 Stunden nach der Injektion erstellt.

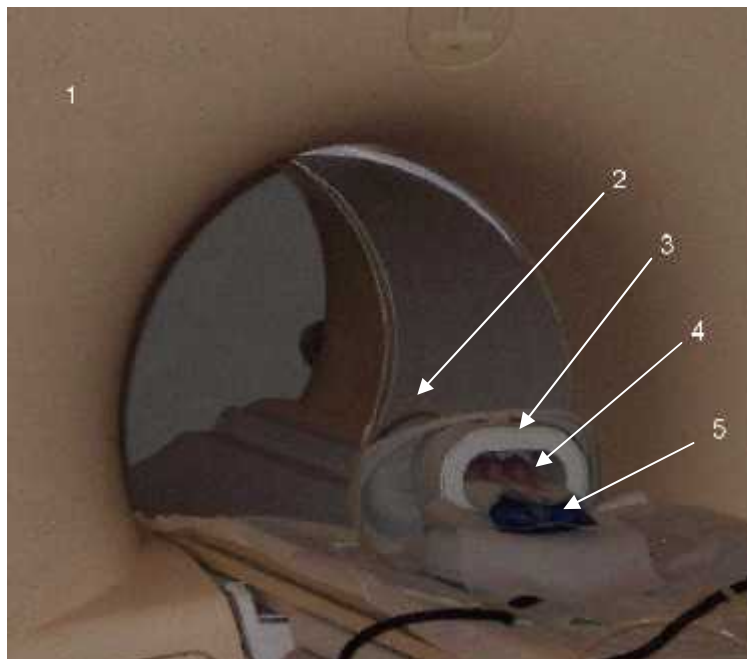


Abb. 4 Versuchsanordnung im MRT

1: MRT, 2: Sauerstoffzuleitung, 3: Handgelenksspule, 4: Versuchstiere, 5: Wärmekissen

3.4.2 Bildgebung

Folgende Pulssequenzen wurden dabei verwendet: coronare T2*-gewichtete zweidimensionale turbo spin-echo Sequenz (Repetitionszeit [msec] / Echozeit [msec] 3700/90 mit 90° Flipwinkel und Schichtdicke 600µm) und coronare T2*-gewichtete dreidimensionale fast field-echo Sequenz (Repetitionszeit [msec] / Echozeit [msec] 32/14 mit 15° Flipwinkel und Schichtdicke 400µm). Der untersuchte Bildausschnitt war 100 x 80mm mit einer 512 x 512 Pixelmatrix und einer räumlichen Auflösung von 200 x 150µm.

Ein Problem bei derartigen Untersuchungen stellt das „Hintergrundrauschen“ dar, d.h. je nach Gewebeeigenschaft werden auch ohne Kontrastmittel im MRT Signale gemessen und entsprechend zu Bildern verarbeitet. Eine Signaländerung ist möglicherweise vor diesem Hintergrund schwieriger zu erkennen. Zur Objektivierung der Ergebnisse wurden daher einzelne Bereiche in Leber, Muskel und Knochenmark von Femura und Wirbelkörpern definiert und für diese die sog. signal-to-noise Ratio (SNR) berechnet. Durch Division konnte dadurch das Hintergrundsignal („Rauschen“) relativiert werden. Eine verminderte SNR in den Verlaufsscans nach zwei und 24 Stunden im Vergleich zur Ausgangsmessung vor Injektion entsprach somit einem Signalabfall und wurde entsprechend als absolute Zahl mit negativem Vorzeichen dokumentiert. Für statistische Berechnungen verwendeten wir SPSS 16.0 (Microsoft Windows). Zeigten sich in einer statistischen Varianzanalyse Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von 5%, wurde zur genaueren Bestimmung ein Post-hoc-Test (Students T-Test mit Bonferroni Korrektur und zweiseitigem Signifikanzniveau) angeschlossen.

3.5 Histologische Untersuchungen

3.5.1 Materialgewinnung

Nach dem 24h-Scan im MRT wurden die Mäuse noch in Narkose getötet. Bei im Genick fixiertem Schädel wurde durch Zug am Schwanz das Rückenmark im Bereich der Halswirbelsäule überdehnt/gekappt. Der Tod trat sofort ein. Als Nachweis dienten hierzu die nicht mit dem Leben vereinbare, palpatorisch überprüfte Durchtrennung des Rückenmarks und die Erschlaffung der Sphinkteren. In Rückenlage erfolgte ein kleiner Hautschnitt am Unterbauch und die stumpfe Abtrennung der Haut. Unter Schonung des Gastrointestinaltraktes wurden die Bauchhöhle eröffnet und die Milz in toto sowie ein Teil der Leber entnommen. Der Bauchschnitt wurde nach kranial verlängert und über den eröffneten Thorax ein Teil der Lunge entnommen. Von den beiden Hinterläufen der Maus wurden die Femura und Tibiae luxiert und entnommen, wobei der Markraum jeweils einseitig eröffnet wurde. Ein Stück Muskel wurde zusätzlich von einem Oberschenkel abgetrennt.

3.5.2 Konservierung und Entkalkung

Die entnommenen Knochen und Organe wurden ca. 24h in 3,5-3,7%iger, neutral gepufferter Formaldehyd-Lösung (Fa. Otto Fischer, Saarbrücken) fixiert. Um die Knochen später sauber schneiden zu können, mussten sie entkalkt werden. Die Knochen wurden hierfür ca. zwei Tage in 0,5 molare EDTA-Lösung mit pH 8,0 (Ethyldiamintetraessigsäure, Eigenherstellung Pathologie München rechts der Isar), eingelegt. Dabei bildete EDTA mit Calcium aus dem Knochen relativ stabile Chelat-Komplexe, wodurch dem Knochen Calcium entzogen wurde und er seine Steifigkeit verlor.

3.5.3 Herstellung der Präparate

Zuerst wurden Fixations- und Entkalkungslösung aus den Organen und den entkalkten Knochen mit aqua dest. ausgewaschen und anschließend durch eine

aufsteigende Alkoholreihe mit Isopropanol entwässert. Nach Inkubation mit Xylol wurden die Proben in heißem Paraffin eingebettet. Nachdem die Blöcke erkaltet waren, wurden an einem Mikrotom 5µm dicke Schnitte angefertigt.

3.5.4 Färbung für Lichtmikroskopie

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung sowie die Eisen-Färbung mit Berliner Blau Reaktion übernahm ein Färbeautomat (Fa. Dako, Hamburg). Zuvor wurden die Präparate nach Standardprotokoll mit Xylol (dreimal 10 min.), Isopropanol (zweimal 5 min.), 96% und 70% Ethanol und aqua dest. (jeweils 5 min.) behandelt und entparaffiniert.

3.5.5 Färbung für Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst wurden die Proben nach Standardprotokoll entparaffiniert und die Antigene demaskiert. Dies geschah im Kochtopf mit Citratpuffer mit pH 6,0 für 7 min. Danach wurden die Slides 3x5 min. in PBS (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München) gespült. Nun wurde 10 min. mit 50nM NH₄Cl (Fa. Roth, Karlsruhe) inkubiert und wieder 3x mit PBS gespült. Im Anschluss erfolgten die Inkubation mit 0,25% Triton X-100 (Fa. Dako) in PBS und erneute dreimalige PBS-Spülung. Jetzt wurde für 30 min. mit 5% Normal Goat Serum (Fa. Dako) geblockt, bevor die Slides mit dem primären anti-Dextran Antikörper (FITC-gelabeled (s.u.), Stem Cell Technologier, Seattle, USA, Verdünnung: 1:100) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zuvor waren die Zellen noch mit Merckofix-Spray (Fa. Merck, Darmstadt) 20 min. fixiert worden. Nach drei PBS-Spülungen erfolgte die Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindoledilacetat (DAPI, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, München). Danach wurden die Präparate noch einmal kurz mit PBS gespült, mit Vectashield Mountain-Medium (Fa. Vector Laboratories, UK) eingedeckelt und bei -20°C im Dunkeln gelagert. Für eine spätere Positivkontrolle wurden analog dazu Präparate aus Zellsuspensionen von CD34+ Zellen hergestellt, die, wie in Gliederungspunkt 3.1.4 beschrieben, isoliert worden waren, jedoch nicht injiziert worden waren.

FITC

Das Fluorochrom FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) ist ein kleines organisches Molekül, bestehend aus mehreren aromatischen Ringstrukturen (Abb. 5), das mehrere delokalisierte Elektronen besitzt und sich gut zur Fluoreszenz anregen lässt. Über tertiäre Amine kann es mit Proteinen, im beschriebenen Versuch mit Antikörpern, eine Bindung eingehen. Die optimale Anzahl liegt dabei bei 3 – 6 FITC - Molekülen pro Antikörper. Das Absorptionsmaximum, was der Anregungswellenlänge entspricht, liegt bei ca. 490nm, das Emissionsmaximum liegt bei 520-530nm. Die sichtbare Fluoreszenz ist leuchtend grün [39]. Unter Verwendung des FITC-Filtersets wird vor allem Zytoplasma sichtbar, insbesondere solches mit enthaltenen FITC-Molekülen. Die Zellkerne können indirekt als dunkle Aussparung erkannt und beurteilt werden.

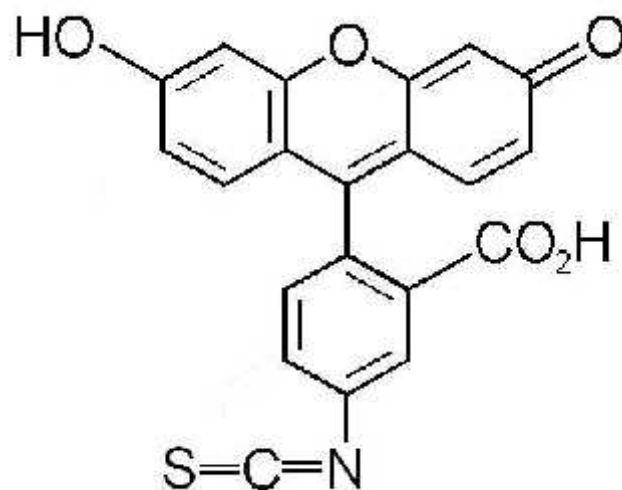


Abb. 5 Strukturformel von FITC

DAPI

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ebenfalls ein aromatisches Molekül mit delokalisierten Elektronen (Abb. 6). Es kann langsam intakte Zellmembranen durchdringen und an DNA binden. Hierbei lagert sich DAPI vornehmlich an AT-reiche Sequenzen im Bereich der kleinen Furche an. Gebunden an doppelsträngige DNA liegt das Absorptionsmaximum bei ca. 358nm, das Emissionsmaximum bei 461nm. DAPI fluoresziert dabei mit blauer bis cyaner Farbe [38]. Bei Mikroskopie mit DAPI-Filterset wird selektiv DNA dargestellt und somit die Morphologie der Zellkerne

sichtbar, das Zytoplasma dagegen kann nicht beurteilt werden. Für die Färbung lebender Zellen ist DAPI aufgrund der DNA-bindenden Eigenschaften nicht zu empfehlen, da es toxisch und mutagen wirkt.

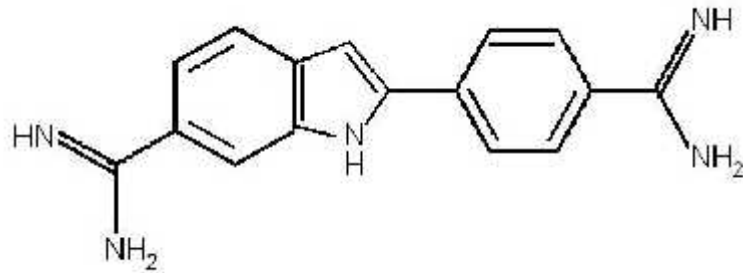


Abb. 6 Strukturformel von DAPI

3.5.6 Lichtmikroskopie

Die mit Berliner Blau Reaktion gefärbten Knochenpräparate wurden auf das Vorhandensein mauseigenen Speichereisens lichtmikroskopisch untersucht. Dies diente der Einschätzung bzw. dem Ausschluss möglicher Artefakte in der MRT-Untersuchung durch ortständige eisenhaltige Zellen. In Zellen, die Eisen natürlicherweise gespeichert haben, liegen lichtmikroskopisch sichtbare dunkelblaue Granula vor. Unter einem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Jena) wurden die Schnitte bei eingestelltem 20fach Objektiv mäanderförmig durchwandert und eisenhaltige, angefärbte Zellen dokumentiert.

Im weiteren Verlauf wurde an den mittels FACS separierten humanen CD34+ Zellen (s. Gliederungspunkt 3.6.3) ebenfalls eine Färbung mit Berliner Blau Reaktion durchgeführt. Das Präparat wurde lichtmikroskopisch auf Eisengranula, die durch die Markierung mit Resovist® entstanden sind, untersucht.

3.5.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die mit dem FITC-Antikörper und DAPI behandelten Objektträger wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach CD34+ Stammzellen abgesucht. Dabei gliederte sich die Suche in zwei Abschnitte, das Screening mit Detektion von CD34+ Zellen und die Dokumentation mit dem gezielten Aufsuchen der gefundenen Zellen bei Präparaten mit hoher CD34+ Dichte, wobei die Möglichkeit von Stapel – und Zweifilteraufnahmen gegeben ist. Im Folgenden werden diese beiden Schritte detailliert beschrieben:

Screening

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) wurde aus dem Spektrum der Lichtquelle (Quecksilberdampf-Lampe: Zeiss AttoArc HBO 100W) über den Anregungsfilter ein für FITC geeigneter Bereich selektiert, in den Strahlengang eingebracht und auf das Knochenpräparat gerichtet. Nach Orientierung unter geringer Vergrößerung (10x Objektiv) folgte die gezielte Suche nach CD34+ Zellen mit stärkerer Vergrößerung (63x Objektiv). Für die gesuchten Zellen galten hierbei folgende physikalische und morphologische Kriterien:

- mit FITC-Filter: deutlich stärker grün leuchtender Saum um den Zellkern als bei den übrigen Zellen im Gewebe (hervorgerufen durch Besatz der Dextran-umhüllten Eisenpartikel mit FITC-Antikörper)
- mit FITC-Filter: großes Kern-Plasma-Verhältnis, runder, nicht gelappter Zellkern (als Negativ bzw. Aussparung im grünen Plasma erkennbar)
- mit DAPI-Filter: runder, nicht gelappter Zellkern (deutlicher erkennbar als mit FITC- Filter)

Als Referenz wurden hierzu auch die Aufnahmen der reinen CD34+ Zellsuspensionen zum Vergleich herangezogen.

Während des Mikroskopierens wurde das Gesichtsfeld über eine Kamera (AVT-HORN MC-3255) abgefilmt und als Live-Bild am PC dargestellt (Software: AxioVision Ref. 4.5, Fa. Zeiss) (Abb. 7). Zellen, die den oben genannten Kriterien gerecht

wurden, konnten hier noch einmal vergrößert überprüft und zur Dokumentation digitalisiert werden. Die Lage der Zelle im Präparat wurde über das am Mikroskop vorhandene Koordinatensystem festgehalten.

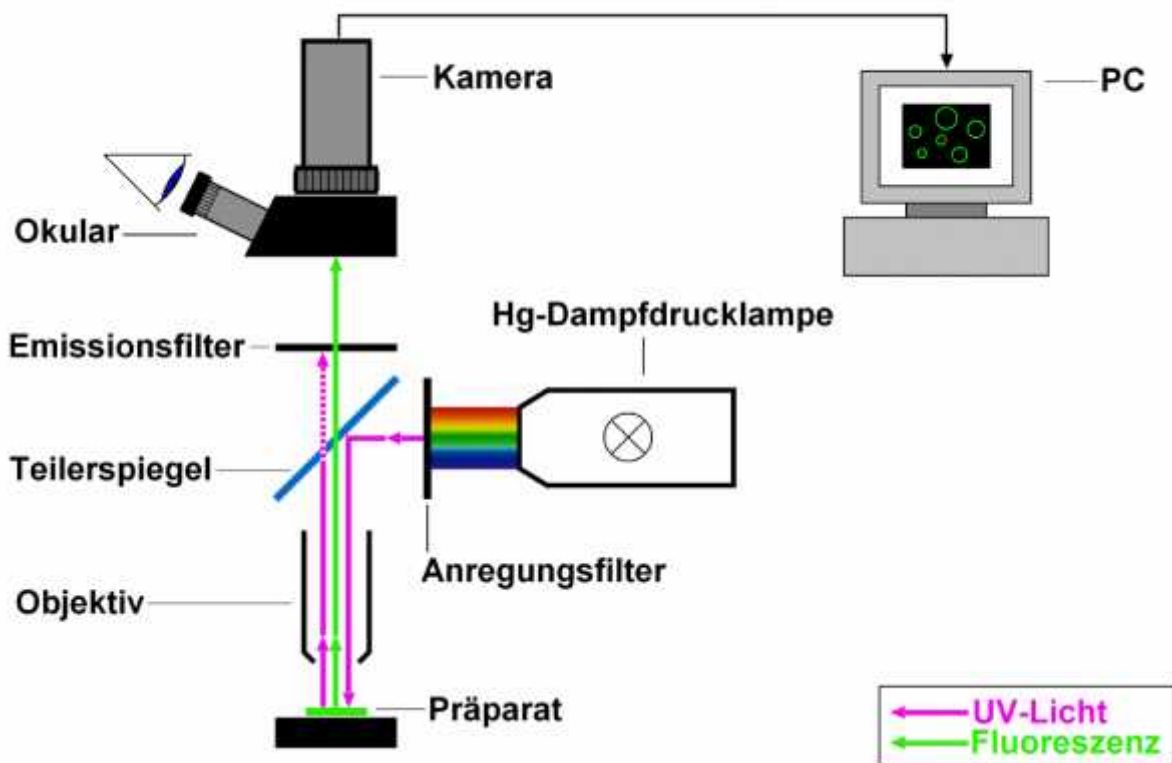


Abb. 7 Schema eines Fluoreszenzmikroskops und des Versuchsaufbaus bei der Fluoreszenzmikroskopie

Dokumentation

Die Versuchsanordnung aus Mikroskop (Apotom Axiovert 200M, Fa. Zeiss), Kamera (Axiocam HRm, Fa. Zeiss) und PC (Software: AxioVision LE Rel. 4.5, Fa. Zeiss) entsprach im Wesentlichen der der Screeningmethode, jedoch handelte es sich hierbei um ein Mikroskop mit inversem Strahlengang. Das bedeutet, dass die Anordnung von Lichtquelle und Objektiv im Vergleich zu einem herkömmlichen Mikroskop um 180° gedreht ist. Die Objektträger werden dementsprechend ebenfalls einmal gedreht, bevor sie eingelegt werden.

Unter dem Mikroskop wurden gezielt Bereiche mit dokumentierten Zellen aufgesucht. Dabei wurde die selbe Vergrößerung (63x Objektiv) eingesetzt. Zusätzlich wurde eine weitere Funktion dieses Mikroskops eingesetzt, die sog. Optical Sectioning

Microscopy (OSM). Dabei können verschiedenen Ebenen des Präparats, bzw. auch der untersuchten Zellen, scharf dargestellt werden und somit praktisch Schichtaufnahmen erzeugt werden. Dies lässt zum einen eine genauere Beurteilung der einzelnen Zellen zu, zum anderen werden durch die Untersuchung mehrerer Schichten falsch positive Ergebnisse durch Artefakte reduziert.

Die ausgewählten Zellen wurden mit FITC-Filter sowie DAPI-Filter fotografiert, übereinander projiziert und mit der Software zu einem Bild fusioniert. Das so entstandene Bild wurde gespeichert. Der Vorteil dieser Aufnahmetechnik liegt in einer besseren Beurteilbarkeit, da neben dem Kriterium der FITC-Markierung auch die morphologischen Kriterien wie Größe, Kern-Plasma-Relation und Kernstruktur auf einem Bild sichtbar sind und bewertet werden können.

3.5.8 Durchflusszytometrie / FACS-Analyse

Als zusätzlicher Nachweis der CD34+ Zellen im Knochenmark der Versuchstiere lief eine weitere Versuchsreihe, bei der im Anschluss an das MRT eine FACS-Analyse ("fluorescence activated cell sorting") des Knochenmarks durchgeführt wurde. Durchflusszytometer, mit welchen FACS-Analysen durchgeführt werden, sind in den meisten Laboren oder Forschungseinrichtungen vorhanden. Hierbei wird zunächst die zu untersuchende Zellsuspension mit Markern (s.u.) inkubiert. Diese Marker binden an entsprechende Oberflächenmerkmale der verschiedenen Zellen. Im Durchflusszytometer passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, dabei entsteht je nach Markierung und Größe der Zelle ein Fluoreszenzsignal. Das Signal wird registriert, somit kann eine quantitative und qualitative Auswertung der Zellsuspension stattfinden. Des Weiteren können Zellen mit gleichem Signal "sortiert" werden, d.h. je nach Signal werden die Zellen in unterschiedliche Auffangbehältnisse geleitet.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Flow Jo. Neben grafischen Darstellungen können auch quantitative Berechnungen durchgeführt werden. Voraussetzung hierfür sind korrekte Einstellungen und Anpassungsvorgänge, die der Nutzer tätigen muss.

Zum einen sollte eine sog. Kompensation durchgeführt werden. Die Durchflusszytometrie arbeitet über die Detektion von Fluoreszenzsignalen, die durch Antikörper auf dem untersuchten Zellmaterial ausgesendet werden. Da diese Signale keiner exakten Wellenlänge entsprechen, sondern einem Wellenlängenbereich, kommt es hierbei zu Überschneidung mit Wellenlängenbereichen anderer Fluoreszenzmarker. Somit trifft das Licht teilweise auch auf andere Detektoren und führt damit zu einer Falsch- oder Mehrfachregistrierung. Diese Überschneidungen sind bekannt und im Programm hinterlegt. Der Nutzer kann über eine Kompensationsfunktion diese Fehler herausrechnen lassen.

Über das sog. Gating (Schleusen) können Zellgruppen über die Software weiter aufgeschlüsselt werden. Entsprechende Bereiche werden vom Benutzer am PC ausgewählt, eine Programmfunktion stellt daraufhin Untergruppen grafisch dar. Diese können nun wiederum weiter aufgeteilt werden. Diese Funktion ist unter anderem sinnvoll, um lebende von apoptotischen Zellen zu trennen und die Gruppe der lebenden Zellen in einem weiteren Schritt genauer zu analysieren.

Die Femura der Mäuse wurden wie oben beschrieben präpariert, an beiden Enden mit einer sterilen Schere abgeschnitten und das Knochenmark über eine 25G BD MicrolanceTM-Nadel mit Standardpuffer heraus gespült. Nach Zentrifugieren (7 min. bei 1500 Umdrehungen) und Absaugen des Überstands erfolgten die Erythrozytenlyse (5min bei Raumtemperatur), Auffüllen der Proben mit Puffer auf 500µl und die Zugabe von jeweils 25µl CD45PE, CD71PE und CD34FITC und PI (Fa. Beckmann Coulter, Krefeld). Die Markierung wurde nach 30 min. beendet, die Proben standardmäßig gewaschen und über einen 30µm-Filter gefiltert. Das so präparierte Zellmaterial wurde an einem Durchflusszytometer (Smart Sampler, Fa. DakoCytomation, Hamburg) untersucht und ausgezählt. Als Kontrolle und zur späteren Kompensation wurde zusätzlich eine Probe mit IgG-FITC, IgG-PE und PI gemessen. Diese sog. Isotypenkontrolle wird mit Antikörpern durchgeführt, die nicht gegen Antigene gerichtet sind, die im Untersuchungsmaterial exprimiert werden (Tab. 3). Sie haben jedoch die gleichen Fluoreszenzeigenschaften wie die im Versuch verwendeten Antikörper. Die in der Isotypenkontrolle positiven Ergebnisse, die z.B. durch unspezifisches Bindungsverhalten von Antikörpern oder durch Eigenfluoreszenz entstehen, stellen somit eine Art Leeraufnahme des Versuchs mit einem gewissen "Grundrauschen" an Fluoreszenz dar. Eine Ungenauigkeit, die durch

diese unspezifischen Vorgänge entstehen würde, kann beseitigt werden, indem dieses "Grundrauschen" vom Ergebnis abgezogen wird.

PE	Phycoerythrin, gelbrot fluoreszierendes Molekül
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat, grünlich fluoreszierendes Molekül
PI	Propidium Iodid, rot fluoreszierendes Molekül, bindet an DNA, kann nur geschädigte Zellmembranen durchdringen und färbt somit nur abgestorbene Zellen
CD34	Oberflächenprotein auf hämatopoetischen Stammzellen
CD45	Oberflächenprotein (Tyrosinphosphatase), typischerweise exprimiert von Zellen des hämatopoetischen Systems
CD71	Oberflächenprotein (Transferrin-Rezeptor), auf vielen Zellen exprimiert
CD34FITC	Antikörper gegen humane CD34-Oberflächenproteine, gekoppelt mit FITC
CD45PE	Antikörper gegen humane CD45-Oberflächenproteine, gekoppelt mit PE
CD71PE	Antikörper gegen humane CD71-Oberflächenproteine, gekoppelt mit PE
IgG-FITC	Antikörper (Immunglobulin G), gekoppelt mit FITC, für Isotypenkontrolle (zum Aufdecken falsch positiver Ergebnisse und deren Kompensation)
IgG-PE	Antikörper (Immunglobulin G), gekoppelt mit PE, für Isotypenkontrolle(zum Aufdecken falsch positiver Ergebnisse und deren Kompensation)

Tab. 3 Verwendete Antikörper und Fluoreszenzmarker

Da diese standardmäßig bei ähnlichen Untersuchungen verwendet werden, wird nur eine Kurzbeschreibung zum besseren Verständnis des Versuchsablaufs und der Ergebnisse aufgelistet.

4 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 39 Balb/c Nude Mäuse für die Versuche verwendet. Zehn Tiere verstarben während der Versuche und wurden daher nicht in die Auswertung eingeschlossen (als Ursache am wahrscheinlichsten sind thrombembolische Geschehnisse im Rahmen der Injektion). Bei drei Tieren war die Bildgebung aufgrund einer Kontrastmittelüberdosierung nicht repräsentativ, bei fünf Mäusen war aus unklarer Ursache die MR-Tomographie unbrauchbar. Somit konnten 21 Tiere radiologisch und histologisch ausgewertet werden.

4.1 Ergebnisse der Markierung und Kontrastmittelaufnahme

4.1.1 Kontrastmittelaufnahme frischer und aufgetauter CD34+ Zellen

Der Erfolg der Markierung der humanen CD34+ Zellen mit einem der SPIO-Kontrastmittel wurde in der Durchflusszytometrie überprüft. Der Antidextran-Antikörper FITC-Annexin V (Fa. BD Biosciences) markierte dabei selektiv die mit Kontrastmittel beladenen Zellen, da die Dextranhülle der Kontrastmittelpartikel natürlicherweise nicht vorkommt und daher experimentell über das Kontrastmittel in die Zellen gelangt sein muss. Mit PI (Fa. Invitrogen) wurden abgestorbene Zellen markiert, da PI nur durch geschädigte Zellmembranen eindringen kann und dann an die DNA binden kann.

Dabei zeigten frische CD34+ Zellen mit einer Kontrastmittelaufnahme von 85% für Resovist® und 83% für Endorem® ein besseres Aufnahmevermögen im Vergleich zu aufgetauten Zellen mit 49% und 61% (Tab. 4).

	L - Resovist®	L - Endorem®
aufgetaute CD34+ Zellen	49%	61%.
frische CD34+ Zellen	85%	83%

Tab. 4 Markierte Zellen nach Inkubation mit Lipofectamin® - Resovist® oder Lipofectamin® - Endorem®

4.1.2 Proliferationsfähigkeit SPIO markierter CD34+ Zellen

Für die weiteren Versuche sollte das Kontrastmittel verwendet werden, welches bei guten Transfektionseigenschaften die Proliferation der markierten Zellen am wenigsten beeinflusst. Zum Vergleich wurden Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) auf Methylcellulose ausgezählt. In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Auszählung zusammengefasst. Zellen ohne weitere Inkubation bilden erwartungsgemäß die meisten Kolonien, Zellen nach Inkubation weniger. Die mit Lipofectamin® und Endorem® bzw. Resovist® markierten Zellen zeigten ein noch geringeres Koloniewachstum, wobei die Resovist® markierten Zellen sowohl, was die unterschiedlichen Kolonien angeht, also auch entsprechend bei der Gesamtkoloniezahl den Endorem® markierten Zellen überlegen waren.

	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM	gesamt
Kontrolle ohne Inkubation	20,4	16,4	11,6	49,4
Kontrolle nach Inkubation	16,3	9,5	6,6	32,4
Lipofectamin®-Endorem®	9,0	4,8	2,8	16,6
Lipofectamin®-Resovist®	10,2	8,6	5,2	24,0

Tab. 5 Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) auf Methylcellulose pro 100 Zellen

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Versuch das SPIO-Kontrastmittel Resovist® für die Untersuchungen verwendet, da es wie gefordert die Proliferation weniger beeinträchtigt als das zum Vergleich stehende Endorem®.

4.1.3 Funktionalität und Überleben SPIO markierter CD34+ Zellen

Ob die Markierung mit Resovist® oder Endorem® einen negativen Effekt auf die Funktionalität und das Überleben der CD34+ Zellen hat, wurde durch Bebrütung der Nährmedien über zwei, sechs, acht und zwölf Wochen und die anschließende Auszählung von CAFCs untersucht. Es zeigte sich dabei zwischen den beiden Kontrastmitteln kein deutlicher Unterschied. Im Vergleich zu einer Inkubation ohne SPIO-Kontrastmittel konnte jeweils ebenfalls kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Tab. 6). Da zwischen den beiden untersuchten Kontrastmitteln hinsichtlich der Funktionalität der Zellen kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte, Resovist® jedoch bezüglich der Proliferation Vorteile bot (s. Gliederungspunkt 4.1.2), wurde, wie bereits angegeben, im weiteren Versuch Resovist® verwendet.

	CAFCw2	CAFCw6	CAFCw8	CAFCw12
Kontrolle ohne Inkubation	44,6 ± 11,3	15,7 ± 5,1	9,8 ± 2,2	5,4 ± 2,0
Kontrolle nach Inkubation	17,8 ± 4,0	4,2 ± 0,5	4,0 ± 0,9	2,0 ± 0,1
Lipofectamin®-Endorem®	21,0 ± 4,2	3,9 ± 0,9	8,9 ± 2,2	2,5 ± 0,2
Lipofectamin® Resovist®	23,8 ± 5,1	4,1 ± 0,8	7,5 ± 2,0	1,7 ± 0,3

Tab. 6 CAFCs pro 100 CD34+ Zellen nach zwei Wochen (w2), nach sechs Wochen (w6), nach acht Wochen (w8), nach zwölf Wochen (w12)

4.1.4 Überleben kontrastmittelmarkierter CD34+ Zellen

In der Durchflusszytometrie wurden CD34+ Zellen ohne Markierung verglichen mit CD34+ Zellen vier Stunden nach Inkubation mit Lipofectamin® oder Lipofectamin® mit Resovist®. Bei Untersuchung von jeweils fünf dieser Versuchsansätze zeigte sich in der Auswertung der Durchflusszytometrie kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate der CD34+ Zellen (Abb. 8).

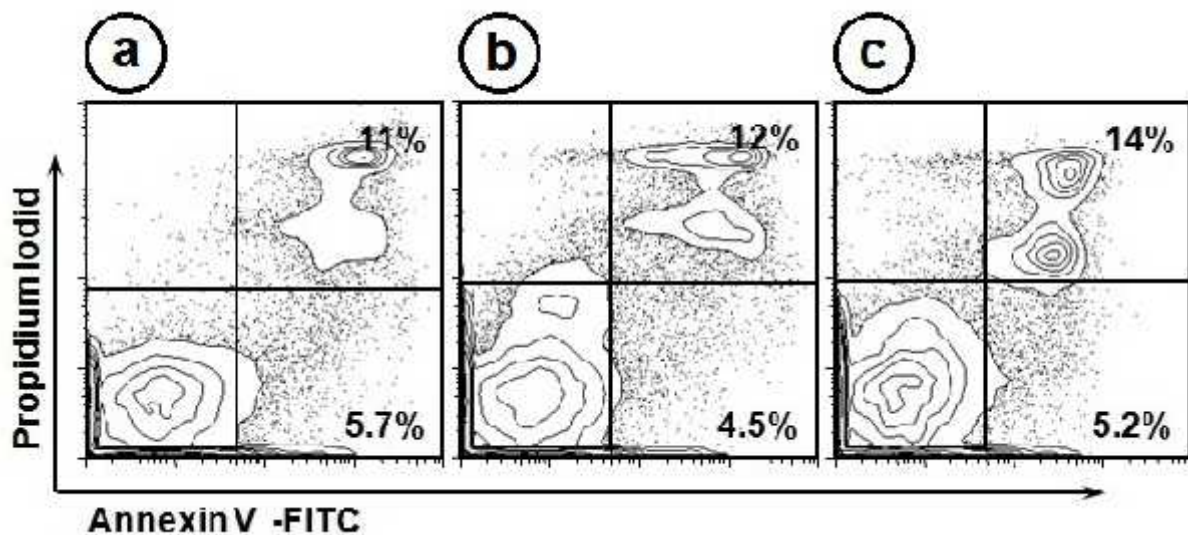


Abb. 8 Auswertung der Durchflusszytometrie zur Apoptoserate

- a: CD34+ Zellen nach vierstündiger Inkubation ohne Lipofectamin® oder Resovist®
- b: CD34+ Zellen nach vierstündiger Inkubation mit Lipofectamin®
- c: CD34+ Zellen nach vierstündiger Inkubation mit Lipofectamin® und Resovist®

Die oben zusammengefassten Ergebnisse, insbesondere der Vergleich der SPIO-Kontrastmittel Resovist® und Endorem®, wurden in Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit Viktoria Bekker-Ruz, Sandra Hippauf und Robert Oostendorp erhoben. Für die Erlaubnis die teilweise unveröffentlichten Ergebnisse mit verwenden zu dürfen sei an dieser Stelle gedankt.

4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellmarkierung

Kryokonservierte und wieder aufgetaute CD34+ Zellen aus menschlichem Nabelschnurblut nehmen SPIO-Kontrastmittel (im Versuch Endorem® und Resovist®) auf. Die Aufnahme ist dabei geringer als bei den gleichen Zellen in frischem Zustand. Etwa in der Hälfte der aufgetauten Zellen konnte eine erfolgreiche Kontrastmittelmarkierung nachgewiesen werden. Für den Versuch ist dies eine ausreichend hohe Erfolgsrate, so dass weiterhin mit kryokonservierten CD34+ Zellen gearbeitet wurde. Die Proliferationseigenschaften der Zellen wurden durch Auszählung von Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) auf Methylcellulose nach Inkubation mit jeweils Endorem® und Resovist® sowie in Kontrollgruppen ohne SPIO überprüft. Die kontrastmittelmarkierten Zellen bildeten dabei weniger Kolonien als die nicht markierten Zellen der Kontrollgruppen. Im Vergleich der beiden verwendeten SPIO-Kontrastmittel bildeten sich bei Inkubation mit Resovist® sowohl bei den jeweiligen Koloniearten als auch bei Auswertung der Gesamtkoloniezahl mehr Kolonien als bei Inkubation mit Endorem®. Hinsichtlich der Funktionalität der untersuchten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen nicht markierten Zellen, Zellen mit Endorem® und Zellen mit Resovist®. In Langzeitkulturen war jeweils eine vergleichbare Anzahl CAFCs zu finden. Da Resovist® gegenüber Endorem® Vorteile bei der Proliferation bot und bezüglich Funktionalität kein Unterschied zwischen den beiden Kontrastmitteln gefunden werden konnte, wurde zur Kontrastmittelmarkierung für die MRT-Untersuchungen Resovist® verwendet. Die Durchflusszytometrie zeigte keinen signifikanten Unterschied der Apoptoserate zwischen nicht markierten CD34+ Zellen, den gleichen Zellen mit Resovist®-Markierung oder Zellen mit der von uns verwendeten Kombination aus Resovist® und Lipofectamin®.

4.2 Ergebnisse der MRT-Untersuchung

4.2.1 MRT-Signaländerung kryokonservierter Zellen in vitro

Wir konnten bereits zeigen, dass aufgetaute kryokonservierte CD34+ Zellen SPIO-Kontrastmittel aufnehmen können (s. Gliederungspunkt 4.1.1). Wie ebenfalls gezeigt werden konnte, ist die Aufnahme geringer im Vergleich zu frischen CD34+ Zellen. Um nachzuweisen, dass auch die markierten aufgetauten Zellen eine ausreichende Signaländerung im MRT erzeugen, wurde eine nach gleichem Protokoll markierte Suspension CD34+ Zellen im Reagenzglas im MRT untersucht. Dabei wurden die selben Einstellungen und Kriterien angewandt wie später in den in vivo Untersuchungen. Der Vergleich einer nicht markierten CD34+ Zellsuspension mit einer entsprechenden Suspension von 5×10^6 Resovist® markierten CD34+ Zellen zeigt eine auffällige Signaländerung bei den markierten Zellen im MRT (Abb. 9). Somit können aufgetaute kryokonservierte CD34+ Zellen trotz geringerer Kontrastmittelaufnahme als frische CD34+ Zellen eine deutliche und damit für die Untersuchung ausreichende Signaländerung auslösen.

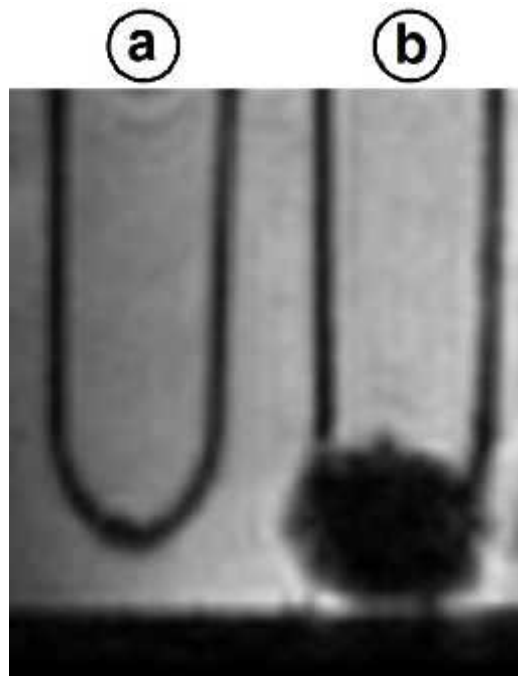


Abb. 9 Reagenzgläser mit Suspensionen aufgetauter CD34+ Zellen im MRT
a: ohne Markierung
b: nach Markierung mit Resovist®

4.2.2 MRT-Signaländerung kryokonservierter Zellen in vivo

Vor Injektion der CD34+ Stammzellen, die mit Resovist® markiert worden waren, sowie zwei und 24 Stunden danach wurden die Versuchstiere im MRT mit T2*-Wichtung untersucht. Dabei wurden speziell Leber, Muskeln und Knochenmark (Femur, Os sacrum) ausgewertet. Als Zahlenwert wurde die SNR verwendet (s. Gliederungspunkt 3.4.2), ein Signalabfall wurde entsprechend als absolute Zahl mit negativem Vorzeichen dokumentiert. Für statistische Untersuchungen legten wir ein Konfidenzintervall (CI) von 95% zugrunde, bei einem p-Wert von unter 0,05 galt die Untersuchung als statistisch signifikant.

In den Kontrollaufnahmen mit Resovist® alleine konnte zwei Stunden nach Injektion in Muskel und Femur ein geringer Signalabfall verzeichnet werden, der später nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war. In der Leber war ein Abfall des Signals auch noch nach 24 Stunden zu sehen.

Bei der Untersuchung der Mäuse nach Gabe von 1×10^6 Resovist® markierten CD34+ Zellen konnten in Muskel und Femur keine deutlichen Signalveränderungen gemessen werden, in der Leber war nur in der 2h-Messung ein gewisser Signalabfall erkennbar.

Nach Injektion von 5×10^6 Resovist® markierten CD34+ Zellen zeigte sich keine Veränderung des Signals im Muskel. In der Leber konnte ein dauerhafter Signalverlust nachgewiesen werden. Auch im Knochenmark war nach zwei und nach 24 Stunden ein leichter Signalabfall zu verzeichnen. Die Varianzanalyse ergab allerdings keine statistische Signifikanz.

Das MRT nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen zeigte für Muskel und Leber ähnliche Ergebnisse wie nach 5×10^6 Zellen. In den Verlaufsuntersuchungen des Knochenmarks konnte ein signifikanter Signalabfall in Femur (-9.0, 95% CI -3.5 bis -14.6, $p=0.003$) und Sacrum (-8.6, 95% CI -3.1 bis -14.2, $p=0.004$) nachgewiesen werden (Abb. 10).

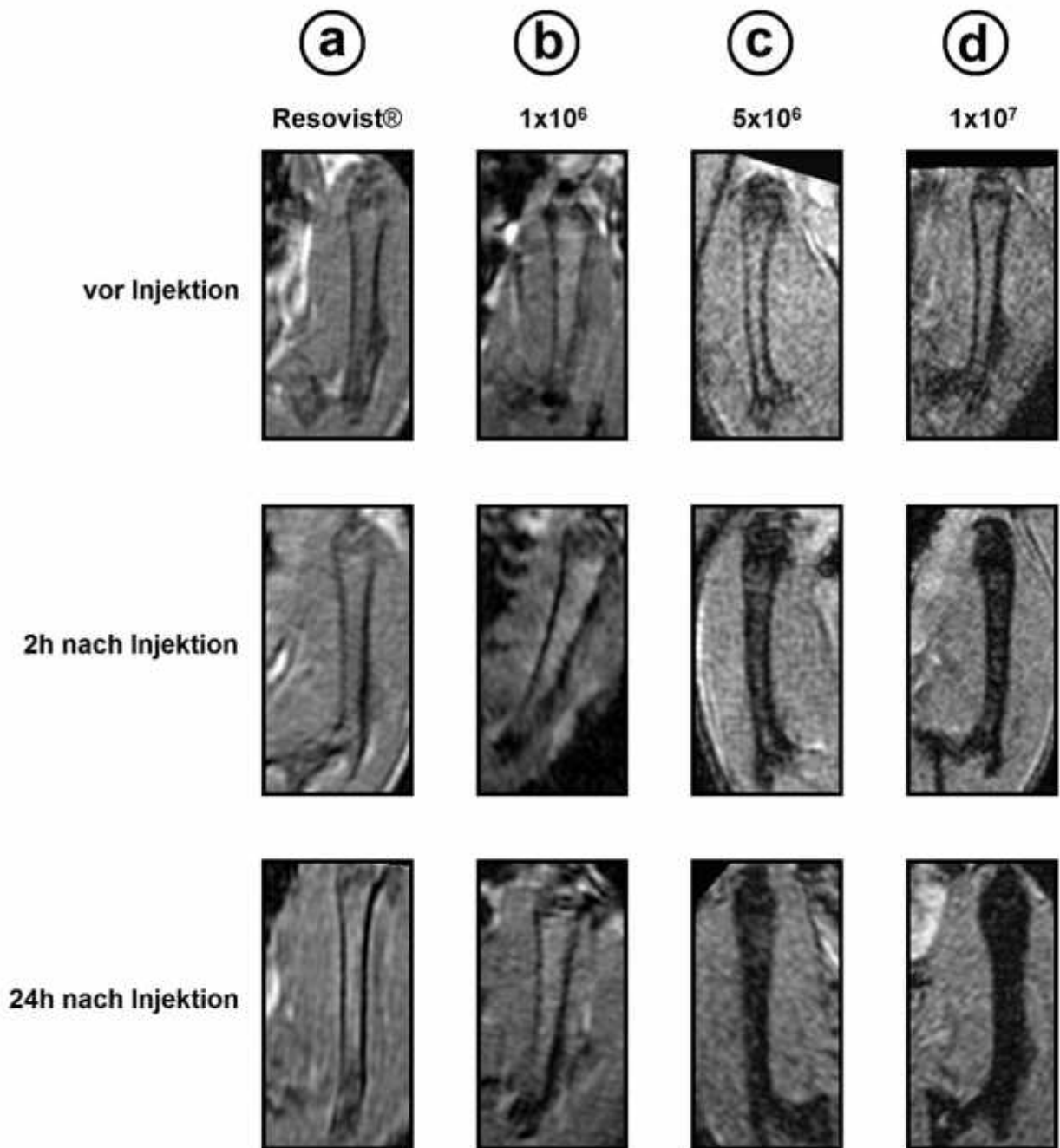


Abb. 10 MRT-Bilder (dargestellt jeweils ein Femur eines Versuchstiers) vor Injektion und nach Injektion im zeitlichen Verlauf nach 2h und nach 24h

a: Resovist® ohne Zellen

b: 1×10^6 Resovist® markierte CD34+ Zellen

c: 5×10^6 Resovist® markierte CD34+ Zellen

d: 1×10^7 Resovist® markierte CD34+ Zellen

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der MRT-Untersuchung

Kryokonservierte menschliche CD34+ Zellen wurden nach der oben gezeigten optimierten Kontrastmittelmarkierung mit Resovist® markiert. Bei Untersuchung dieser Zellsuspension im MRT konnte eine deutliche Signaländerung nachgewiesen werden. Nachdem somit der in vitro Nachweis der Zellen im MRT erfolgreich war, wurde - mit den nach gleichem Protokoll markierten CD34+ Zellen - der Nachweis in vivo angestrebt. Nach Injektion der Proben in die Schwanzvene von Nacktmäusen und mehrfacher MRT-Bildgebung im zeitlichen Verlauf zeigte sich für das reine Kontrastmittel Resovist® eine dauerhafte Signaländerung nur für die Leber. Bei diesen zellfreien Proben war nach 24 Stunden kein Signalabfall im Knochenmark nachweisbar. Bei Proben mit Resovist® markierten CD34+ Zellen konnte ab einer Zellzahl von 1×10^7 ein signifikanter persistierender Signalverlust im Knochenmark nachgewiesen werden.

4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

4.3.1 Lichtmikroskopie

Die HE-Schnitte zeigten für Knochenmark, Leber, Lunge und Milz eine regelrechte Organstruktur.

In der Färbung mit Berliner Blau Reaktion konnten im Markraum aller untersuchten Knochenteile lichtmikroskopisch sehr vereinzelt eisenpositive Zellen nachgewiesen werden. Diese stellten sich morphologisch wie auch von der Konfiguration der Eisenpartikel äußerst heterogen dar. Davon abzugrenzen waren Färbeartefakte, die extrazellulär auftraten und teilweise durch Überlagerung eine intrazelluläre Lage vortäuschten (Abb. 11-a).

In der Leber konnten einige eisenpositive Zellen nachgewiesen werden. Mit spindelförmigem Zellkörper und einem kleinen dunkelroten und dichten Zellkern handelte es sich dabei um Kupffer-Sternzellen, nach Aufnahme von Eisen. Freies Eisen stellte sich nicht dar (Abb. 11-b).

Die Lunge zeigte bis auf wenige Alveolarmakrophagen mit Eisengranula in der Berliner-Blau-Färbung weder andersartige eisenpositive Zellen noch freies Eisen (Abb. 11-c).

Von den untersuchten Organen zeigte die Milz die deutlichste Positivreaktion auf die Eisenfärbung. Hier fanden sich zahlreiche Makrophagen mit hohem Eisenanteil. Extrazellulär konnte kein Eisen nachgewiesen werden (Abb. 11-d).

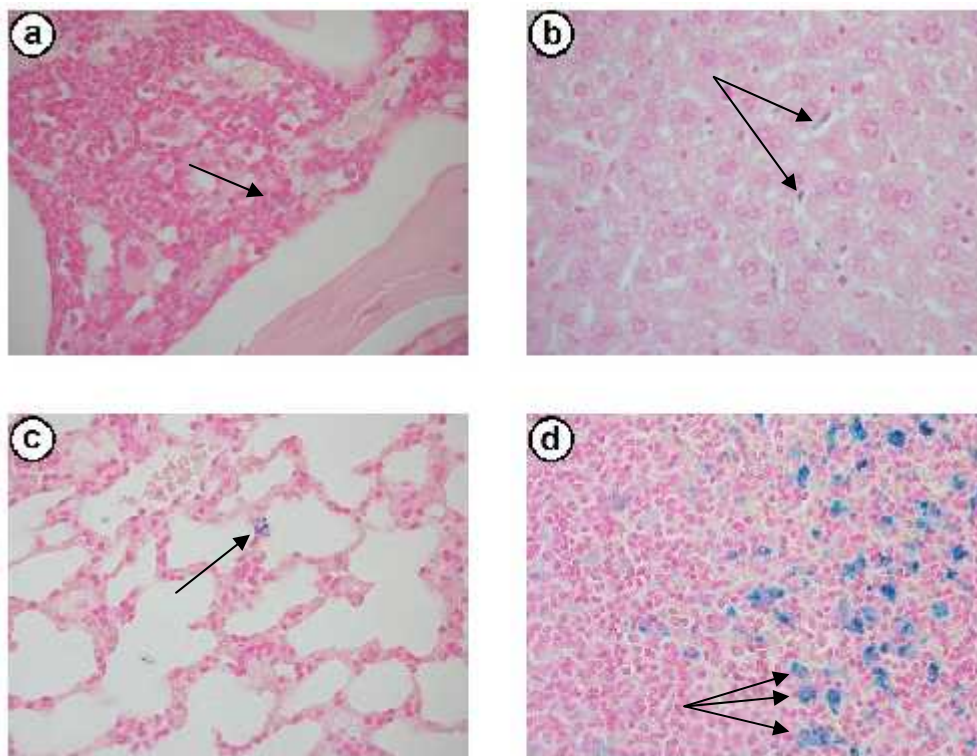


Abb. 11 Präparate unter dem Lichtmikroskop jeweils von Versuchstieren nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen. Färbung: Berliner Blau Reaktion. Vergrößerung ca. 250 fach

- a: Knochen (Femur) eisenpositive Zelle
- b: Leber Kupfer-Sternzellen
- c: Lunge Alveolarmakrophage
- d: Milz Makrophagen

4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie Screening (Zeiss Axioplan 2)

Milz und Leber zeigten unter dem verwendeten FITC-Filter eine gewisse Eigenfluoreszenz des mauseigenen Gewebes. Unter dem Mikroskop zeigte sich ein fluoreszierendes Bild der Organe mit einheitlichem grünen Farbton annähernd gleicher Intensität über das ganze Präparat hinweg. Vor diesem Hintergrund konnten Erythrozyten deutlich abgegrenzt werden, die eine weit intensivere Fluoreszenz darboten. CD34+ Zellen konnten hier nicht eindeutig identifiziert werden (Abb. 12-a, 12-b).

Die mikroanatomische Struktur der Lunge stellte sich unter FITC-Filter deutlich dar, lufthaltige Alveolen und kleine Bronchien waren gut erkennbar. Die Zellen des Lungenparenchyms konnten gegeneinander abgegrenzt werden. Ein relativ hoher Anteil an Erythrozyten führte stellenweise durch übermäßige Fluoreszenz zu Blendartefakten (Abb. 12-c).

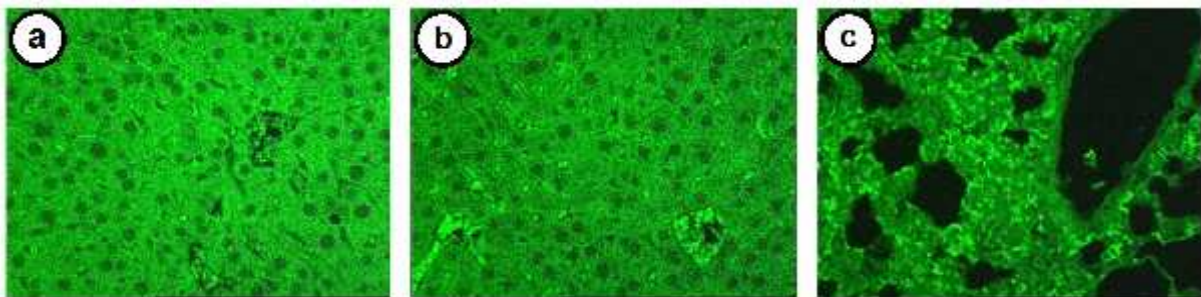


Abb. 12 Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) jeweils von Versuchstieren nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen. FITC-Filter-Anordnung. Vergrößerung ca. 250 fach
a: Leber
b: Milz
c: Lunge

In den Knochenpräparaten war unter der FITC-Filter-Anordnung die Anatomie von Femura und Tibiae mikroskopisch gut erkennbar. Corticalis, Markraum und Knorpel fluoreszierten verschieden stark mit grünlicher Farbe und stellten sich klar da. Die Zellen des Knochenmarks wie Fettzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Myelozyten konnten gut gegeneinander abgegrenzt werden.

Neben den erwähnten Zellen konnten Zellen nachgewiesen werden, die sich durch intensivere, randbetonte Fluoreszenz hervorhoben und morphologisch den Kriterien der injizierten humanen CD34+ Zellen entsprachen (Abb. 13).

Bei Untersuchung dieser Zellen mit dem DAPI-Filterset stellten sich die Zellkerne bläulich dar. Die Kriterien zu Kernform und Kern-Plasma-Relation bestätigten sich hierbei. Artefakte und Überlagerungen konnten mit dem direkten Kernnachweis ausgeschlossen werden (Abb. 14).

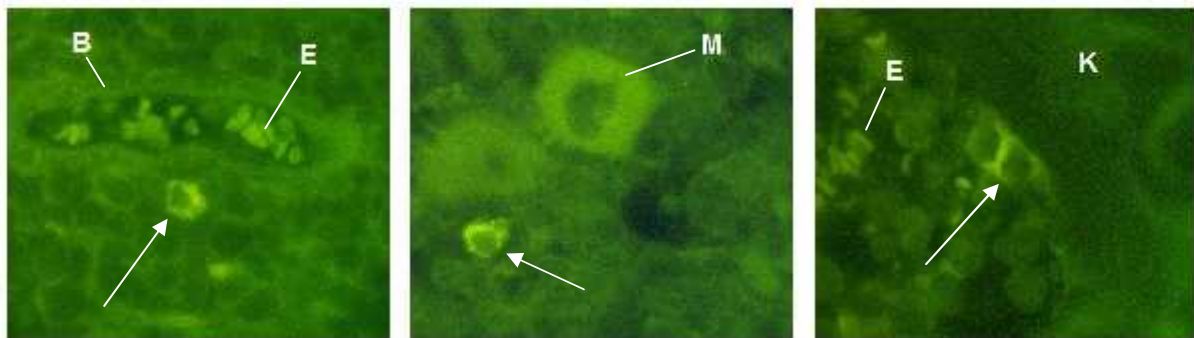


Abb. 13 Knochenmarksausschnitte von Versuchstieren unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen. Vergrößerung ca. 450 fach
 ■ CD34+ Zelle mit fluoreszierender FITC-AK Markierung;
 B: Blutgefäß, E: Erythrozyten, M: Megakaryozyt, K: Knochenbälkchen

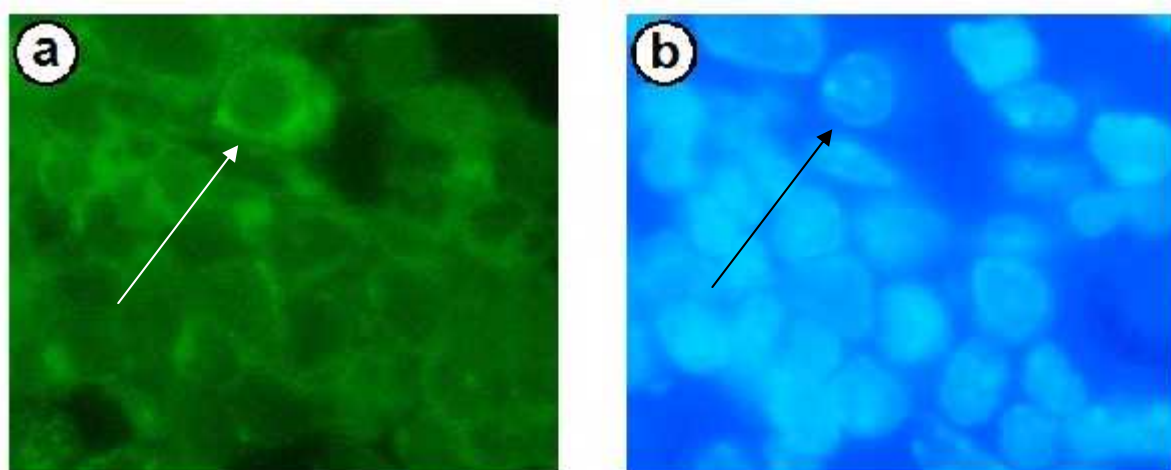


Abb. 14 Knochenmarksausschnitt eines Versuchstiers unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen. Vergrößerung ca. 650 fach
 a: Fluoreszenznachweis einer CD34+ Zelle (■) mit FITC-Filter-Set
 b: Darstellung der selben CD34+ Zelle () mit DAPI-Filter-Set

4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie Dokumentation (Zeiss Apotom Axiovert 200M)

In der Untersuchung an einem weiteren Fluoreszenzmikroskop mit der Möglichkeit Fusionsbilder zu erzeugen (s. Gliederungspunkt 3.6.2 Dokumentation), zeigten sich für die Präparate aus Milz, Leber, Lunge und Knochen ähnliche Ergebnisse wie zuvor. Daher wurden gezielt Knochenmarkregionen aufgesucht, in welchen die oben beschriebenen Zellen, die mögliche CD34+ Zellen darstellen, zu finden waren. Hier konnten ebenfalls diese Zellen nachgewiesen werden, die sich von der Umgebungsfluoreszenz unter dem FITC-Filter mit einem stark grün fluoreszierenden Randsaum deutlich abhoben. Dabei entsprach die Kernkonfiguration unter dem DAPI-Filter ebenfalls den Kriterien für die injizierten CD34+ Zellen. In einer kombinierten Darstellung beider Bilder (FITC und DAPI) am PC stellten sich die gefundenen Zellen sehr deutlich dar, die Fluoreszenz des umliegenden Gewebes konnte bei Überlagerung größtenteils unterdrückt werden (Abb.15).

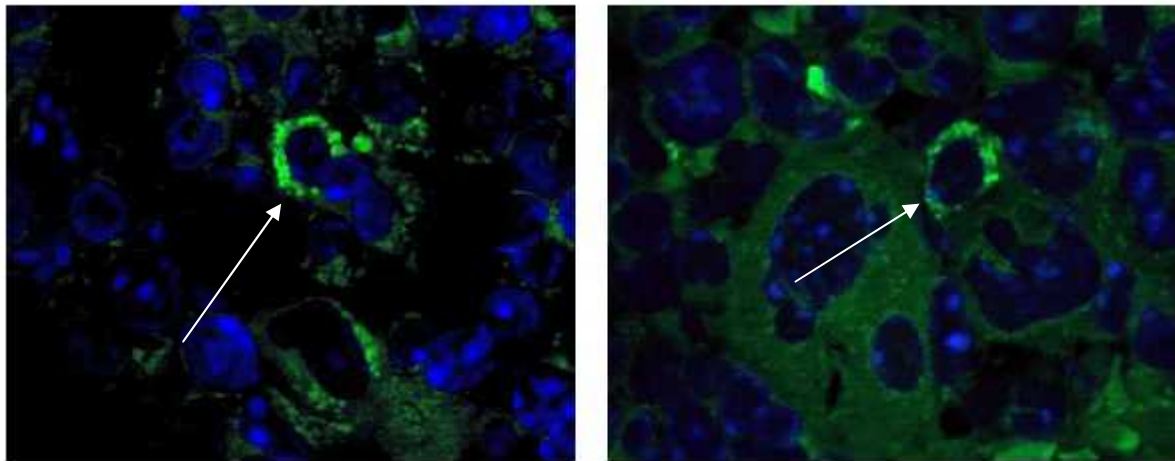


Abb. 15 Knochenmarksausschnitte von Versuchstieren unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Apotom Axiovert 200M) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten CD34+ Zellen. Fusionsbilder aus der Darstellung mit FITC-Filter und der Darstellung mit DAPI-Filter. Vergrößerung ca. 650 fach.

■ CD34+ Zelle mit grün fluoreszierender FITC-AK Markierung

4.3.4 Durchflusszytometrie / FACS-Analyse des Knochenmarks

Untersucht wurden zwei Tiere (n=2). Eine Maus mit 1×10^7 injizierten CD34+ Zellen (MI) und eine Maus als Kontrolle ohne Stammzell-Injektion (MII). Das zu untersuchende Material (Knochenmark der Femura der Versuchstiere) wurde nach vorne beschriebenem Protokoll (s. Gliederungspunkt 3.6.3) gewonnen und mit CD45PE, CD71PE, CD34FITC und PI problemlos inkubiert. Zusätzlich lief eine Isotypen-Kontrolle mit IgG-FITC, IgG-PE und PI, um gegebenenfalls unspezifische Reaktionen von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen aufzudecken und später herauszurechnen.

Für MI wurde eine Gesamtzellzahl der Knochenmarkprobe von 6825324 Zellen im FACS festgestellt. Eine Region im oberen PI-Bereich repräsentierte Zellen, die über die geschädigte Zellmembran PI aufgenommen hatten und somit apoptotisch waren. Über das zuvor beschriebene Gating wurden diese Zellen für die weiteren Berechnungen nicht mehr berücksichtigt und in einem weiteren Gatingsschritt auch kleiner Zellbestandteile / Detritus herausgefiltert. Die Zahl der lebenden Zellen wurde darauf mit 3950617 angegeben. Nach erneutem Gating und Kompensation zeichnete sich eine Zellpopulation ab, die positiv für CD45, CD71 sowie CD34 war und einen Anteil von 0,081%, entsprechend 3200 Zellen, an der Gesamtzahl der lebenden Zellen einnahm. Eine weitere Zellpopulation war für CD45 und CD71 positiv, für CD34 negativ. Diese bestand aus 237 Zellen, was einen Anteil von 0,006% aller nachgewiesenen lebenden Zellen ausmachte (Abb. 16). Somit waren 93,1% der CD45 und CD71 positiven Zellen auch CD34 positiv, 6,9% davon waren CD34 negativ.

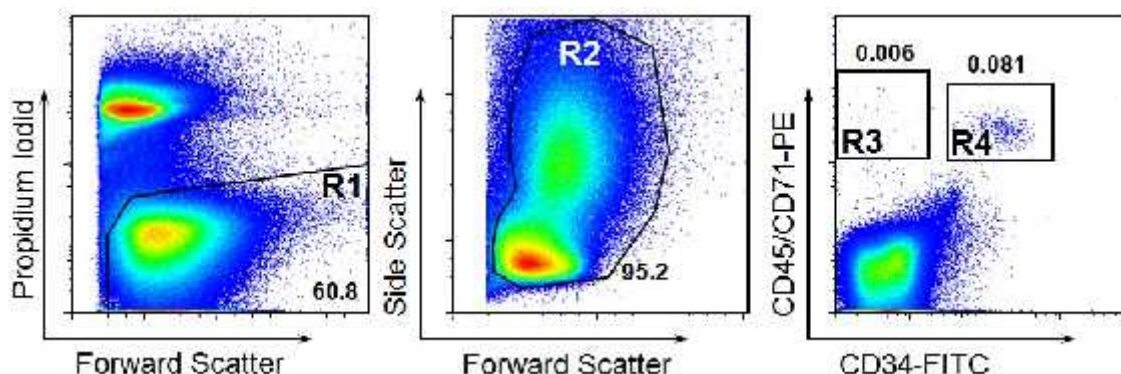


Abb. 16 Durchflusszytometrie des Knochenmarks eines Versuchstiers (MI) nach Injektion von von 1×10^7 Resovist® markierten humanen CD34+ Zellen.

R1: lebende Zellen

R2: Zellen ohne Detritus

R3: humane CD34 negative Zellen

R4: humane CD34+ Zellen

Für MII konnte bei gleichem Vorgehen eine vergleichbare Anzahl und Verteilung lebender Zellen dargestellt werden. Eine CD45+ CD71+ CD34+ Population war nicht nachweisbar (Abb. 17-b).

Bei der durchgeführten Isotypen-Kontrolle war im Bereich der CD45+ CD71+ CD34+ Population kein positives Signal zu sehen (Abb. 17-a).

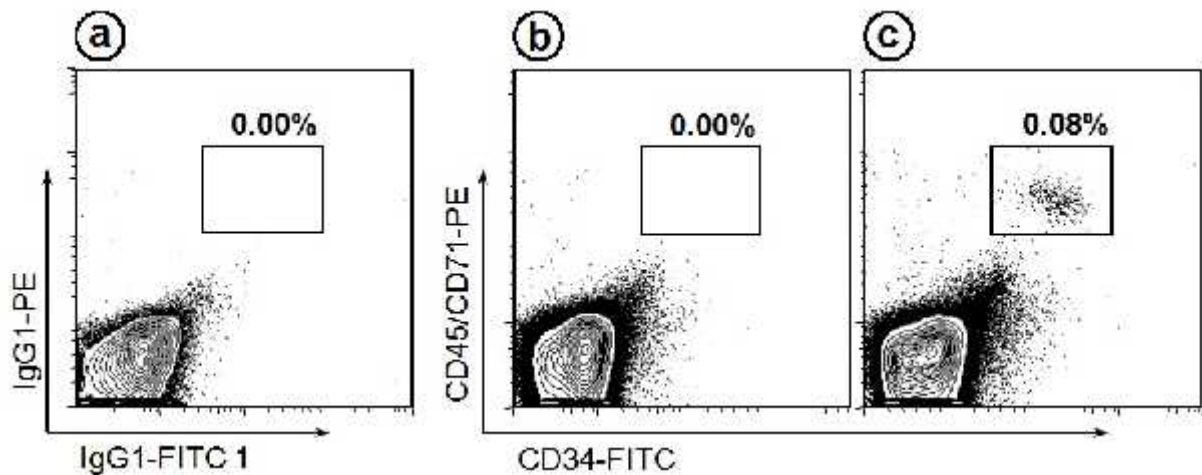


Abb. 17 Vergleich der Durchflusszytometrieergebnisse. Gekennzeichnet ist jeweils der Bereich, in dem humane CD34+ Zellen zu erwarten sind.

a: Isotypenkontrolle

b: Knochenmark eines Versuchstiers (MII) ohne Stammzellinjektion

c: Knochenmark eines Versuchstiers (MI) nach Injektion von 1×10^7 Resovist® markierten humanen CD34+ Zellen

4.3.5 Lichtmikroskopie der mittels FACS separierten CD34+ Zellen

Die mittels FACS separierten CD34+ Zellen wurden nach einer klassischen Eisenfärbung mit Berliner Blau Reaktion lichtmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich ein Zellausstrich mit gut angefärbten runden Zellkernen und positiver Eisenreaktion. In einigen Zellen konnte kein Eisen intranukleär dargestellt werden. Aufgrund der geringen Zellzahl im Ausstrich wurde jedoch keine Zählung und Gegenüberstellung von eisenpositiven und eisennegativen Zellen vorgenommen. Des Weiteren waren über das gesamte Präparat hin extrazelluläre Eisenpartikel nachweisbar (Abb. 18).

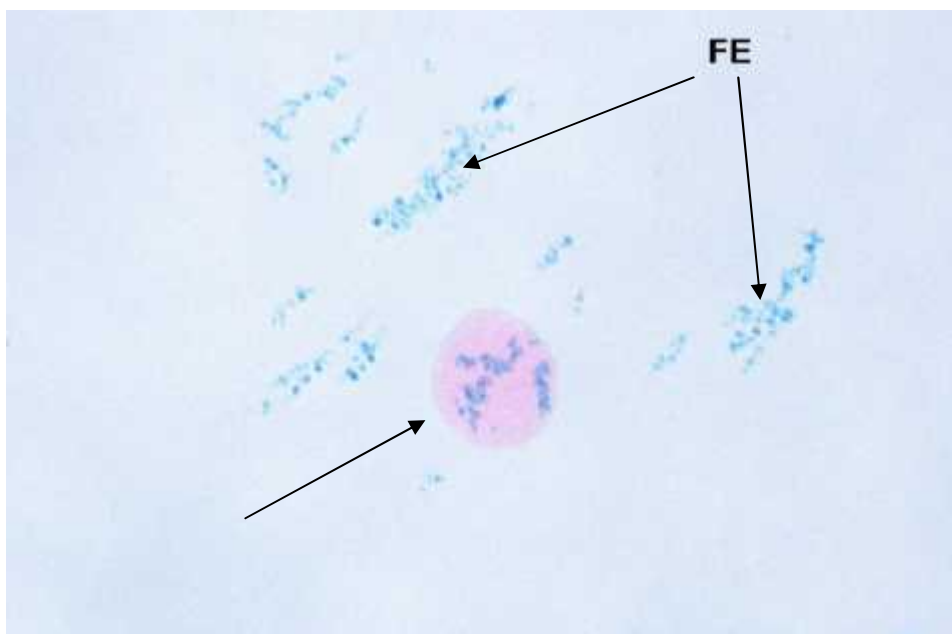


Abb. 18 Zellausstrich unter dem Lichtmikroskop nach FACS. Färbung: Berliner Blau. Vergrößerung ca. 650 fach.
humane CD34+ Zelle mit intrazellulärem Eisen

FE: freies Eisen (durch Färbvorgänge oder teilweise durch Zelluntergang bei Waschvorgängen)

4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die Lichtmikroskopie zeigte an den Präparaten, die im Anschluss an die MRT-Untersuchungen der Mäuse mit Berliner Blau Reaktion gefärbt worden waren, in keinem der untersuchten Organe freies (extrazelluläres) Eisen. Zellen mit intrazellulär positiver Eisenreaktion waren im Knochenmark nur vereinzelt nachweisbar, in Lunge, Leber und Milz etwas häufiger. Im Fluoreszenzmikroskop konnten in beiden

Versuchsanordnungen (Fluoreszenzmikroskopie Screening und Dokumentation) die injizierten menschlichen CD34+ Zellen anhand der Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und DAPI und aufgrund ihrer Morphologie im Empfänger Knochenmark identifiziert werden. Ein Nachweis dieser Zellen in Lunge, Leber oder Milz war nicht sicher möglich.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ließen sich im Empfänger Knochenmark lebende, menschliche CD34+ Zellen nachweisen, quantitativ bestimmen und separieren. Nebenbefundlich wurde auch ein geringer Prozentsatz menschlicher Zellen gefunden, die nicht CD34+ waren. Im Kontrollversuch, bei dem keine menschlichen CD34+ Zellen injiziert worden waren oder in der Isotypen-Kontrolle wobei IgG-FITC, IgG-PE und PI verwendet wurde, waren keine menschlichen CD34+ Zellen nachweisbar. Die dafür repräsentative Region in der grafischen Darstellung (CD45+ CD71+ CD34+) zeigte keine Messpunkte. In der anschließenden Lichtmikroskopie der detektierten CD34+ Zellen konnte teilweise intrazelluläres Eisen dargestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Isolierung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Ausbeute an Stammzellen bei Abnahme aus einer Nabelschnur relativ gering, so dass Transplantationen von Stammzellen aus Nabelschnurblut bisher aufgrund der relativ geringen Gesamtzellzahl vor allem an Kindern durchgeführt wurden [12]. Bei der ohnehin kleinen Anzahl mononukleärer Zellen macht die Fraktion der CD34+ Zellen durchschnittlich nur einen Anteil von 0,1-0,5% aus [10]. Im Versuch wurden CD34+ Zahlen von 1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7 Zellen pro Injektion verwendet, mehr als aus dem Nabelschnurblut eines Spenders gewonnen werden konnte. Für die Herstellung einer Injektionsprobe war daher teilweise Material von 20-70 verschiedenen Spendern nötig. Deshalb konnten pro Versuchstier nicht jeweils nur Zellen eines einzigen Spenders transplantiert werden, zumal auch bereits schon im Vorfeld bei der Lagerung die Zellen von bis zu fünf Spendern in einem Behältnis zusammen gemischt und kryokonserviert worden waren. Grundsätzlich steigt mit zunehmender Spenderzahl auch das Risiko für unerwünschte und nicht abschätzbare Reaktionen, wie beispielsweise Unverträglichkeiten im Empfänger oder Interaktionen des unterschiedlichen Spendermaterials selbst. Es wurden jedoch bereits erfolgreich in vitro Versuche zur Zellmarkierung mit MRT-Kontrastmitteln sowie in vivo Transplantationsversuche mit SPIO markierten Zellen durchgeführt, wobei hier ebenfalls hämatopoetische Stammzellen mehrerer Spender verwendet worden waren [9, 10]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der nur CD34+ Zellen, also nur ein geringer Anteil der HSC, verwendet wurden, verwendete man bei o.g. Versuchen das gesamte Spektrum der HSC. Es ist daher davon auszugehen, dass die Variabilität des genetischen Materials bei diesen Ansätzen deutlich höher war und ebenso das Risiko für Interaktionen. Es wird über keine Unverträglichkeitsreaktionen berichtet; auch Störungen anderer Art werden nicht beschrieben. Aus diesem Grund waren Probleme, die durch Mischung von CD34+ Zellen mehrerer Spender auftreten könnten, im aktuellen Versuch nicht zu erwarten. Zur Isolierung der CD34+ Zellen aus dem Pool der MNZ der Nabelschnurblutproben setzten wir die sog. MACS®-

Technologie ein, wobei die Zellen mit magnetischen Antikörpern gegen CD34 markiert werden und durch magnetische Säulen aus dem Zellgemisch gezogen werden. Die Methode ist relativ einfach und ohne größeren apparativen Aufwand durchzuführen, womit sie flexibel im Labor eingesetzt werden kann. Bei anderen Isolierungsverfahren wie z.B. der Durchflusszytometrie ist man zum einen zeitlich und örtlich an die Verfügbarkeit des Gerätes gebunden, zum anderen erfolgt hier die Selektion über die Markierung mit Fluoreszenzantikörpern. Ein späterer histologischer Nachweis der menschlichen CD34+ Zellen in der Maus sollte ebenfalls über Fluoreszenz erfolgen. Um hier mögliche Interferenzen vorab auszuschließen, wurde die Durchflusszytometrie mit FACS nicht zur Isolierung verwendet.

Kontrastmittelmarkierung

Für die Markierung der selektierten CD34+ Zellen wurden mit Endorem® und Resovist® für den klinischen Gebrauch zugelassene MRT-Kontrastmittel verwendet. Experimentell geschah dies bereits erfolgreich mit Endorem® bei der Markierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut [9, 10] und mit Resovist® u.a. bei der Markierung mesenchymaler Stammzellen [52]. Die Aufnahme von Kontrastmittel in die Zellen war dabei unterschiedlich hoch, je nach Kontrastmittel und Markierungsmethode. Mit Hilfe von Transferrin [27] oder durch Bildung von Liposomenkomplexen [9, 10, 51, 52] konnten die Zellen mehr aufnehmen als durch einfache Endozytose. Mit Liposomen konnten dabei die besten Ergebnisse erzielt werden. Für CD34+ Zellen, die einen Teil der o.g. Zellen darstellen, waren zwar ähnliche Ergebnisse zu erwarten, aufgrund der geringen Datenlage zu reinen CD34+ Populationen mussten wir aber zunächst die Markierungsmethode für den beschriebenen Versuch optimieren. Zum einen verglichen wir die Aufnahme der Kontrastmittel in die Zellen, ohne und mit Zusatz von Lipofectamin®, zum anderen wurde auch die Vitalität und das Langzeitüberleben der CD34+ Zellen überprüft.

Versuchstiere

Für den in vivo Versuch wurden Nacktmäuse (Balb c) verwendet. Diese eignen sich aufgrund fehlender Thymusanlage und somit fehlender T-Zellreifung gut für Transplantationsversuche, auch Xenotransplantation. Vorversuche mit humanen Stammzellen aus Nabelschnurblut wurden bereits ohne Unverträglichkeitsreaktion an diesen Mäusen durchgeführt [10]. Die Haltung und Narkose der Mäuse lief nach

Standards des Tierstalls des Klinikums rechts der Isar der TU-München ab und war stets komplikationslos. Wegen der geringen Größe der Tiere konnten jeweils drei Tiere gleichzeitig im MRT untersucht werden und damit Zeit und Kosten gespart werden. Lediglich die Injektion der Proben in die Schwanzvene der Tiere stellte eine gewisse technische Herausforderung dar.

MRT

Ziel des Versuchs war es, die injizierten CD34+ Stammzellen mit einem in der Klinik verfügbaren 1,5T Kernspintomographen in vivo darzustellen. Reine CD34+ Zellen wurden bisher nur in vitro nachgewiesen [35] oder es wurden für den klinischen Alltag nicht gebräuchliche MRT-Scanner mit hohen Feldstärken benutzt [33]. Bei Versuchen mit verfügbaren 1,5T Geräten wurden bisher nicht speziell CD34+ Zellen untersucht, sondern man verwendete Proben von Stammzellen unterschiedlicher Differenzierungs- oder Reifegrade [9, 10]. Die Zellzahl war zum einen wegen der Frage nach der Sensitivität der Untersuchung, zum anderen aus wirtschaftlichen Gründen ein wichtiger Faktor beim Nachweis der Zellen nach der Injektion. Die Nachweisgrenze sollte daher im vorliegenden Versuch ermittelt werden und dabei möglichst gering gehalten werden.

Mikroskopie

Signaländerungen im MRT nach Injektion der Resovist®-markierten Proben sind auf eine Anreicherung des Kontrastmittels bzw. der Eisenpartikel der Kontrastmittels zurückzuführen. Zur Bestätigung und genaueren Interpretation der MRT-Befunde wurden im Anschluss an die Bildgebung nach Tötung der Tiere Untersuchungen am histologischen Präparat unternommen. Nach Sektion der Mäuse wurden histologische Schnitte mit Berliner Blau Reaktion zur Eisenanfärbung angefertigt. Größere Ansammlungen von freiem Eisen, das möglicherweise von CD34+ Zellen abgegeben wurde oder beim Untergang dieser Zellen ausgetreten war, sollten hier ausgeschlossen werden, ebenso intrazelluläre Eisenansammlungen, da einige Zellen in der Lage sind freies Eisen zu phagozytieren. Der Nachweis von transplantierten CD34+ Stammzellen wurde über Fluoreszenzmikroskopie angestrebt. Da ein Antikörper, der selektiv menschliche CD34+ Zellen anhand ihrer Antigene anfärbt, ohne im Versuchstier Maus Kreuzreaktionen auszulösen, nicht erhältlich war, wurden FITC-Antikörper gegen die Dextranhülle des Kontrastmittels eingesetzt. Dextrane

kommen natürlicherweise nicht im Mäuseorganismus vor, sind somit nur in den markierten/transplantierten CD34+ Zellen vorhanden und können ohne Kreuzreaktion mit passenden Antikörpern nachgewiesen werden [10]. Zur genaueren morphologischen Beurteilung wurde gleichzeitig eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Die Eigenfluoreszenz des Gewebes konnte durch den Einsatz beider Fluoreszenzfarbstoffe und Übereinanderprojizieren der Einzelbilder am PC unterdrückt werden. Zum Vergleich der Zellen wurden zuvor reine CD34+ Zellsuspensionen mit derselben Doppelfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Durchflusszytometrie / FACS

Zusätzlich zum Nachweis der CD34+ Zellen unter dem Mikroskop wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Diese verwendeten wir zum sicheren Nachweis und zur Quantifizierung von transplantierten Zellen in der Maus. Mit dieser Methode konnten bei ähnlichen Versuchen injizierte humane CD34+ Stammzellen im Knochenmark von Versuchstieren bestimmt werden [21, 68]. Eine Verfolgung der Zellen im MRT oder ein Nachweis unter dem Fluoreszenzmikroskop ging in diesen Fällen nicht voraus. Nach Isolierung der gesuchten Zellen mit FACS konnten diese erneut unter dem Mikroskop beurteilt werden und damit Rückschlüsse auf die Kontrastmittelmarkierung gezogen werden. Die Darstellung von Kontrastmittel in CD34+ Zellen ist unter dem Lichtmikroskop möglich [10], dabei wurden die Zellen jedoch nach der Markierung untersucht und unterliefen keinem Transplantationsprozess wie im vorliegenden Versuch.

5.2 Ergebnisdiskussion

Kontrastmittelmarkierung

In Vorversuchen erarbeiteten wir zunächst interdisziplinär mit dem Labor für Stammzellphysiologie der III. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar eine optimale Vorgehensweise zur Markierung der selektierten CD34+ Zellen. Wir konnten hierbei deutliche Unterschiede feststellen, was die Kontrastmittelaufnahme von frischen gegenüber aufgetauten CD34+ Zellen angeht. Hier waren frische Stammzellen mit 85% und 83% Kontrastmittelaufnahme deutlich aktiver im Gegensatz zu aufgetauten Zellen mit 49% und 61%. Bei markierten kryokonservierten Zellen kam es zu keinem größeren Zellverlust als bei nicht markierten Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass isolierte CD34+ Zellen nach Markierung mit Resovist® zusammen mit Lipofectamin® eine vergleichbare Vitalität besitzen. Langzeitversuche in vivo führten wir hierzu nicht durch, die jeweiligen Untersuchungen waren auf ca. 24 Stunden beschränkt, die Beobachtungen decken sich aber im Wesentlichen mit bereits publizierten Versuchen [9].

MRT

In den MRT-Untersuchungen mit einer Resovist® -Lösung konnte im Muskelgewebe und im Knochenmark der Femura eine vorübergehende Signalabsenkung in der 2h-Messung, jedoch nicht in der 24h-Messung registriert werden. Auch andere SPIO-Kontrastmittel gelangen nur zu einem geringen Prozentsatz in das Knochenmark [57]. Hierbei spielen zum einen Transportmechanismen eine Rolle, zum anderen aber vor allem die überwiegende Aufnahme von Kontrastmittel durch die Leber [63].

In unserem Versuch war ebenfalls bei zellfreier Resovist®- Lösung ein starker und anhaltender Signalverlust in der Leber zu verzeichnen.

Bei Versuchsreihen mit 1×10^6 Resovist® markierten CD34+ Stammzellen konnte in Muskel und Knochen kein Signalabfall nachgewiesen werden, in der Leber nur vorübergehend in der 2h-Messung, was eher mit einer Verteilung der Zellen durch den Blutstrom zu erklären ist als durch aktive Prozesse der Stammzellen.

Mit 5×10^6 CD34+ Resovist® markierten Zellen war die Signalveränderung in der Leber deutlich und auch nach 24 Stunden nachweisbar, was in etwa analog zu den Kontrolluntersuchungen mit reinem Kontrastmittel zu erklären ist. Im Muskel war

keine Signalabsenkung nachweisbar, im Knochenmark wurden leichte Veränderungen beobachtet.

Deutlicher zeigte sich der Unterschied nach Injektion von 1×10^7 Zellen. Hier waren die Ergebnisse im Muskelgewebe und in der Leber vergleichbar mit den Ergebnissen bei 5×10^6 Zellen. Im Knochenmark konnte ein dauerhafter signifikanter Signalabfall gemessen werden. Dies ist als Hinweis für eine aktive Einwanderung und Einnistung der markierten humanen CD34+ Stammzellen in das Empfänger Knochenmark zu werten, da Kontrastmittel ohne Zellen, wie oben beschrieben, nicht nach 24 Stunden im Knochenmark nachweisbar war. Ähnliche Ergebnisse konnten bisher nur mit anderen Kontrastmitteln und mit einem Vielfachen der von uns verwendeten Zellzahl erreicht werden [10].

Mikroskopie

In den mit Berliner Blau Reaktion angefärbten histologischen Schnitten konnte in keinem der untersuchten Organe freies Eisen nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch in den jeweiligen Geweben morphologisch und von der Lokalisation und Anzahl her typische Makrophagen [67], die Eisen aufgenommen hatten. Der Ursprung des nachweisbaren Eisens kann mit dieser Untersuchung nicht bestimmt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies Eisen aus untergegangenen Kontrastmittel markierten Zellen ist oder direkt aus freiem Kontrastmittel. Der fehlende Nachweis von freiem Eisen oder Kontrastmittel beladenen Zelltrümmern legt aber nahe, dass den dargestellten Eisengranula physiologische Vorgänge (v.a. Erythrozytenabbau) zugrunde liegen und dass kein übermäßiger Zelltod der injizierten CD34+ Zellen eingetreten war. Wäre ein Großteil des nachgewiesenen Eisens von markierten Zellen abgegeben worden, wären bei reiner Kontrastmittelinjektion bzw. unterschiedlichen injizierten Zellzahlen auch Abweichungen in der Eisenmenge im Präparat zu erwarten gewesen. Es zeigten sich keine deutlichen Unterschiede, was ebenfalls gegen eine Freisetzung aus den markierten Zellen spricht.

Der Nachweis in der Fluoreszenzmikroskopie stützte sich, wie oben beschrieben, auf die Markierung der Dextranhülle des Kontrastmittels in den CD34+ Zellen mit FITC sowie zusätzlich eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Menschliche CD34+ Zellen konnten bereits mit Fluoreszenzmikroskopie mit selektiven CD34-Antikörpern

im menschlichen Blut [46] nachgewiesen werden, mit CD31-Antikörpern + Antidextran-Antikörpern in der Maus [10]. In Vorversuchen konnten wir in vitro zeigen, dass es möglich ist CD34+ Zellen aus menschlichem Nabelschnurblut nach Markierung mit dem MRT-Kontrastmittel Resovist®, nach unserem Protokoll mit FITC-Antikörpern und DAPI zu markieren und unter dem Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. In den nach den MRT-Untersuchungen angefertigten histologischen Schnitten der Versuchstiere konnten wir die injizierten CD34+ Stammzellen im Präparat darstellen. In Milz, Leber und Lunge war auf Grund der Organbeschaffenheit der Nachweis nicht sicher durchzuführen, im Knochenmark der Femura konnten wir die gesuchten Zellen über den leuchtend grünen Randsaum (entspricht der mit FITC-AK markierten Dextranhülle) deutlich von der Umgebung abgrenzen. Zusätzliche Sicherheit konnte durch die zweite Färbung der Zellkerne mit DAPI und dem morphologischen Vergleich der markierten, reinen Zellsuspensionen aus den Vorversuchen gewonnen werden. Wir konnten damit zeigen, dass die injizierten CD34+ Zellen in das Knochenmark eingewandert waren, da sie im Verbund mit den dort ansässigen Zellen nachgewiesen werden konnten und nicht in den teilweise angeschnittenen Blutbahnen. Das Überleben der Zellen als wesentliche Voraussetzung der Homings konnte über die FACS-Analyse bewiesen werden (s.u.). Für genauere Aussagen zu „microenvironment“ oder Stammzellnischen ist die Fluoreszenzmikroskopie mit diesem Versuchsaufbau nicht in der Lage, hierzu müssten auch die übrigen Zellen oder Organstrukturen selektiver und deutlicher dargestellt werden, beispielsweise über immunhistochemische Färbungen.

Die angestrebte Quantifizierung der übertragenen Zellen im Knochenmark ist mit der Fluoreszenzmikroskopie nur näherungsweise möglich. Eigenen Berechnungen nach lag bei der von uns verwendeten Schnittdicke weniger als ein Prozent des Knochenmarkraumes im Präparat vor. Auch unter optimalen Bedingungen können somit kleine Schwankungen eine große Ergebnisdifferenz hervorrufen. Für eine genaue Zellzählung ist die Mikroskopie daher in diesem Falle nicht sinnvoll.

Durchflusszytometrie / FACS

Wir konnten über eine FACS-Analyse im Anschluss an unsere Untersuchungen zeigen, dass 24 Stunden nach Injektion lebende menschliche CD34+ hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark der Versuchstiere nachweisbar waren und hier somit Homing stattgefunden hat. Mit dem Marker PI, der die

Zellmembran toter Zellen durchdringt und diese selektiv färbt, konnten lebende Zellen von abgestorbenen unterschieden werden. Aus diesen konnten wir wiederum selektiv über die Kombination aus CD45PE und CD71PE menschliche hämatopoietische Stammzellen von Zellen der Maus trennen. Wir versuchten zunächst in einem ersten Schritt das Homing nachzuweisen um die MRT-Befunde zu validieren, was mit FACS gelungen ist. Der hohe Anteil von 93,1% CD34+ Zellen an den nachgewiesenen menschlichen Zellen lässt außerdem Rückschlüsse auf eine relativ reine CD34+ Injektionsprobe zu und kann auch als Qualitätsmerkmal des Versuches gewertet werden. Wir führten die FACS-Analyse als Bestätigungstest durch, daher sind wegen der geringen Fallzahl statistisch signifikante Aussagen zur Zellzahl nicht möglich. Für kommende Versuche mit dem Hauptziel einer Korrelation zwischen MRT-Befund und tatsächlicher Zellzahl im Versuchstier ist der Nachweis mit FACS sicher eine praktikable und sinnvolle Methode.

Nach Isolierung der menschlichen CD34+ Zellen aus dem Knochenmark der Maus mittels FACS wurden diese mit Berlin Blau Reaktion gefärbt. Exemplarisch sollten Eisenpartikel des MRT-Kontrastmittels in diesen Zellen nachgewiesen werden. Teilweise konnte der Nachweis erbracht werden; einschränkend ist zu sagen, dass in dem Präparat auch extrazelluläres Eisen nachweisbar war. Diese Artefakte können zum einen von der Art der Färbung selbst stammen, zum anderen von markierten CD34+ Zellen, die mittlerweile nach mehreren Sorting- und Waschvorgängen zugrunde gegangen waren .

5.3 Fragestellungsdiskussion

Voraussetzung für die Versuche war die Isolation großer Mengen CD34+ hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut, die Herstellung möglichst reiner CD34+ Zellsuspensionen und deren effektive Markierung mit Eisenoxidkontrastmittel.

Zuvor wurden meist, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten, Proben unterschiedlicher Zelltypen verwendet [9, 10], oder es mussten bei geringeren Zellzahlen andere Nachweismethoden eingesetzt werden, wie z.B. starke MRT-Geräte mit 14T Feldstärke [33]. Damit konnten jedoch keine sicheren Aussagen zu einzelnen Zellgruppen getroffen werden. Speziell Aussagen zu CD34+ Zellen, die nur einen sehr geringen Anteil der HSC ausmachen, war nicht sicher möglich. MRT-Geräte mit sehr hohen Feldstärken sind zudem nicht im klinischen Alltag im Einsatz, sodass dies, auch in Hinblick auf eine mögliche diagnostische Verwendung, unpraktikabel war. Durch die gut organisierte Abnahme und Konservierung von Nabelschnurblut über das STEMMAT-Projekt [20] konnten wir die benötigten Mengen CD34+ Zellen isolieren und die Markierungsprotokolle für die MRT-Diagnostik optimieren. Der zunächst limitierende Faktor der Zellzahl war somit beseitigt.

Über MRT-Messungen vor Injektion der Zellen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion konnten wir, wie zuvor beschrieben, über Signalveränderungen die Wanderung der Stammzellen nachvollziehen. Signifikante Veränderungen im Knochenmark konnten wir im MRT nach Injektion von 1×10^7 CD34+ Stammzellen nachweisen. In gut durchbluteten Organen wie Lunge, Milz und Leber konnten auch bei geringeren Zellzahlen teilweise frühe Signalabfälle nachgewiesen werden, diese waren jedoch in den folgenden Messungen wieder rückläufig. Homing-Vorgänge, also aktive Einwanderung in andere Organe, wurden bereits beschrieben [24, 45] das entsprechende Organ war dabei jedoch unter Stress geraten oder es wurden künstlich Botenstoffe / Cytokine zugesetzt. Im vorliegenden Versuch ist dies nicht der Fall. Es ist daher anzunehmen, dass die Veränderungen durch Zellen verursacht wurden, die nach der i.v. Injektion über den Blutstrom in diese Gewebe gelangt waren. Die nach zwei Stunden und 24 Stunden nachweisbaren Signalveränderungen im Knochenmark sind daher nicht durch passagere Zellen in den Blutgefäßen verursacht, sondern durch Zellen, die sich hier aktiv niedergelassen haben. Während

mit einem 1,5T Kernspintomographen untere Nachweisgrenzen von 1×10^5 transplantierten HSC beschrieben sind [9], konnten reine CD34+ Zellen auch bei einer Zahl von 4×10^5 nicht im MRT dargestellt werden [35]. Die untere Nachweisgrenze im vorliegenden Versuch lag bei 1×10^7 reinen CD34+ Zellen, wobei auch bei geringeren Zahlen wie 5×10^6 und weniger bereits Veränderungen im MRT sichtbar waren. Dies lässt vermuten, dass bei weiterer Optimierung der Untersuchungen die untere Nachweisgrenze in Zukunft noch weiter gesenkt werden kann.

Neben Voruntersuchungen am Lichtmikroskop wurde für die mikroskopische Darstellung der CD34+ Zellen die Fluoreszenzmikroskopie gewählt, da hier über verschiedene Antikörper und entsprechende Filtereinstellungen zum einen einzelne Strukturen hervorgehoben werden können, zum anderen diese auch zu einem kontrastreichen Bild zusammengesetzt werden können. Humane Stammzellen konnten über AntiCD31-Antikörper bereits nach Injektion wieder in Mäusen aufgefunden werden [10]. CD34+ Zellen wurden in Knochenanschnitten über Fluoreszenz-Bildgebung nachgewiesen [35], konnten dabei jedoch nicht einzeln unter dem Mikroskop dargestellt werden. Wir konnten die transplantierten CD34+ humanen Stammzellen in Präparaten des Knochenmarks fluoreszenzmikroskopisch zeigen. Die MRT-Ergebnisse konnten damit bestätigt werden. Eine Quantifizierung der Zellen wurde versucht, hierzu können aber aus o.g. Gründen keine signifikanten Aussagen gemacht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit FACS eine sehr genaue Zellzählung möglich ist. Für eine Korrelation der Signalintensität im MRT mit der tatsächlichen Zellzahl müsste daher eine geeignete FACS-Studie entworfen werden. Da Stammzellen sich in speziellen Nischen einnisten [33], können Untersuchungen hierzu auch in Zukunft von Bedeutung sein. Wir beschränkten uns zunächst auf den Nachweis der übertragenen Zellen. Für genauere Fragestellungen zur Mikroanatomie kann die Fluoreszenzmikroskopie mit geeigneten Antikörpermarkierungen in späteren Versuchen sicher zur Klärung beitragen.

5.4 Kritische Diskussion

Im Folgenden sollen einige Schlüsselpunkte im Versuchsablauf noch einmal kritisch bewertet werden. Es geht darum, Probleme in der Versuchsphase sowie auch bei der Ergebnisinterpretation aufzuzeigen, diese im Vergleich zu ähnlichen Versuchen in der Literatur einzuordnen und Ursachen, aber auch Lösungsvorschläge anzubieten. Dies soll kommenden Untersuchungen ermöglichen, die Ergebnisse dieser Arbeit - seien sie positiv oder negativ - als Grundlage zu nehmen und helfen weiter darauf aufzubauen.

Von der Nabelschnurblutentnahme bis zur Kryokonservierung wurden Standards angewendet, die durch das STEMMAT-Projekt [20] eigens für eine optimale Logistik und Lagerung aufgestellt wurden. Die hier angewandten Verfahren wurden daher nicht in Frage gestellt, zumal bereits auch andere Gruppen erfolgreiche Versuche mit Zellen aus diesem Projekt veröffentlicht hatten [9, 10, 44, 51].

Daher sahen wir es als erste Voraussetzung unserer Arbeit, Untersuchungen zu Vitalität und Funktionalität dieser Zellen in Verbindung mit den Kontrastmitteln für MRT Endorem® und Resovist® anzustellen, um mit möglichst optimalen Ausgangsbedingungen arbeiten zu können. Wie unter 5.2 erläutert, decken sich unsere Ergebnisse hierzu mit bereits veröffentlichten Daten [9]. Da die CD34+ Zellen nachweislich 24 Stunden nach Markierung mit Resovist® ebenso vital und proliferationsfähig waren wie ohne Markierung, musste das von uns gewählte Markierungsregime nicht verändert werden. Hiermit scheint die Markierung mit dem SPIO Resovist® ähnlich gut verträglich zu sein, wie dies bereits für Gd-DTPA [9, 51] und das SPIO-Kontrastmittel Endorem® [9, 44] gezeigt werden konnte. Rudelius et al. konnten bei der Markierung eine Effizienz von bis zu 83% erreichen [51]. Frische CD34+ Zellen konnten wir zu 85% mit Resovist® markieren. Für den vorliegenden Versuch mussten wir wegen der großen Zellmengen jedoch auf kryokonservierte Zellen zurückgreifen. Diese konnten zu 49% erfolgreich markiert werden, was für eine Signaländerung im MRT jedoch ausreichend war, wie unter 4.2.1 beschrieben wurde. Auch ist fraglich, ob eine höhere Effizienz an aufgetauten Zellen im Moment zu erreichen ist, nachdem bereits eine optimierte Vorgehensweise angewendet wurde, wie der o.g. Vergleich mit anderen Gruppen zeigt.

Bei der Wahl des Versuchstiers entschieden wir uns für Balb/c Nacktmäuse, da in vorangegangenen Projekten hiermit gute Ergebnisse beschrieben wurden [10, 44]. Vorteil der relativ kleinen Tiere ist, dass mehrere Tiere in einem Käfig gehalten werden können und dass mehrere Mäuse gleichzeitig im MRT untersucht werden können. Allerdings stellt bei der geringen Größe der Tiere die Injektion in eine der Schwanzvenen eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit dar. Auch bei ausreichender Erfahrung mit komplizierten Injektionen und optimal dilatierten Venen (unter Zuhilfenahme von Rotlicht oder warmem Wasser) ist eine sichere und vollständige Injektion der vorbereiteten Zellsuspensionen nicht immer gänzlich gewährleistet. Wir schlossen zwar nur die subjektiv erfolgreichen Injektionen in unsere Auswertung ein, trotzdem sind Schwankungen der tatsächlich verabreichten Zellzahl anzunehmen. Dieses Problem wird in den hierzu gelesenen Arbeiten mit ähnlichem Versuchsaufbau nicht thematisiert. PD Dr. Robert A. J. Oostendorp (Gruppenleiter mit Schwerpunkt Stammzellphysiologie der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar), der ebenfalls Erfahrung mit Nacktmäusen als Versuchstiere hat, bestätigt in einem persönlichen Gespräch, dass dies allgemein ein methodisches Problem sei. Möglicherweise sind die Schwierigkeiten bei der Injektion auch mit ursächlich für die relativ hohe Ausfallquote von ca. 25% (10 von 39 Mäusen starben). Denkbar wären thrombembolische Geschehnisse im Rahmen von Fehlinjektionen oder auch massive Kreislaufbelastung bei zu rascher erfolgreicher Injektion bis hin zum akuten Rechtsherzversagen. Zukünftig sollte man in Erwägung ziehen, für ähnliche Versuchsanordnungen größere Versuchstiere zu verwenden (z.B. größere Mäuse, Ratten etc.), um die Injektion der Testvolumina zuverlässiger zu gestalten. Allerdings ist dann auch davon auszugehen, dass größere Zellzahlen verabreicht werden müssen, um eine Signaländerung im MRT zu erreichen.

Wir konnten bei Gabe von 1×10^7 CD34+ Zellen signifikante Änderungen des MRT-Signals erreichen. Untere Nachweisgrenzen von $2,5 \times 10^6$ Zellen (markiert mit Eisenoxidkontrastmittel über Liposomen) konnten nur in vitro erreicht werden [9]. Die bisher beschriebene Nachweisgrenze in vivo im Mausmodell wurde zuletzt bei etwa 3×10^7 Zellen angesetzt [10, 44]. Im Vergleich dazu konnten wir somit eine deutliche Verbesserung und eine Absenkung der unteren Nachweisgrenze im Transplantationsversuch erzielen.

Das Auffinden der menschlichen CD34+ Zellen im Präparat mit der von uns gewählten Methodik stellte sich als schwierig heraus. Die Zellen sollten über fluoreszierende FITC-Antikörper gegen Dextran unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Idealerweise sollten so die markierten Zellen mit einem grün fluoreszierenden Saum "heraus leuchten". Allerdings waren auf Grund der ausgeprägten Eigenfluoreszenz des gesamten Präparats die Farbunterschiede und Kontraste nicht so deutlich wie gewünscht. Somit war, auch mit Erfahrung und Übung, der Nachweis der gesuchten CD34+ Zellen an den histologischen Schnitten schwierig. Dieses Problem wird in der gesichteten Literatur zur Zellverfolgung mit MRT und anschließender Fluoreszenzmikroskopie nicht explizit angesprochen.

Vergleicht man beispielsweise die veröffentlichten Bilder von Daldrup-Link et al. [10], fällt auch hier deutlich die Eigenfluoreszenz sämtlicher Zellen auf. Hier ist man an das Problem heran gegangen, indem man einen zweiten Fluoreszenzantikörper verwendete, der ebenfalls selektiv die gesuchten Zellen markierte. Das optische Auffinden der einzelnen Zellen im Präparat wurde dadurch nicht erleichtert. Allerdings konnten die Zellen, nachdem sie identifiziert waren, über diese doppelte Markierung eindeutig nachgewiesen werden. Diese wurde erreicht, indem beide Filtereinstellungen am PC zu einem Bild fusioniert wurden. Die Eigenfluoreszenz konnte so durch die Anpassung von Farb- und Kontrasteinstellungen reduziert werden und die gesuchten Zellen deutlicher hervorgehoben werden.

Wir setzten ebenfalls zwei Fluoreszenzmarker ein. Da der eine Marker (FITC) die Dextranhülle der Eisenpartikel aus dem MRT-Kontrastmittel besetzte, der andere Marker (DAPI) die DNA im Zellkern, wurden bei uns - im Gegensatz zu dem Versuch von Daldrup-Link et al. [10] - unterschiedliche Bereiche der Zellen markiert (Zellplasma und Zellkern). Auch wir konnten damit die erwähnten Fusionsbilder am PC erzeugen. Jedoch war der Nachweis in unseren Präparaten weniger sicher, da nur der FITC-Antikörper selektiv die gesuchten Zellen darstellte, DAPI dagegen unspezifisch alle Zellkerne färbte. Ein besseres Ergebnis könnte z.B. mit einer Dreifachmarkierung aus zwei selektiven Antikörpern und einer Zellkernmarkierung mit DAPI erreicht werden. Das Ergebnis wäre eine ringförmige Plasmafärbung, die sich deutlich vom grundfluoreszierenden Hintergrund abhebt mit einer zusätzlichen

Gegenfärbung der Kerne. Dies würde die Zellen komplett darstellen (Plasma und Kern) und sie prägnant hervorheben.

Eine weitere Möglichkeit die Eigenfluoreszenz zu umgehen wäre der Zellenachweis am HE-Präparat mit immunhistochemischen Färbemethoden. Hier wäre ein Antikörper gegen humanes CD34 das passende Werkzeug. Trotz umfassender Recherche konnten wir jedoch keinen CD34-Antikörper finden, der menschliche Zellen nachweisen kann und im Mausmodell keine Gefahr von Kreuzreaktionen beinhaltet. Es liegen immunhistochemische Nachweise von menschlichen Stammzellen in der Maus vor [44], allerdings waren dies keine reinen CD34+ Populationen. Außerdem war hierbei die Beweiskette nicht lückenlos, da in einem Schritt dextranhaltige Zellen gezeigt wurden, in einem anderen Schritt CD31+ Zellen, also hämatopoetische Stammzellen. Ein Beweis, dass diese Zellen humane Zellen sind, wird damit nicht hundertprozentig erbracht. Eine Kombination der beiden Nachweise wurde nicht versucht. Die hier dargestellten Nachweismethoden machen somit zwar eine Darstellung der humanen, SPIO-markierten Stammzellen sehr wahrscheinlich, können aber nicht mit letzter Sicherheit die transplantierten Zellen im Knochenmark zeigen.

Unser Ziel war es, über den reinen Zellenachweis hinaus die Zellen im Knochenmark des Empfängers auch zu zählen, um eine Korrelation zwischen Zellzahl und MRT-Signal herzustellen. Soweit uns bekannt ist, wurden Versuche hierzu noch nicht veröffentlicht. Da wir uns für den Nachweis der Zellen auf histologische Methoden stützten, versuchten wir zunächst, darüber auch eine Zellzählung durchzuführen. Die bereits angesprochenen Einschränkungen machten jedoch eine Zählung am Präparat äußerst unsicher. Hinzu kommt, dass im Präparat nur ein kleiner Ausschnitt der gesamten Knochenmarks dargestellt wird. Nach eigenen Berechnungen bewegt sich die Zellzahl, die in unseren Präparaten zu sehen ist, im Bereich von 1% der Gesamtzellzahl. Das zeigt, dass die Mikroskopie keine geeignete Methode für eine genaue Zellzählung ist.

Da über die Mikroskopie die Einwanderung der menschlichen CD34+ Zellen in der Knochenmark der Mäuse letztlich nicht lückenlos bewiesen werden konnte, führten wir exemplarisch Untersuchungen mit einem Durchflusszytometer durch. Die

Durchführung dieser Methode ist relativ einfach und schnell. Es werden eindeutig die humanen Zellen im Knochenmark des Empfängers gefunden und gezählt. Jetmore et al. [21] sowie Kollet et al. [25] beispielsweise konnten ebenfalls humane CD34+ Zellen nach i.v.-Injektion in Mäuse nachweisen. Ein genauer Vergleich mit deren Ergebnissen ist auf Grund der geringen Versuchszahl unsererseits sowie wegen der Unterschiede im Versuchsaufbau nicht sinnvoll. Die Durchflusszytometrie ist jedoch mit Sicherheit die experimentelle Methode der Wahl für eine Zellzählung in ähnlichen Transplantationsprojekten wie dem vorliegenden. Die zur Bestätigung unseres histologischen Zellenachweises durchgeführten Messungen am Durchflusszytometer waren nicht ausreichend, um sie mit den MRT-Ergebnissen zu korrelieren. In zukünftigen Projekten kann bei ausreichenden Versuchszahlen sicherlich eine Korrelation angestrebt werden, wodurch der Zellenachweis über die MRT deutlich an Bedeutung gewinnen wird.

Die Stammzellforschung ist allgemein von großem Interesse. Man hat hohe Erwartungen, was das Potenzial der Stammzellen angeht. Diese Arbeit soll helfen das Potenzial der Stammzellen weiter zu ergründen, um es in Zukunft nützen zu können. Wir konnten die Verfolgung von transplantierten Zellen im Organismus ein wenig voran bringen, indem wir einige Sackgassen, einige Umleitungen, aber auch einige Durchfahrten fanden. Bis zum klinischen Einsatz dieser oder ähnlicher Methoden sind jedoch noch weitere Studien notwendig.

6 Zusammenfassung

Im vorliegenden Versuch verwendeten wir humane CD34+ Zellen aus kryokonservierten Nabelschnurblutproben. Diese wurden mit Hilfe eines magnetischen Sortingsystems (MACS®) aus der Gesamtheit der mononukleären Zellen extrahiert. Aus früheren Studien bestehen Protokolle zur Markierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut mit unterschiedlichen Kontrastmitteln [9, 10]. Wir markierten die Untergruppe der CD34+ Zellen mit den im klinischen Einsatz befindlichen MRT-Kontrastmitteln Resovist® und Endorem®. Dabei konnten mit Hilfe des Transfektions-Agens Lipofectamin® humane CD34+ Zellen effizient mit den supraparamagnetischen Eisenoxidpartikeln der o.g. Kontrastmittel markiert werden. Beim Vergleich der Kontrastmittelaufnahme zwischen frischen und nach Kryokonservierung wieder aufgetauten CD34+ Zellen zeigten die frischen Zellen ein besseres Aufnahmevermögen. In vitro konnten wir mit einer Resovist® markierten Suspension humaner kryokonservierter CD34+ Zellen zeigen, dass diese in der Kernspintomographie eine deutliche Signaländerung hervorrufen, trotz geringerer Kontrastmittelaufnahme im Vergleich zu frischen Zellen. Wir überprüften und verglichen die SPIO-Kontrastmittel Resovist® und Endorem® hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die CD34+ Zellen. Zur Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurden Kolonien (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM) auf Methylcellulose ausgewertet. Ohne Kontrastmittelmarkierung waren mehr Kolonien zu zählen als mit Markierung. Bei der Verwendung von Resovist® zeigte sich für jede Untergruppe wie auch entsprechend für die Gesamtzahl der Kolonien mehr Wachstum als bei Endorem®. Somit scheint eine Inkubation mit SPIO-Kontrastmittel die Proliferation der CD34+ Zellen einzuschränken. Resovist® hatte dabei im Gegensatz zu Endorem® einen geringeren Einfluss, daher verwendeten wir für die weiteren Untersuchungen Resovist®. Hinsichtlich der Funktionalität und Überlebensrate konnten wir keinen auffälligen Unterschied zwischen nicht markierten Zellen und Zellen mit SPIO-Markierung feststellen. In Langzeitkulturen fanden wir vergleichbare Zahlen von CAFCs nach zwei, sechs, acht und zwölf Wochen bei unmarkierten Zellen und bei Markierung mit Resovist® oder Endorem®. Auch eine Durchflusszytometrie nach vier Stunden Inkubation zeigte keinen Unterschied in der

Apoptoserate der CD34+ Zellen zwischen reinen Zellsuspensionen und nach Zugabe von Lipofectamin® oder Lipofectamin® mit Resovist®.

Nach Injektion von Resovist® markierten humanen CD34+ Zellen in die Schwanzvene von Balb/c Nacktmäusen konnten in zeitlich gestaffelten Untersuchungen der Mäuse an einem 1,5T Kernspintomographen die Zellen verfolgt werden. Besonderes Interesse ruhte hierbei auf dem Knochenmark der Empfänger, da die Zellen hier nicht passiv über den Blutstrom eingeschwemmt werden, sondern aktiv einwandern. Bei Injektion von 5×10^6 CD34+ Zellen konnten nach zwei und nach 24 Stunden leichte Signaländerungen beschrieben werden, bei 1×10^6 Zellen zeigten sich im Knochenmark keine Veränderungen. Bei einer Zellzahl von 1×10^7 war eine nach 24 Stunden bestehende, statistisch signifikante Signaländerung im MRT nachweisbar. Somit konnten wir eine untere Nachweisgrenze von 1×10^7 CD34+ Zellen im Transplantationsversuch finden. Resovist® als Kontrollprobe ohne Zellen war nur flüchtig im Knochenmark zu sehen und reicherte sich nach 24 Stunden in der Leber an. 5×10^6 und 1×10^7 SPIO markierte CD34+ Zellen zeigten neben den beschriebenen Signaländerungen im Knochenmark ebenfalls nach 24 Stunden ein deutliches Signal in der Leber. Somit konnten wir bei Injektion von 1×10^7 CD34+ Zellen ein Einwandern und sog. Homing der Zellen ins Knochenmark verfolgen. Die Signale in der Leber bei Kontrastmittelinjektion oder bei höheren Zellzahlen erklären sich durch die Anreicherungen im Rahmen von Abbauprozessen.

Im Anschluss an die Untersuchungen im MRT fertigten wir Präparate nach Standardprotokoll für Licht- und Fluoreszenzmikroskopie an. Unter dem Lichtmikroskop konnten mit Berliner Blau Reaktion keine größeren Ansammlungen von intra- oder extrazellulärem Eisen in den untersuchten Organen (Knochenmark, Leber, Lunge, Milz) nachgewiesen werden und somit Artefakte im MRT dahin gehend ausgeschlossen werden. Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnten wir im Knochenmark der Femura der Versuchstiere transplantierte humane CD34+ Zellen nachweisen. Diese waren hierbei im Verbund mit den Empfängerzellen und nicht in den deutlich erkennbaren Blutbahnen zu finden. So konnte gezeigt werden, dass ein aktiver Vorgang vorausgegangen war, in dem die menschlichen Zellen aus dem Blut in das Gewebe übergetreten waren. Ein Nachweis von humanen CD34+ Zellen in Leber, Lunge und Milz war aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften dieser Organe nicht sicher möglich. Eine Zählung der Zellen im Präparat wäre möglich gewesen. Da jedes Präparat jedoch nur einen Bruchteil des gesamten Organs darstellt, müsste

dies über eine Hochrechnung geschehen, die nicht repräsentativ wäre. Für eine Zellzählung untersuchten wir daher exemplarisch das Mäuseknochenmark nach i.v. Injektion von 1×10^7 menschlichen CD34+ Zellen in der Durchflusszytometrie. Hiermit waren relativ genaue Angaben über die Anzahl der ins Knochenmark eingewanderten Stammzellen möglich. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen im Empfängerknochenmark überlebt hatten. Indirekt war es möglich die Reinheit der von uns verwendeten Injektionsproben zu belegen, da im Knochenmark der Mäuse nur eine geringe Anzahl menschlicher, nicht CD34 positiver Zellen nachweisbar war. Wir konnten damit sowohl über die Fluoreszenzmikroskopie wie auch mit der Durchflusszytometrie beweisen, dass menschliche CD34+ Zellen nach i.v. Injektion in immunsupprimierte Nacktmäuse in das Knochenmark der Tiere einwandern und sich dort einnisten. Damit ließ sich auch zeigen, dass die Signaländerungen in der Kernspintomographie durch diese Zellen hervorgerufen wurden. Eine Korrelation zwischen MRT-Signal und der tatsächlichen Zellzahl konnte nicht hergestellt werden. Hierzu sind weitere Studien nötig. Bei Fragen zur Lage und zur mikroanatomischen Umgebung der Zellen können mikroskopische Untersuchungen wie die Fluoreszenzmikroskopie mit passender Antikörpermarkierung weitere Hinweise geben. Für genaue Zellzählungen sind sicherlich Methoden wie die Durchflusszytometrie von Vorteil.

Literaturverzeichnis

- 1 **Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA:** Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging.
Radiology 2003;229:838-846

- 2 **Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ:** Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow.
Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8:257

- 3 **Becker AJ, McCulloch EA, Till JE:** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
Nature 1963; 197:452-4

- 4 **Breems DA, Blokland EA, Neben S, Ploemacher RE:** Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay.
Leukemia 8:1095-1104

- 5 **Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM:** High- efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years.
PNAS 2003;100:645-650

- 6 **Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Bensinger WI, Doney KC, Sullivan KM, Witherspoon RP, Deeg HJ, Appelbaum FR, Storb R, Thomas ED:** Marrow harvesting from normal donors.
Blood 1984; 64:630

- 7 **Charles River Laboratories:** Immunodeficient Models (Stand 2006)
online: http://www.criver.com/research_models_and_services/research_models/BALBc_Nude.html (Download 16.03.07)
- 8 **Clemens MR:** Blut – physiologische Grundlagen in: Siegenthaler W: Klinische Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, 2000, 8. Auflage
- 9 **Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, Rosenbrock H, Keller U, Heinzmann U, Rummeny EJ, Schlegel J, Link TM:** Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents.
Radiology 2003;228:760-767
- 10 **Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, Metz S, Bräuer R, Debus G, Corot C, Schlegel J, Link TM, Peschel C, Rummeny EJ, Oostendorp RA:** Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment.
Radiology 2005;234:197-205
- 11 **Devine SM, Lazarus HM, Emerson SG:** Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects.
Bone Marrow Transplant 2003; 31:241
- 12 **Eichler H, Meckies J, Schmut N, Kern S, Klüter H, Zieger W:** Aspects of donation and processing of stem cell transplants from umbilical cord blood.
Z Geburtshilfe Neonatol 2001; 205:218
- 13 **Engel P (Präsident HCDM und verantwortlicher Herausgeber):** HCDM, responsible for HLDA workshops and CD molecules / About HCDM / History
online: <http://www.hcdm.org/AboutHCDM/tabid/56/Default.aspx> (Download 20.03.12)
- 14 **Ewen K:** Moderne Bildgebung
Thieme Verlag Stuttgart, 1997 (ISBN 3131088613)

- 15 **Flanagan SP:** "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.
Genet Res Camb 1966 8:295–309
- 16 **Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, Bacigalupo A, Piaggio G, Locatelli F:** Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation.
Blood 2003; 102:1138
- 17 **Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD:** Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow.
Proc Natl Acad Sci U S A; 1998;95: 14423-14428
- 18 **Guo Y, Lübbert M, Engelhardt M:** Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies - CD34
Stem Cells 2003; 21;15-20
- 19 **Hidalgo A, Weiss LA, Frenette PS:** Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally.
J Clin Invest 2002; 110:559-569
- 20 **Jacobs VR, Niemeyer M, Gottschalk N, Schneider KT, Kiechle M, Oostendorp RA, Peschel C, Hönicka M, Lehle K, Birnbaum D, Meyer TP, Rapp S, Burkhart J, Aigner J, Eblenkamp M, Wintermantel E:** The STEMMAT-project as part of health initiative BayernAktiv: adult stem cells from umbilical cord and cord blood as alternative to embryonic stem cell research.
Zentralbl Gynäkol. 2005; 127(6):368-72

- 21 **Jetmore A, Plett PA, Tong X, Wolber FM, Breese R, Abonour R, Orschell-Traycoff CM, Srour EF:** Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34⁺ cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients.
Blood 2002; 99(5):1585-93
- 22 **Klein A, Langendorf M, Vorderwülbecke (Vertretungsberechtigte Geschäftsführung der herausgebenden Rote Liste® Service GmbH):** ROTE LISTE®: Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels (SPC)) Resovist_ 0,5 mmol Fe/ml Injektionslösung, Fertigspritze
Rote Liste® Service GmbH, Auflage 2007
- 23 **Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D, Shigeoka A, Brooks J, Smogorzewska EM, Barsky LW, Chan R, Burotto F, Annett G, Nolta JA, Crooks G, Kapoor N, Elder M, Wara D, Bowen T, Madsen E, Snyder FF, Bastian J, Muul L, Blaese RM, Weinberg K, Parkman R:** T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34⁺ cells in ADA-deficient B⁻SCID neonates.
Nat Med 4:775, 1998
- 24 **Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T:** HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver.
J Clin Invest. 2003; 112:160-169
- 25 **Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T:** Rapid and efficient homing of human CD34⁺CD38^{-/low}CXCR4⁺ stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m^{null} mice.
Blood 2001; 97(10):3283-91

- 26 **Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS:** CD34: Structure, biology, and clinical utility.
Blood 1996 1;87(1):1-13
- 27 **Kresse M, Wagner S, Pfefferer D, Lawaczeck R, Elste V, Semmler W:** Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways.
Magn Reson Med 1998; 40:236-242
- 28 **Lapidot T, Dar A, Kollet O:** How do stem cells find their way home?
Blood 2005; 106(6): 1901-10
- 29 **Lapierre V, Oubouzar N, Aupérin A, Tramalloni D, Tayebi H, Robinet E, Kuentz M, Blaise D, Hartmann O, Hervé P, Tiberghien P; Société Française de Greffe de Moelle:** Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogenic transplantation.
Blood 2001; 97:2580
- 30 **Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE:** Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy.
Nat Med 2:1329, 1996
- 31 **Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J:** Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors.
N Engl J Med 2001; 344:1815
- 32 **Leung W, Ramirez M, Novelli EM, Civin CI:** In vivo engraftment potential of clinical hematopoietic grafts.
J Investig Med: 1998; 46:303-311

- 33 **Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R:** Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells.
Nat Biotechnol 2000;18:410-414
- 34 **Maximow A:** Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.
Folia Haematologica VIII 1909;8:125-134
- 35 **Maxwell DJ, Bonde J, Hess DA, Hohm SA, Lahey R, Zhou P, Creer MH, Piwnica-Worms D, Nolte JA:** Fluorophore-conjugated iron oxide nanoparticle labeling and analysis of engrafting human hematopoietic stem cells.
Stem Cells 2008; 26(2):517-24
- 36 **McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ:** Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man.
Science 1971; 171:293
- 37 **Mecklenburg L, Paus R, Halata Z, Bechtold LS, Fleckman P, Sundberg JP:** FOXN1 Is Critical for Onycholemmal Terminal Differentiation in Nude (Foxn1nu) Mice.
Journal of Investigative Dermatology 2004; 123, 1001-1011
- 38 **Merck KGaA:** 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) für die Mikroskopie
Packungsbeilage, Stand August 2004
- 39 **Merck KGaA:** Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) für biochemische Zwecke und für die Fluoreszenzmikroskopie
Packungsbeilage, Stand August 2004

- 40 **Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE:** Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro.
Eur Radiol 2004 Oct;14(10):1851-8
- 41 **Molina A, Popplewell L, Kashyap A, Nademanee A:** Hematopoietic stem cell transplantation in the new millennium: report from City of Hope National Medical Center.
Ann N Y Acad Sci 2001;938:54-61
- 42 **Nilsson SK, Simmons PJ:** Transplantable stem cells: home to specific niches.
Curr Opin Hematol 2004;11:102-106
- 43 **Noort WA, Wilpshaar J, Hertogh CDP, Rad M., Lurvink R, van Luxemburg Heijs SAP, Willemze R, Falkenburg JHF:** CD34+ cells from umbilical cord blood, bone marrow and mobilized peripheral blood engraft differently in NOD/SCID mice.
Blood: 1998; 92:116a
- 44 **Obermann S:** Nachweis Kontrastmittel-markierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen im Mausmodell mit der Magnetresonanztomographie.
Diss. LMU München, München 2004
- 45 **Papayannopoulou T:** Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles.
Curr Opin Hematol. 2003; 10:214-219
- 46 **Parant O, Dubernard G, Challier JC, Oster M, Uzan S, Aractingi S, Khosrotehrani K:** CD34+ cells in maternal placental blood are mainly fetal in origin and express endothelial markers.
Laboratory Investigation 2009; 89, 915–923

- 47 **Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T:** The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice.
Blood 2000;95:3289-3296
- 48 **Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T:** Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.
J Clin Invest 2000;106: 1331-1339
- 49 **Remberger M, Beelen DW, Fauser A, Basara N, Basu O, Ringdén O:** Increased risk of extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using unrelated donors.
Blood 2005; 105:548
- 50 **Rocha V, Wagner JE Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E:** Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources.
N Engl J Med 2000; 342:1846
- 51 **Rudelius M, Dalsrup-Link HE, Heinzmann, Piontek G, Settles M, Link TM, Schlegel J:** Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells.
Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003;30:1038-1044

- 52 **Schäfer R, Kehlbach R, Wiskirchen J, Bantleon R, Pintaske J, Brehm BR, Gerber A, Wolburg H, Claussen CD, Northoff H:** Transferrin Receptor Upregulation: In Vitro Labeling of Rat Mesenchymal Stem Cells with Superparamagnetic Iron Oxide.
Radiology, 244, 514-523
- 53 **Scheuber HP, Scharmann W, Brill T, Dürr U, Hackbarth H, Kaegler M, Maess J, Militzer K, Petersohn M, Schubert H, Weiß J, Becker K, Cybik M, Dimigen J, Döring D, Nelz P, Kilian A, Lutterbach A, Reetz I, Roth H, Strauch O, Seeger K:** Empfohlene maximale Injektionsvolumina bei Versuchstieren (Stand Mai 1999/ März 2006)
online: http://www.gv-solas.de/auss/tie/tie_injektionsvol.pdf (Download 25.04.08)
- 54 **Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, Zhang MJ, Klein JP, Rizzo JD, Loberiza FR, Gratwohl A, Champlin RE; International Bone Marrow Transplant Registry; European Group for Blood and Marrow Transplantation:** Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation.
Blood 2006; 108:4288
- 55 **Schoepf U, Marecos E, Melder R, Jain RK, Weissleder R:** Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies.
Biotechniques 1998;24:642-651
- 56 **Schweitzer KM, Drager AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijsmeijer AP, van der Schoot CE, Langenhuijsen MM:** Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues.
Am J Pathol. 1996;148:165-175

- 57 **Senéterre E, Weissleder R, Jaramillo D, Reimer P, Lee AS, Brady TJ, Wittenberg J:** Bone marrow: ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging.
Radiology 1991; 179(2): 529-33
- 58 **Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK:** Transplantation of ex vivo expanded cord blood.
Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8:368
- 59 **Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers ME, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M:** Immune reconstitution after allogenic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation.
Blood 2001; 97:3380
- 60 **Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, Yamada T, Uchimaruru K, Tojo A, Shirafuji N, Kodo H, Tani K, Takahashi T, Yamaguchi T, Asano S:** Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies.
Blood 2004; 104:3813
- 61 **Tjonnfjord GE, Steen R, Veiby OP, Friedrich W, Egeland T:** Evidence for engraftment of donor-type multipotent CD34+ cells in a patient with selective T-lymphocyte reconstitution after bone marrow transplantation for B⁻SCID.
Blood 84:3584, 1994
- 62 **Tschorn U (Vertretungsberechtigte Geschäftsführung der herausgebenden Dacon GmbH):** Endorem 11,2mg Fe/ml-Konzentrat zur Herstellung einer Infusionssuspension.
online: <http://www.pharmazie.com/graphic/A/15/1-21615.pdf> (Download 28.03.12)

- 63 **Vande Berg BC, Lecouvet FE, Kanku JP, Jamart J, Van Beers BE, Maldague B, Malghem J:** Ferumoxides-enhanced quantitative magnetic resonance imaging of the normal and abnormal bone marrow: preliminary assessment.
J Magn Reson Imaging 1999 Feb;9(2):322-8
- 64 **Wang JC, Doedens M, Dick JE:** Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay.
Blood 1997; 89:3919
- 65 **Weiss C, Jelkmann W:** Funktionen des Blutes in: Schmidt RF, Thews G, Lang F: Physiologie des Menschen.
Springer Verlag, 2000, 28. Auflage
- 66 **Weissleder R, Cheng H, Bogdanova A, Bogdanov A Jr.:** Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging.
J Magn Reson Imaging 1997;7:258-263
- 67 **Welsch U:** Sobotta Lehrbuch Histologie
Urban & Fischer Verlag 1. Auflage 2003
- 68 **Wilpshaar J, Falkenburg JH, Tong X, Noort WA, Breese R, Heilman D, Kanhai H, Orschell-Traycoff CM, Srour EF:** Similar repopulating capacity of mitotically active and resting umbilical cord blood CD34(+) cells in NOD/SCID mice.
Blood 2000;96(6):2100-7
- 69 **Yeh T, Zhang W, Ildstad S, Ho C:** In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles.
Magn Reson Med 1995;33:200-208

Danksagung

PD Dr. Marcus Kremer für die Hilfestellung für ein selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten und für die Annahme meiner Arbeit.

PD Dr. Markus Niemeyer für die Aufnahme in das Forschungsprojekt und die Hilfe bei der Organisation.

PD Dr. Robert Oostendorp, Sandra Hippauf, Viktoria Bekker-Ruz für die gute Zusammenarbeit bei der Zellvorbereitung.

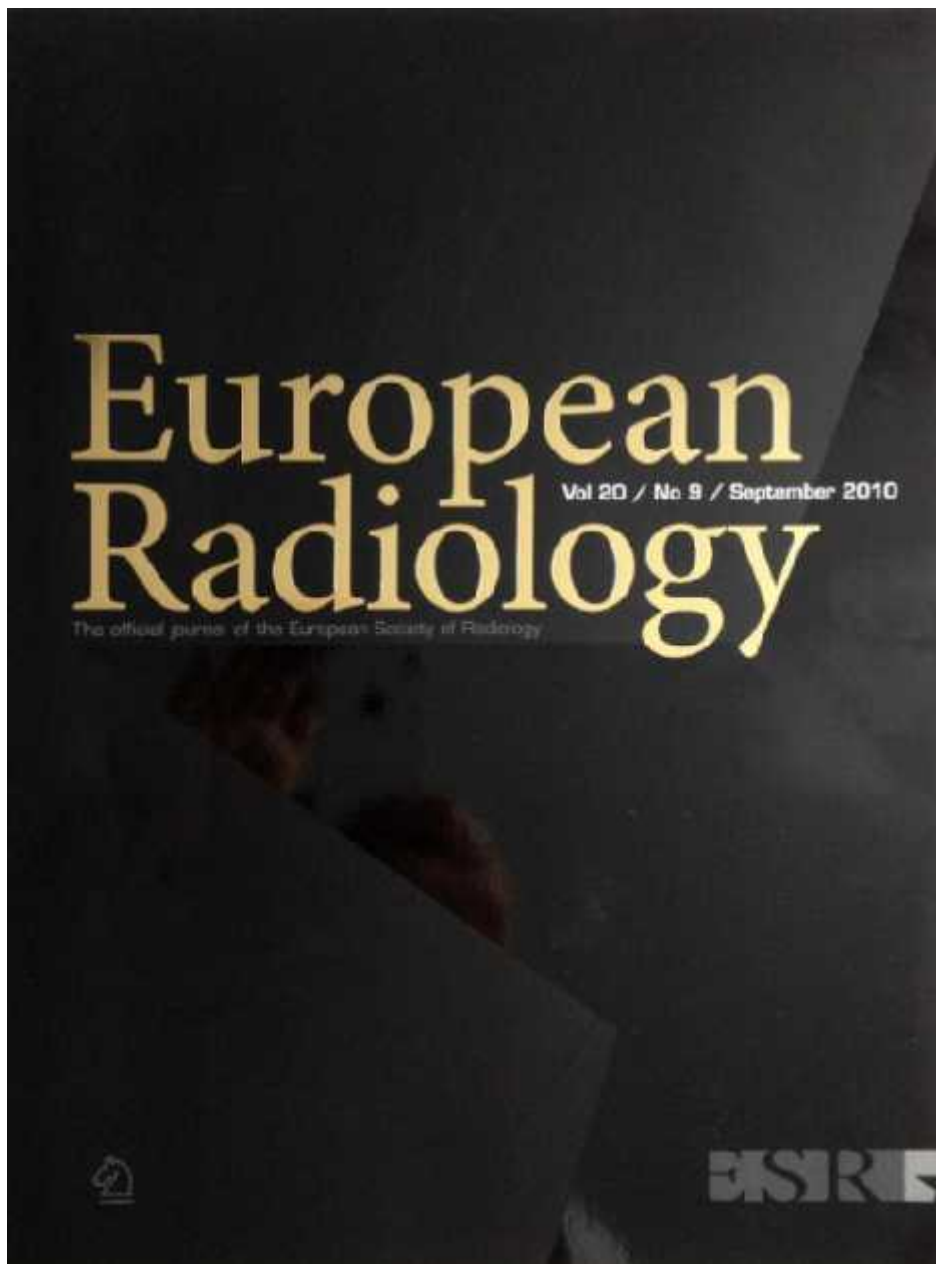
Guido Piontek für die kompetente Betreuung bei den histologischen Arbeiten.

Georg Ludwig für die freundschaftliche Zusammenarbeit während der MRT-Untersuchungen.

Meiner Familie und allen Freunden, die mich stets unterstützt und animiert haben, die Arbeit fertigzustellen.

Appendix

Einige der Ergebnisse dieser Dissertation wurden in der Zeitschrift European Radiology (Vol 20 / No 9 / September 2010) publiziert: Non-invasive tracking of human haemopoietic CD34⁺ stem cells in vivo in immunodeficient mice by using magnetic resonance imaging (Eur Radiol DOI 10.1007/s00330-010-1773-z).



Markus Niemeyer
Robert A. J. Oostendorp
Markus Kremer
Sandra Hippauf
Volker R. Jacobs
Hansjörg Baurecht
Georg Ludwig
Guido Piontek
Viktoria Bekker-Ruz
Sebastian Timmer
Ernst J. Rummeny
Marion Kiechle
Ambros J. Beer

Received: 31 August 2009
Revised: 4 February 2010
Accepted: 5 February 2010
© European Society of Radiology 2010

M. Niemeyer (✉) · V. R. Jacobs ·
S. Timmer · M. Kiechle
Department of Gynaecology,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich,
Germany
e-mail: markus.niemeyer@gmx.net
Tel: +49-89-41402420
Fax: +49-89-41404811

R. A. Oostendorp · S. Hippauf ·
V. Bekker-Ruz
Department of Oncology, Klinikum rechts
der Isar, Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675, Munich, Germany

R. Oostendorp
e-mail: oostendorp@lrz.tum.de

S. Hippauf
e-mail: satsdri_sunshine@web.de

V. Bekker-Ruz
e-mail: viktoriaruz@hotmail.com

M. Kremer
Department of Pathology, Klinikum rechts
der Isar, Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany
e-mail: kremer@lrz.tum.de

H. Baurecht
Department of Statistics, Klinikum rechts
der Isar, Institute for Medical Statistics
and Epidemiology, Technische Universität
München, Ismaninger Str. 22, 81675
Munich, Germany
e-mail: baurecht@lrz.tum.de

Non-invasive tracking of human haemopoietic CD34⁺ stem cells in vivo in immunodeficient mice by using magnetic resonance imaging

G. Ludwig · E. J. Rummeny · A. J. Beer
Department of Radiology, Klinikum rechts
der Isar, Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich,
Germany

G. Ludwig
e-mail: redfrogGL@web.de

E. J. Rummeny
e-mail: rummeny@roe.med.tu-muenchen.de

G. Piontek
Department of Neuropathology,
Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich,
Germany
e-mail: piontek@neuropatho.de

Present Address:
A. J. Beer
Department of Nuclear Medicine,
Technische Universität München,
Munich, Germany
e-mail: beer@roe.med.tu-muenchen.de

Abstract

Objective To assess migration of CD34⁺ human stem cells to the bone marrow of athymic mice by using magnetic resonance (MR) imaging and Resovist, a contrast agent containing superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. **Methods** All animal and human procedures were approved by our institution's ethics committee, and women had given consent to donate umbilical cord blood (UCB).

Balb/c-AnN Foxn1tm/CrI mice received intravenous injection of 1×10^6 ($n=3$), 5×10^6 ($n=3$) or 1×10^7 ($n=3$) human Resovist-labelled CD34⁺ cells; control mice received Resovist ($n=3$). MR imaging was performed before, 2 and 24h after transplantation. Signal intensities of liver, muscle and bone marrow were measured and analysed by ANOVA and post hoc Student's *t* tests. MR imaging data were verified by histological and immunological detection of both human cell surface markers and carboxydextran-coating of the contrast agent. **Results** CD34⁺ cells were efficiently labelled by Resovist without impairment of functionality. Twenty-four hours after administration of labelled cells, MR imaging revealed a significant signal decline in the bone marrow, and histological and immunological analyses confirmed the presence of transplanted human CD34⁺ cells. **Conclusion** Intravenously administered Resovist-labelled CD34⁺ cells home to bone marrow of mice. Homing can be tracked in vivo by using clinical 1.5-T MR imaging technology.

Keywords Magnetic resonance imaging · Cell tracking · Haemopoietic CD34 stem cells · Superparamagnetic iron oxide particles · Bone marrow homing