

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Verträglichkeit und Effektivität Cyclosporin A-vermittelter  
Immunsuppression beim Schaf für die xenogene, intrazerebrale  
Transplantation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Rita Diehl  
aus Heppenheim

Leipzig, 2016

*Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig*

*Dekan:* Prof. Dr. Walter Brehm

*Betreuer:* Prof. Dr. Dr. Johannes Boltze  
Prof. Dr. Christoph Mülling

*Gutachter:* Prof. Dr. Dr. Johannes Boltze, Abteilung Medizinische Zelltechnologie der  
Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie, Lübeck  
Prof. Dr. Christoph Mülling, Veterinär-Anatomisches Institut der  
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig  
Prof. Dr. Anja Sterner-Kock, Institut für Experimentelle Medizin der Uniklinik Köln,  
Köln

*Tag der Verteidigung: 27. September 2016*

*Für Simon und meine Familie*

*„Das Schönste aber hier auf Erden ist lieben und geliebt zu werden.“*

*(Wilhelm Busch)*



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Klassifikation von Stammzellen .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Tierexperimentelle Stammzelltherapie beim Schlaganfall .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Hintergrund der translationalen Forschung am Tiermodell.....	5
2.2.2 Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie.....	6
2.2.3 Das Schaf als Großtiermodell.....	7
2.2.4 Transplantation fhNPZ als zelltherapeutischer Ansatz nach fokaler zerebraler Ischämie. 8	
2.2.4.1 Die <i>In-vivo</i> -Überwachung von in Schafhirne transplantierten fhNPZ .....	9
2.2.4.2 Der immunhistochemische Nachweis vitaler humaner Zellen <i>ex vivo</i> im Schafhirn ..	11
<b>2.3 Immunsuppression nach der Transplantation von Stammzellen.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Wirkmechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems .....	12
2.3.2 Immunantwort nach Transplantation.....	12
2.3.3 Wirkstoffklassen von Immunsuppressiva.....	14
2.3.4 Cyclosporin A.....	16
2.3.4.1 Wirkmechanismus von Cyclosporin A.....	16
2.3.4.2 Pharmakokinetik und Metabolisierung von Cyclosporin A .....	16
2.3.4.3 Applikation und Dosierung von Cyclosporin A.....	17
2.3.4.4 Nebenwirkungen und Toxizität von Cyclosporin A.....	17
2.3.4.5 Anwendung von Cyclosporin A in der tierexperimentellen Forschung .....	18
<b>2.4 Fragestellung und Versuchsziele der Dissertation.....</b>	<b>19</b>
<b>3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Zellkultur.....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Zellkulturmedien und Zusammensetzung.....	20
3.1.2 Auftauen und Aussaat der Zellen .....	20
3.1.3 Ablösen der Zellen.....	21
3.1.4 Zellzählung mittels Trypanblautest .....	21
3.1.5 Passagieren der Zellen .....	21
3.1.6 Eisenmarkierung der Zellen.....	22
3.1.7 Proliferations- und Vitalitätstests .....	22

3.1.8	Ablösen der Zellen für Transplantationsexperimente .....	22
3.1.9	Mykoplasmentest .....	23
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der T2 NMR-Relaxationszeit .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Gelphantome.....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Herstellung und Ausgießen.....	24
3.3.2	Anfertigen von <i>In-vitro</i> -MRT-Aufnahmen zum Nachweis der eisenmarkierten fhNPZ.	25
<b>3.4</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>26</b>
3.4.1	Tierhaltung.....	26
3.4.2	Versuchstiere im tierexperimentellen Versuch .....	26
3.4.2.1	Tierärztliche Untersuchung der Vitalparameter .....	26
3.4.2.2	Durchführung des neurologischen Untersuchungsgangs.....	27
3.4.2.3	Blutprobenentnahme, Versand und Detektiermethode .....	27
<b>3.5</b>	<b>Versuchsaufbau und Durchführung .....</b>	<b>28</b>
3.5.1	Anästhesie .....	29
3.5.2	Schmerzmittelregime und Infektionsprophylaxe .....	30
3.5.3	Implantation des Portsystems .....	31
3.5.4	Applikation von CsA .....	32
3.5.4.1	Herstellung der Infusionslösung .....	32
3.5.4.2	Applikation über das Portsystem .....	33
3.5.5	Stammzelltransplantation.....	33
3.5.5.1	Anfertigen von MRT-Aufnahmen im 1,5 T MRT .....	34
3.5.5.2	Planung der stereotaktischen Zelltransplantation .....	34
3.5.5.3	Stereotaktische Zelltransplantation.....	34
3.5.6	Nachweis der eisenmarkierten Stammzellen im 3,0 T MRT .....	35
3.5.6.1	Methodik zum Nachweis und zur Quantifizierung der eisenmarkierten fhNPZ im Schafhirn.....	35
3.5.7	Sektion der Versuchstiere und Probenentnahme .....	36
3.5.8	Anfertigen der histologischen Gewebeschnitte.....	36
3.5.8.1	Herstellung der Paraffinschnitte .....	37
3.5.8.2	Probenaufarbeitung und Lamellieren der Gehirne.....	37
3.5.8.3	Herstellung der Gefrierschnitte.....	38
3.5.9	Histologische Färbungen .....	38
3.5.9.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	40
3.5.9.2	Berliner Blau-Färbung.....	40
3.5.9.3	Fouchét-Färbung.....	40
3.5.9.4	Immunmarkierung mit STEM101-DAB und Berliner Blau-Färbung .....	40
3.5.9.5	Immunhistologische Markierung mit Iba1-Antikörpern.....	40

3.5.10	Auswertung der histologischen Präparate.....	41
<b>3.6</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis eisenmarkierter fhNPZ <i>in vitro</i> via MRT-Aufnahmen.....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Welche Eisenkonzentration ist für die Markierung der fhNPZ am geeignetsten?.....	47
4.1.2	Können markierte fhNPZ durch eine T2-gewichtete MRT-Sequenz dargestellt werden? .....	49
4.1.3	Wo liegt das Detektionslimit markierter fhNPZ in einer T2-gewichteten MRT-Sequenz? .....	50
<b>4.2</b>	<b>Der Einfluss des Immunsuppressivums CsA auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im Schafhirn.....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Gibt es gruppenspezifische Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen? .....	51
4.2.2	Besitzt die Transplantation fhNPZ einen neurologischen Einfluss auf die Sensorik und Motorik? .....	54
4.2.3	Was geschieht mit den transplantierten fhNPZ im Zeitverlauf und Gruppenvergleich?.	55
4.2.4	Können vitale fhNPZ 42 Tage nach Transplantation im Schafhirn nachgewiesen werden? .....	56
<b>4.3</b>	<b>Klinische und pathologische Nebenwirkungen von CsA im Schaf.....</b>	<b>59</b>
4.3.1	Beeinflusst die CsA-Applikation <i>in vivo</i> klinische Parameter oder Blutwerte beim Schaf? .....	59
4.3.1.1	Auswertung der Körpertemperaturverläufe.....	59
4.3.1.2	Auswertung der Körpergewichtsverläufe.....	60
4.3.1.3	Auswertung hämodynamischer Parameter .....	61
4.3.1.4	Auswertung hämatologischer Blutparameter .....	62
4.3.1.5	Auswertung leberspezifischer Blutparameter.....	65
4.3.1.6	Auswertung nierenspezifischer Blutparameter.....	69
4.3.1.7	Auswertung sonstiger Blutparameter .....	70
4.3.2	Können <i>ex vivo</i> toxische Einflüsse von CsA auf das Schaf nachgewiesen werden?.....	71
4.3.2.1	Makroskopische Auswertung der Sektionsbefunde .....	71
4.3.2.2	Histologische Auswertung Leber und Nieren .....	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Hintergrund der Arbeit und Versuchsziele.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Bewertung des Studiendesigns und der Versuchsdurchführung .....</b>	<b>76</b>
5.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	76
5.2.2	Studiendesign und das Schaf als Tiermodell .....	77

<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
5.3.1	Ein Nachweis eisenmarkierter fhNPZ <i>in vitro</i> via MRT-Aufnahmen ist möglich .....	78
5.3.1.1	Eine Eisenkonzentration von 3,0 mM ist für die Markierung der fhNPZ am geeignetsten .....	79
5.3.1.2	Markierte fhNPZ können durch eine T2-gewichtete Sequenz dargestellt werden .....	80
5.3.1.3	Das Detektionslimit markierter fhNPZ liegt in einer T2-gewichteten MRT-Sequenz bei 50.000 Zellen .....	81
5.3.2	Die Langzeitgabe des Immunsuppressivums CsA besitzt keinen Einfluss auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im immunprivilegierten Gehirn .....	81
5.3.2.1	Es gibt gruppenspezifische Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen .....	81
5.3.2.2	Die Transplantation von fhNPZ besitzt keinen bedeutenden Einfluss auf die Sensorik und Motorik .....	83
5.3.2.3	Die transplantierten fhNPZ zeigen Veränderungen in Zeitverlauf und Gruppenvergleich .....	84
5.3.2.4	Es können keine vitalen fhNPZ 42 Tage nach Transplantation im Schafhirn nachgewiesen werden .....	85
5.3.2.5	Schlussfolgerung zur Immunsuppression mittels CsA nach Stammzelltransplantation ins Schafhirn .....	87
5.3.3	Die Langzeitgabe von CsA verursacht Anzeichen für pathologische Veränderungen und klinische Symptome beim Schaf .....	88
5.3.3.1	Die Langzeitgabe von CsA beeinflusst klinische Parameter beim Schaf .....	88
5.3.3.2	Die Langzeitgabe von CsA zeigt wahrscheinlich keine hämodynamische Wirkung ..	89
5.3.3.3	Die Gabe von CsA zeigt Anzeichen für eine hämatologische Wirkung beim Schaf...	89
5.3.3.4	Die Gabe von CsA zeigt eine hepatotoxische Wirkung beim Schaf .....	90
5.3.3.5	Die Gabe von CsA zeigt eine nephrotoxische Wirkung beim Schaf .....	93
5.3.3.6	Die Langzeitgabe von CsA beeinflusst weitere unspezifische Blutparameter .....	95
5.3.3.7	Schlussfolgerungen zu Nebenwirkungen von CsA beim Schaf .....	95
<b>5.4</b>	<b>Allgemeine Schlussfolgerung.....</b>	<b>95</b>
<b>5.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>110</b>
<b>9.1</b>	<b>Ergänzende Tabelle zur Herstellung der Gelphantome .....</b>	<b>110</b>
<b>9.2</b>	<b>Ergänzende Tabellen zur Herstellung histologischer Präparate .....</b>	<b>111</b>
9.2.1	Herstellung der Paraffinblöcke .....	111

9.2.2	Histologische Färbungen und Immunhistochemische Methoden .....	112
9.3	<b>Ergänzende Tabellen zur Statistik .....</b>	<b>116</b>
9.4	<b>Verwendete Referenzwerte .....</b>	<b>118</b>
9.5	<b>Übersicht der ausgewerteten Blutparameter .....</b>	<b>119</b>
9.6	<b>Übersicht zu tierexperimentellen Einsätzen von Stammzellen in Schlaganfallmodellen .....</b>	<b>122</b>
9.7	<b>Auflistung verwendeter Materialien und Geräte.....</b>	<b>123</b>
9.8	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
9.9	<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
9.10	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
10	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>132</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	ESI-TMS	Elektrospray-Ionisation-Tandem-
µg	Mikrogramm		Massenspektrometrie
µl	Mikroliter		fetale humane neurale
4HCY	4-Hydroxycyclophosphamid	fhNPZ	Progenitorzelle
A.	Arterie	FKBP	<i>FK506 binding protein</i>
AC	Acrolein	FSZ	fetale Stammzelle
ALP	Alkalische Phosphatase	Fyn	Tyrosin-Proteinkinase
AP	Aldophosphamid	g	Erdbeschleunigung oder Gramm
ASAT	Aspartat-Aminotransferase	G	Gauge, Einheit für den Außendurchmesser einer Kanüle
ASZ	adulte Stammzelle		
AUC	<i>area under the curve</i>	GC	Glukokortikoide
AUC <sub>2h</sub>	Berechnung der <i>area under the curve</i> 2 h nach CsA-Applikation	GEF	<i>guanine-nucleotide exchanging factors</i>
AUC-I	Zeitraum Tag 1 - 64	GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
AUC-II	Zeitraum Tag 1 - 36	GGT	γ-Glutamyltransferase
AUC-III	Zeitraum Tag 37 - 64	GLDH	Glutamatdehydrogenase
BB-Färbung	Berliner Blau-Färbung	h	Stunde
B-FGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor	HCl	Salzsäure
bzw.	beziehungsweise	HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
C	Kortex	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ca.	circa	Hsp 90	Hitzeschockprotein 90
CC	Corpus callosum	i.m.	intramuskulär
CK	Kreatin-Kinase	i.v.	intravenös
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter	iA	Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	Iba1	ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1
CsA	Cyclosporin A	iCsA	intermittierende Gruppe
CY	Cyclophosphamid	IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
CYP	Cytochrom P450	IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
d	Tag	iPSZ	induzierte pluripotente Stammzelle
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	IS	Immunsystem
DAG	Diacylglycerin	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)	Kap.	Kapitel
DHR	Dihydrofolat-Reduktase	kCsA	kontinuierliche Gruppe
DMC	<i>Dunn's multiple comparisons test</i>	KGW	Körpergewicht
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>	Kon	Kontrollgruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid	KWT	Kruskal-Wallis Test
DNA	Desoxyribonukleinsäure	l	Liter
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	Lck	lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase
EKG	Elektrokardiogramm	LDH	Laktat-Dehydrogenase
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>		
ESZ	embryonale Stammzelle		

LIF	<i>leucemia inhibitory factor</i>		bisphosphat
Lsg.	Lösung	PK	Positivkontrolle
MAC	mittlere alveoläre Konzentration	PKC	Proteinkinase C
MBK	mittlere Blutkonzentration	PLC $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
MCA	mittlere Zerebralarterie	PZ	Progenitorzelle
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i>	RAC	Guanosintriphosphat
MEK	MAP-Kinase-Kinase	RAF	Serin/Threonin-Proteinkinase
MEKK	Serin/Threonin-Proteinkinase	RAS	<i>guanosine-nucleotide-binding protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	ROI	<i>region of interest</i>
min	Minute	RT	Raumtemperatur
mind.	mindestens	s.	siehe
ml	Milliliter	s	Sekunde
mM	millimolar	St	Striatum
MMF	Mycophenolat-Mofetil	STAIR	<i>stroke therapy academic industry roundtable</i>
MRT	Magnetresonanztomografie	STEM101	monoklonaler Mäuseantikörper, der spezifisch an den humanen Ku80-Zellkernmarker bindet
ms	Millisekunde		<i>stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke</i>
MSZ	mesenchymale Stammzelle	STEPS	suszeptibilitätsgewichtete Sequenz
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	SWI	Stammzelle
MTX	Methotrexat	SZ	Tesla oder Tera = 10 <sup>12</sup>
N <sub>2</sub>	Stickstoff	T	transversale Relaxationszeit
NaCl	Kochsalz, Natriumchlorid	T <sub>2</sub>	Gewebekulturflasche 25 cm <sup>2</sup>
NaOH	Natriumhydroxid	T25	täglich
NFAT	<i>nuclear factor of activated T- cells</i>	tägl.	TRIS-Borat-EDTA-Puffer,
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light- chain-enhancer' of activated B-cells</i>	TBE-Puffer	Transkriptionsfaktor
ng	Nanogramm	TCF	Tacrolimus
NHP	<i>non-human primate</i>	Tcr	T-Zell-Rezeptor
nm	Nanometer	TCR	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
NK	Negativkontrolle	TGF- $\beta$	arbiträre Einheit
NMR	Kernspinresonanz	U	und so weiter
NPZ	neurale Progenitorzelle	usw.	<i>Vena</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff	V.	demineralisiertes Wasser
obB	ohne besonderen Befund	VE-Wasser	versus
OP	Operation oder Operationssaal	vs.	<i>very small superparamagnetic iron oxide particles</i>
p	Signifikanzwert	VSOP	mal
P	Passage	x	zum Beispiel
p.o.	<i>per os</i>	z.B.	Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	Zap-70	Gesamtzellzahl
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	ZZ	
PFA	Paraformaldehyd		
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung		
PHM	Phosphoramid-Mustard		
PiP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-		



## 1 EINLEITUNG

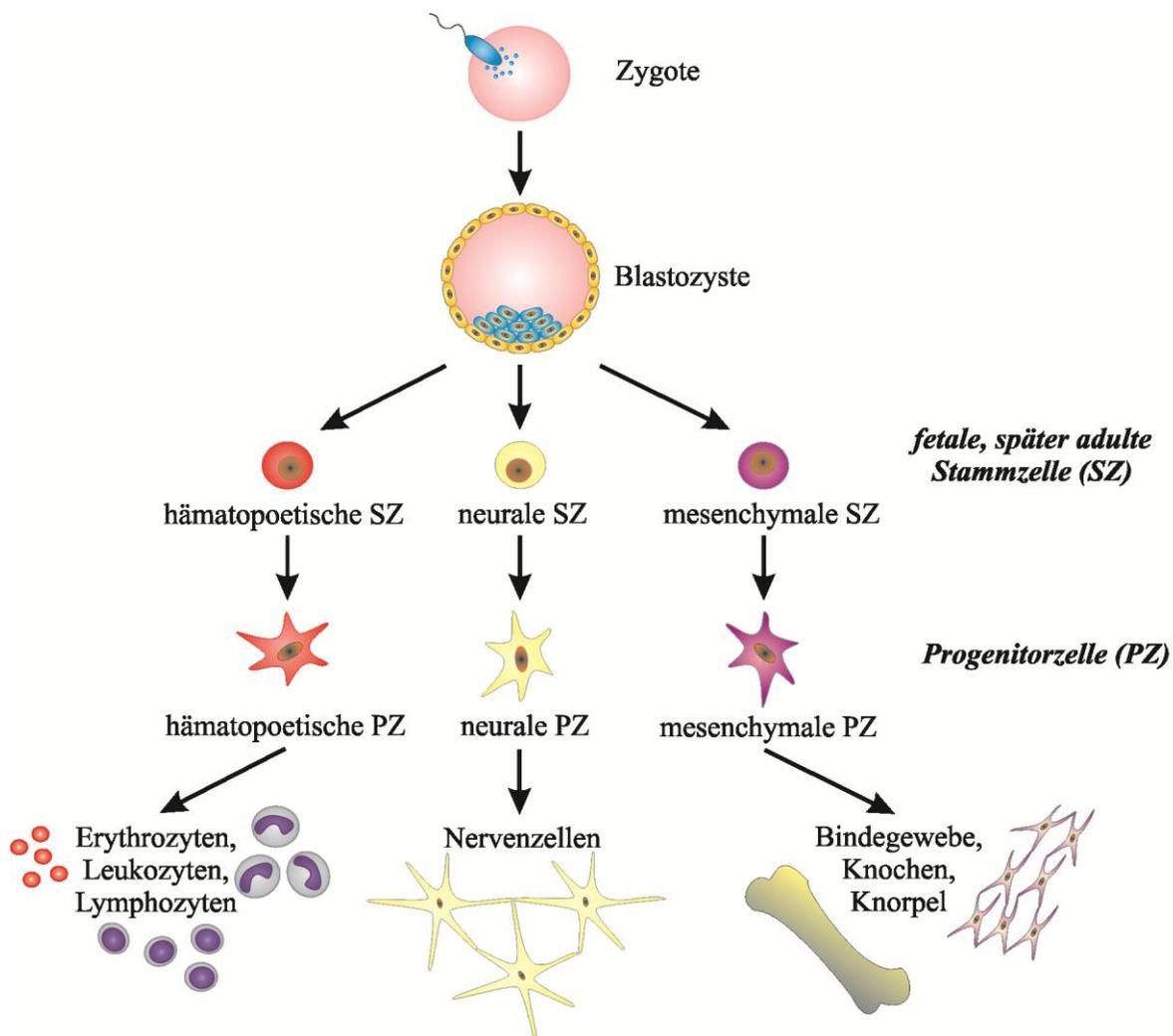
Stammzellen können in verschiedene funktionale Zelltypen ausdifferenzieren und verfügen über ein enormes Proliferationspotential. Sie besitzen zudem die Fähigkeit, durch Teilung weitere Stammzellen hervorzubringen, um sich damit selbst dauerhaft zu erneuern (NAM et al. 2015). Der Einsatz von Stammzellen als Grundlage neuer therapeutischer Strategien wird bereits seit über 25 Jahren intensiv erforscht. Dabei wurden beeindruckende Erkenntnisse zu deren therapeutischem Potential gewonnen. Je nach Herkunft, Art und ihrer Potenz, also dem Ausmaß der Fähigkeit, in funktionelles Gewebe auszudifferenzieren, können Stammzellen Verbünde funktionaler Zellen, sowie ganze Gewebeverbände bilden (MARIANO et al. 2015). Einige Stammzellpopulationen unterstützen zusätzlich durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aktiv endogene Regenerationsprozesse (STEINBECK und STUDER 2015). Ausgehend von diesen Fähigkeiten sehen Forscher und Kliniker erstmals eine realistische Möglichkeit, kurative Therapien für Erkrankungen zu entwickeln, die bisher als schwer behandelbar oder sogar unheilbar angesehen wurden. Davon könnten insbesondere Patienten mit chronisch-degenerativen, neurologischen und zerebrovaskulären Erkrankungen, einschließlich der großen Anzahl an Schlaganfallopfern, profitieren. Schlaganfälle repräsentieren eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (LOPEZ et al. 2006). Ein Drittel der betroffenen Patienten verstirbt innerhalb eines Jahres, während etwa 40% von dauerhaften Behinderungen betroffen sind (MOZAFFARIAN et al. 2015). Trotz intensiver Forschung existieren neben der systemischen Thrombolyse, die auf einen engen Zeitraum von maximal 4,5 Stunden nach dem Akutereignis beschränkt ist, keine zugelassenen Therapieoptionen (HACKE et al. 2008, SAVER et al. 2009). Ein Großteil der Schlaganfallpatienten erfährt daher keine kausale Behandlung, woraus ein hoher Leidensdruck und eine erhebliche sozioökonomische Belastung resultieren (PARKER 2010). Zelltherapeutische Strategien zur Behandlung des Schlaganfalls werden daher als besonders vielversprechend angesehen (ANDRES et al. 2011). Die erfolglose Forschung an neuroprotektiven Medikamenten der vergangenen zwei Jahrzehnte hat jedoch gezeigt, dass die Übertragung von experimentellen Ergebnissen in klinisch einsetzbare, sichere und effektive Therapieverfahren, nicht unproblematisch ist. Neben den bereits gesicherten Erkenntnissen zur stammzelltherapeutischen Sicherheit und Wirksamkeit aus Studien unter Einsatz gängiger Nagermodelle (BLISS et al. 2006, JOO et al. 2013) wird insbesondere die Überprüfung der Wirksamkeit an geeigneten Großtiermodellen gefordert, die die Situation des menschlichen Schlaganfallpatienten möglichst realistisch wiedergeben sollen (SAVITZ et al. 2011). Da klinisch breit anwendbare Stammzelltherapien aus logistischen Gründen vor allem allogener oder sogar xenogener Natur sein werden (SAVITZ et al. 2005), setzt dies auch die Adaption gängiger immunsupprimierender Therapiebegleitregime voraus. Dies ist das zentrale Anliegen der vorliegenden Dissertation, in welcher die xenogene Transplantation unter Immunsuppression im Schafmodell simuliert werden soll. Dadurch kann zum einen die therapeutische Fähigkeit der für den Menschen allogenen neuralen Stammzellen im Gehirn überprüft und zum anderen eine Testplattform für eine xenogene Zelltransplantation geschaffen werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

Im Folgenden soll in die Grundlagen der Stammzellbiologie sowie der translationalen, zelltherapeutisch orientierten Schlaganfallforschung eingeführt werden, bevor auf Basis neuester Erkenntnisse aus dem Feld der immunsupprimierenden und -modulierenden Strategien das rationale sowie das wissenschaftlich-methodische Vorgehen dieser Arbeit abgeleitet werden.

### 2.1 Klassifikation von Stammzellen

Stammzellen lassen sich auf Grundlage ihrer Entwicklung und Teilungsfähigkeit in drei verschiedene Klassen einteilen, die embryonalen, die fetalen und die adulten Stammzellen (s. Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Abbildung der Zellteilung und -differenzierung**

In der Embryonalentwicklung entsteht aus der befruchteten Eizelle durch Teilung die Blastozyste. Aus ihr können embryonale Stammzellen (ESZ) entnommen werden. Die weitere Reifung des Embryos führt zur Entwicklung von fetalen Stammzellen (FSZ), die zu Vorläuferzellen (Progenitorzellen [PZ]) differenzieren können. Aus diesen PZ differenzieren sich dann die somatischen Gewebezellen. Nach der Geburt bleiben Stammzellen im Körper zur Gewebsregeneration vorhanden wie z.B. die hämatopoetische Stammzellen. Diese differenzieren sich wiederum zu PZ und anschließend zu somatischen Zellen. SZ = Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESZ) entwickeln sich nach der Befruchtung einer Eizelle im Laufe der Zellteilungsstadien. Sie werden zum Beispiel aus der Blastozyste, einem Entwicklungsstadium des Embryos, entnommen. ESZ sind pluripotent, was bedeutet, dass sie sich in alle Zellen der drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) wie beispielsweise Knorpel-, glatte Muskel-, Epithelzellen oder Neurone entwickeln können. In *In-vitro*-Studien konnten bei ESZ eine hohe Proliferationskapazität ohne Ausdifferenzierung nachgewiesen werden (THOMSON 1998). Sie zeigten in einem Schlaganfallmodell bei Ratten bereits erfolgreich die Fähigkeit nach Transplantation in die ischämische Region zu migrieren und dort zu Neuronen auszdifferenzieren (HOEHN et al. 2002). Diese Eigenschaften führten allerdings bei einem murinen Modell zu teratogenen Effekten (ERDÖ et al. 2003). Fetale Stammzellen (FSZ) besitzen im Vergleich zu adulten Stammzellen (ASZ) ein höheres Proliferationspotenzial. Allerdings ist ihr Differenzierungsvermögen in verschiedene Vorläuferzellen, sogenannte Progenitorzellen, im Vergleich zu ESZ beschränkt (MIMEAULT und BATRA 2006). ASZ sind Stammzellen des erwachsenen Organismus, die sich gewebespezifisch teilen und ausdifferenzieren können, wie beispielsweise Stammzellen des blutbildenden Knochenmarks (hämatopoetische ASZ), des zentralen Nervensystems (neurale ASZ) oder der Skelettmuskulatur (mesenchymale ASZ). Aufgrund ihrer ethischen Unbedenklichkeit werden sie häufig in der Klinik angewendet (NAM et al. 2015). Die jeweiligen Vor- und Nachteile der drei Stammzellpopulationen in der therapeutischen Anwendung sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Vor- und Nachteile der verschiedenen Stammzellpopulationen**

Art der Stammzellen	Vorteile	Nachteile
ESZ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pluripotent</li> <li>• Hohe Proliferationskapazität<sup>1</sup></li> <li>• Migration nach Transplantation</li> <li>• Ausdifferenzierung Neuronen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohes Risiko der Teratogenität<sup>2</sup></li> <li>• Nutzung ethisch kontrovers diskutiert, da aus Embryonen entnommen<sup>3</sup></li> </ul>
FSZ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kein Risiko der Teratogenität</li> <li>• Besitzen eine hohe Plastizität</li> <li>• Können die Blut-Plazenta- und die Blut-Hirn-Schranke überwinden</li> <li>• i.v. Applikation auch bei neurologischen Erkrankungen möglich<sup>4</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebespezifischer als ESZ</li> <li>• Können nur eine bestimmte Anzahl von Progenitorzellspezies bilden<sup>4</sup></li> <li>• Nutzung ethisch kontrovers diskutiert, da aus fetalem Gewebe gewonnen</li> </ul>
ASZ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autologe Stammzelltransplantation möglich</li> <li>• Keine ethische Bedenklichkeit<sup>5</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitierte Differenzierungs- und Proliferationsmöglichkeit<sup>5</sup></li> </ul>

<sup>1</sup> THOMSON 1998; <sup>2</sup> ERDÖ et al. 2003; <sup>3</sup> JUENGST und FOSSEL 2000; <sup>4</sup> MIMEAULT und BATRA 2006; <sup>5</sup> NAM et al. 2015; ASZ = adulte Stammzellen; ESZ = embryonale Stammzellen; FSZ = fetale Stammzellen; i.v. = intravenös

Auf Basis dieser groben Einteilung in die drei oben genannten Stammzellarten lassen sich kommerziell hergestellte Stammzellprodukte verschiedener Differenzierungsstadien ableiten, die ebenfalls experimentell oder sogar bereits therapeutisch eingesetzt werden. So konnten beispielsweise aus adulten somatischen Zellen durch Reprogrammierung mittels verschiedener Transkriptionsfaktoren induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ) hergestellt werden. Diese besitzen ähnliche Eigenschaften wie ESZ und haben den großen Vorteil, dass sie autolog eingesetzt werden können. Dies bedeutet, dass von einem Patienten entnommene somatische Zellen, z.B. Fibroblasten, zu iPSZ reprogrammiert und anschließend demselben Patienten transplantiert werden können. So konnten iPSZ bereits erfolgreich in Modellen des Morbus Alzheimer und Parkinson oder in Schlaganfallmodellen an der Ratte eingesetzt werden (CHAU et al. 2014, TATARISHVILI et al. 2014). Ein weiteres Stammzellprodukt, entwickelt an der Stanford University, sind fetale humane neurale Progenitorzellen (fhNPZ), die aus fetalem Hirngewebe gewonnen wurden. Diese Zelllinie wurde bereits erfolgreich in zahlreichen Kleintiermodellen des ischämischen Schlaganfalls und in Tiermodellen des Morbus Parkinson und der Huntington'schen Erkrankung angewendet (KELLY et al. 2004). Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Einführung eines zelltherapeutischen Ansatzes in die klinische Anwendung ist dessen Sicherheit. In Tabelle 2 sind wichtige Vorteile, sowie sicherheitsrelevante Eigenschaften von diesen zwei vielversprechenden Zellpopulationen, aufgeführt.

**Tabelle 2: Vor- und Nachteile kommerzieller Stammzellprodukte**

Art der Stammzellen	Vorteile	Nachteile
<b>iPSZ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ethisch unbedenkliche Gewinnung</li> <li>Geringes Risiko der Immunreaktion, da autologe Transplantation möglich</li> <li>Reduziert den Einsatz von Medikamenten und Kosten für deren Neuentwicklung, sowie Tierversuche<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Einsatz von Retro- oder Lentiviren für Reprogrammierung</li> <li>Komplexer Herstellungsprozess</li> <li>Vorzeitige Zellalterung</li> <li>Hohe Apoptoserate</li> <li>Risiko der Tumorentwicklung<sup>1</sup></li> </ul>
<b>fhNPZ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Erfolgreiche Kleintiermodelle beim ischämischen Schlaganfall und anderen neurologischen Erkrankungen vorhanden<sup>2</sup></li> <li>Sehr wahrscheinlich sichere Anwendung möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ethisch bedenklich, da ursprünglich aus Feten gewonnen</li> </ul>

<sup>1</sup> SINGH et al. 2015; <sup>2</sup> KELLY et al. 2004; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; iPSZ = induzierte pluripotente Stammzellen

Die Anwendung von fhNPZ konnte bereits sicher und therapeutisch erfolgreich im Kleintiermodell angewendet werden (BLISS et al. 2006). Dennoch bleibt die Frage nach einer sicheren und therapeutisch wirksamen Anwendung dieser Zellpopulation im menschlichen Gehirn bestehen.

## 2.2 Tierexperimentelle Stammzelltherapie beim Schlaganfall

### 2.2.1 Hintergrund der translationalen Forschung am Tiermodell

Tiermodelle sind für *In-vivo*-Studien neuer Zelltherapieansätze unerlässlich und inzwischen sind insbesondere im Gebiet der Schlaganfallforschung viele Modelle bekannt (s. Tabelle 52 im Anhang). Sie geben einen Aufschluss über Effektivität und mögliche Risiken einer therapeutischen Anwendung. Um jedoch validierbare und reproduzierbare Daten in einem Tierversuch zu erheben ist es wichtig, allgemeine Kriterien der guten wissenschaftlichen Praxis einzuhalten.

Im Jahr 1999 wurde eine Expertenkommission (*stroke therapy academic industry roundtable* [STAIR]) gegründet, die sich mit spezifischen Empfehlungen bezüglich der Versuchsplanung, Versuchsdurchführung und der anschließenden Auswertung von präklinischen Studien zu zerebralen Ischämien beschäftigte (s. Tabelle 3). Inzwischen beinhaltet diese Expertenkommission auch Empfehlungen zur Umsetzung klinischer Studien (SAVER et al. 2009). Ziel dieser Kommission ist es, durch einheitliche Bedingungen von tierexperimentellen und klinischen Studien validierbare und vergleichbare Daten zu erheben, und somit neue diagnostische und therapeutische Verfahren zu entwickeln. Dies führt zu einer erheblich vergrößerten Sicherheit bei der Durchführung klinischer Studien (FISHER et al. 2009).

Eine weitere Expertenkommission (*stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke* [STEPS]) wurde im Jahr 2007 in Leben gerufen. Sie beschäftigt sich mit Studien zu zelltherapeutischen Ansätzen nach einem Schlaganfall. Ziel von STEPS ist es, ergänzend zu STAIR, Empfehlungen für die Durchführung von Stammzellapplikationen am Tier und für die Translation von in Tiermodellen erhobener Erkenntnisse auf klinische Studien auszusprechen (SAVITZ et al. 2011) (vgl. Tabelle 3).

Kleintiere unterscheiden sich in ihrem Stoffwechsel und den anatomischen Verhältnissen von dem Menschen. Daher sind für die Translation eines zelltherapeutischen Ansatzes vom Kleintier auf den Menschen Studien an Großtieren mit ähnlicheren stoffwechseltechnischen und anatomischen Verhältnissen (gyrenzephales Gehirn) notwendig (SAVITZ et al. 2011). Eine Translation auf den Menschen sollte erst nach einer Testung der zelltherapeutischen Anwendung in mehreren Modellen eines fokalen ischämischen Schlaganfalls, und zuvor in zwei Spezies und in unterschiedlichen wissenschaftlichen Einrichtungen, durchgeführt werden (BORLONGAN et al. 2008).

**Tabelle 3: Empfehlungen der Expertenkommissionen STAIR und STEPS**

STAIR (FISHER et al. 2009)	STEPS (SAVITZ et al. 2011)
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dosis-Wirkungskurve neuer Medikamente validieren</li> <li>2. Therapeutisches Fenster eruieren, da dies von Modell zu Modell variieren kann (auch zwischen Mensch und Tier)</li> <li>3. Mehrere Endpunkte definieren und beurteilen</li> <li>4. Überwachung der physiologischen Parameter wie Blutdruck, Körpertemperatur, usw.</li> <li>5. Modelle an verschiedenen Spezies validieren (Initial Testung an Ratten/Kaninchen, danach Spezies mit gyrenzephalem Gehirn nutzen)</li> <li>6. Reproduzierbarkeit der Daten: Positive Ergebnisse sollten in einem unabhängigen Labor wiederholt werden können, bevor klinische Studien begonnen werden</li> <li>7. Versuchsplanung: Welche Gruppengröße ist für eine statistische Auswertung notwendig? Randomisieren, Gruppenmerkmale (gesunde/krank, junge/alte, männlich/weibliche Tiere)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Übersicht über Möglichkeiten der Stammzellapplikation und ihre jeweiligen Vor- und Nachteile</li> <li>2. Dosierung der applizierten Stammzellen</li> <li>3. Planung und Ausführung der experimentellen Eruierung einer spezifischen Zelltherapie im Schlaganfall</li> <li>4. Nutzung von verschiedenen Versuchstierspezies: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Versuche am Klein- und Großtier notwendig (Rattenmodelle gut etabliert, jedoch Großtiermodelle wichtig für spezifischen Einfluss der Therapie bei ähnlichen anatomischen Verhältnissen im Vergleich zum Menschen)</li> <li>• Versuche an männlichen und weiblichen Tieren</li> <li>• Versuche an verschiedenen Krankheitsmodellen (z.B. Bluthochdruck, Diabetes)</li> </ul> </li> </ol>

STAIR = *stroke therapy academic industry roundtable*; STEPS = *stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke*

### 2.2.2 Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie

Im Zuge der Erforschung der fokalen zerebralen Ischämie beim Menschen werden seit den 70er Jahren Tiermodelle zur experimentellen Darstellung der pathologischen Gegebenheiten entwickelt (ROBINSON et al. 1975).

Da der Verschluss der mittleren Zerebralarterie (*middle cerebral artery occlusion* [MCAO]) die übliche Ursache eines Schlaganfalls beim Menschen darstellt, orientieren sich die Tiermodelle an der möglichst naturgetreuen Rekonstruktion dieses Szenarios (LONGA et al. 1989).

Die Methoden unterscheiden sich hierbei vor allem in ihrer Invasivität, z.B. in ihrer Notwendigkeit zur Eröffnung der Schädeldecke, und darin, ob die MCAO permanent oder transient durchgeführt wird. In Tabelle 4 sind die am häufigsten eingesetzten Methoden zur Durchführung einer MCAO und die jeweils etablierten Tiermodelle aufgeführt.

**Tabelle 4: Übersicht zu Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie (CANAZZA et al. 2014)**

Modell	Vorgehensweise	Okklusion	Tierspezies	Literatur
<b>Koagulation/ Ligatur</b>	Koagulation/Ligation der MCA oder Einsetzen eines Clips unter Eröffnung der Schädeldecke	permanent/ transient	Maus	GOTTI et al. 1990
			Ratte	TAMURA et al. 1981
			Schwein	IMAI et al. 2006
			Schaf	BOLTZE et al. 2008
<b>Endothelin-1</b>	MCAO durch Applikation von Endothelin-1 (Vasokonstriktor) in oder in die Nähe der MCA	transient	Ratte	SHARKEY et al. 1993
<b>distale MCAO</b>	Kompression oder Okklusion der distalen MCA	permanent/ transient	Maus	MORANCHO et al. 2012
<b>Fadenmodell</b>	Einführen eines chirurgischen Fadens in die interne <i>A. carotis</i> führt zur MCAO	permanent/ transient	Maus	KAMII et al. 1994
			Ratte	LONGA et al. 1989
<b>Thrombo- embolisches Modell</b>	Embolisation autologer Blutgerinnsel in die MCA	permanent/ transient	Maus	ZHANG et al. 1997
			Ratte	KUDO et al. 1982, TAKANO et al. 1998
			Hund	HILL et al. 1955, KANG et al. 2007
			Schwein	GRALLA et al. 2006
			NHP	KITO et al. 2001

MCA = mittlere Zerebralarterie; MCAO = Okklusion der mittleren Zerebralarterie; NHP = *non-human primate*

### 2.2.3 Das Schaf als Großtiermodell

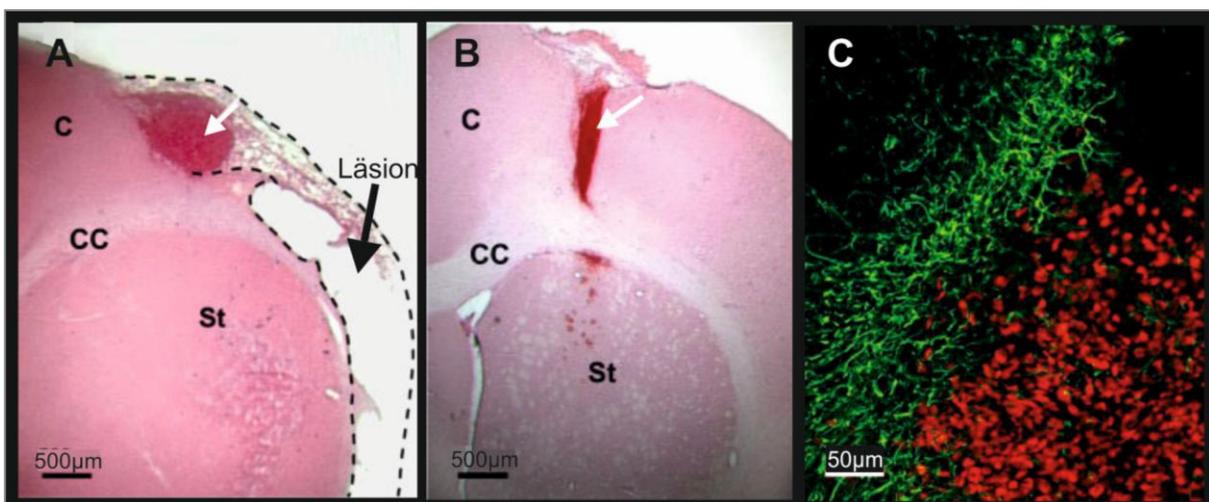
Ein wichtiger Aspekt der angewendeten Tiermodelle zur fokalen zerebralen Ischämie besteht darin, dass ein Großteil der Untersuchungen am Kleintier, insbesondere an der Ratte, durchgeführt werden (HOWELLS et al. 2010). Dies bedeutet nach der Auffassung von STAIR und STEPS jedoch, dass in der translationalen Schlaganfallforschung zusätzlich auch Großtiermodelle eingesetzt werden sollten. Bei der Wahl des geeigneten Großtiermodells sollten vor allem die anatomischen und physiologischen Besonderheiten der jeweiligen Tierart beachtet werden.

Im Fall der vorliegenden Dissertation wurde als Großtiermodell ein bereits etabliertes Schafmodell eingesetzt (BOLTZE et al. 2008). Schafe besitzen ein gyrenzephales Gehirn mit Einfaltungen an der Hirnoberfläche zur Oberflächenvergrößerung, ähnlich dem des Menschen und unterscheiden sich hierbei erheblich von den anatomischen Hirnstrukturen von Ratten und Mäusen (lissencephales Gehirn mit glatter Oberfläche) (FERRER et al. 1986a, FERRER et al. 1986b). Im Vergleich zu anderen gängigen Großtiermodellen wie beispielsweise dem Hundemodell (KANG et al. 2007) sind die

Anschaffungs- und Haltungskosten von Schafen deutlich günstiger. Weitere große Vorteile sind deren anspruchslose Haltung und unproblematische tägliche Betreuung.

#### 2.2.4 Transplantation fhNPZ als zelltherapeutischer Ansatz nach fokaler zerebraler Ischämie

Die Stanford University forschte in den vergangenen Jahren intensiv an dem therapeutischen Einsatz von fhNPZ nach einer fokalen zerebralen Ischämie. Es wurden bereits zahlreiche Versuche an Rattenmodellen zur Validierung des therapeutischen Nutzens der fhNPZ nach einem Schlaganfall durchgeführt (ANDRES et al. 2011, BLISS et al. 2006, GUZMAN et al. 2007, KELLY et al. 2004). Hierbei konnten 4 Wochen nach Transplantation vitale fhNPZ, sowohl im durch eine fokale zerebrale Ischämie geschädigten, als auch im gesunden Rattenhirn nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2). Die transplantierten Zellen differenzierten zu Neuronen, die jedoch 4 Wochen nach Transplantation noch keine funktionelle Reife erreicht hatten. In einem durchgeführten Verhaltenstests konnte eine signifikante Verbesserung der Motorik bei den transplantierten Ratten im Vergleich zu den Ratten, die nach Schlaganfall keine fhNPZ erhielten, nachgewiesen werden (BLISS et al. 2006).



**Abbildung 2: Darstellung lebender fhNPZ im Rattenhirn 4 Wochen nach Transplantation (BLISS et al. 2006)**

**A:** Robustes Überleben der transplantierten fhNPZ (weißer Pfeil) in der Umgebung der Ischämie (Läsion). **B:** Robustes Überleben der transplantierten fhNPZ (weißer Pfeil) in einem gesunden Rattenhirn. **C:** Transplantierte fhNPZ (rot, markiert mit einem humanen Zellkernmarker) neben GFAP-positiven Gliazellen (grün). C = Kortex, CC = Corpus callosum; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; St = Striatum

Mittels einer Kooperation zwischen der Stanford University und dem Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Leipzig soll die Validierung des therapeutischen Nutzens dieser fhNPZ in einem Großtiermodell erfolgen. Hierbei liegt der Fokus vor allem auf der Entwicklung eines zukünftigen Stammzellprodukts zum therapeutischen Einsatz nach Schlaganfall in der Humanmedizin. Durch eine erfolgreiche Validierung dieses zelltherapeutischen Ansatzes in einem Großtiermodell können laut den Expertenkommissionen STAIR (FISHER et al. 2009) und STEPS (SAVITZ et al.

2011) wichtige Voraussetzungen für dessen Translation in die klinische Anwendung erfüllt werden. Für die erfolgreiche xenogene Transplantation der fhNPZ in das Schafhirn nach einem Schlaganfall sind grundlegende Voruntersuchungen am gesunden Schafhirn notwendig, mit denen sich die vorliegende Arbeit ausführlich beschäftigt:

1. Die Sicherheit und therapeutische Wirksamkeit der transplantierten fhNPZ sollte *in vivo* über neurologische Untersuchungen, sowie *ex vivo* durch histologische Untersuchungen der Schafhirne untersucht werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hierbei vor allem mit Untersuchungen zur Sicherheit der transplantierten fhNPZ, da die therapeutische Wirksamkeit vordergründig in weiterführenden Versuchen am geschädigten Schafhirn untersucht werden muss.
2. Die Validierung einer geeigneten Methode zur Überwachung des Transplantatüberlebens *in vivo* erlaubt eine fortwährende Kontrolle des Transplantationserfolges im Versuchsverlauf (vgl. Kap. 2.2.4.1).
3. Zur Sicherung des Transplantatüberlebens ist die Validierung eines geeigneten und verträglichen immunsuppressiven Protokolls nach xenogener Transplantation von fhNPZ in das Schafhirn unerlässlich (vgl. Kap. 2.3).

#### **2.2.4.1 Die *In-vivo*-Überwachung von in Schafhirne transplantierten fhNPZ**

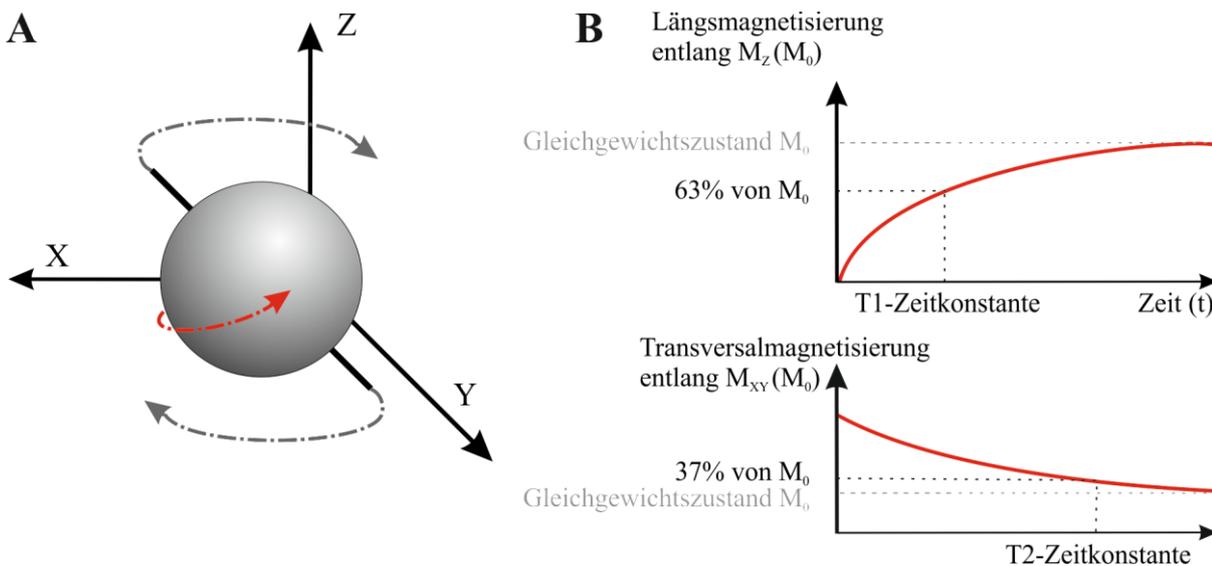
In der Klinik und tierexperimentellen Forschung ist es unerlässlich den Verlauf angewandeter Therapien oder deren Ansätze überwachen zu können. Gerade nach Transplantationen muss eine Kontrolle des Transplantatüberlebens und dessen Entwicklung gewährleistet werden.

Grundsätzlich kann dies über verschiedene Ansätze geschehen. Beispielsweise kann die Möglichkeit einer neurologischen Regeneration durch Stammzelltransplantation nach einem Schlaganfall durch sich verbessernde motorische und kognitive Fähigkeiten nachvollzogen werden (BLISS et al. 2006). Einen weiteren für die wissenschaftliche Arbeit sehr wichtigen Ansatz bieten bildgebende Verfahren. Sie können einen direkten Einblick in das Verhalten und Überleben transplantierte Stammzellen geben. Eine validierte Methode bei Kleintiermodellen ist hierbei die *In-vivo*-Überwachung von Stammzelltransplantaten via hochauflösenden MRT (Magnetresonanztomografie)-Aufnahmen (GILAD et al. 2008, GUZMAN et al. 2007, HOEHN et al. 2002).

In der Magnetresonanztomografie wird für die Darstellung unterschiedlicher Gewebe der Drehimpuls von Wasserstoffprotonen genutzt, und deren Eigenschaft sich entlang eines Magnetfeldes auszurichten. Durch Hochfrequenzimpulse kann die ursprüngliche Ausrichtung der Protonen (entlang  $M_Z$ -Ebene, entspricht der Längsmagnetisierung) um  $90^\circ$  (entlang der  $M_{XY}$ -Ebene, entspricht der Transversalmagnetisierung) verändert werden (s. Abbildung 3 A). Diese Auslenkung ist elektrisch als Wechselspannung in einer Empfangsspule messbar und kann zu einem Bildsignal verarbeitet werden. Die Wasserstoffprotonen richten sich nach einer gewissen Zeit ( $t$ ) wieder in die Längsrichtung ( $M_Z$ ) aus; man spricht von einer longitudinalen Relaxation. Eine wichtige Größe hierbei ist die Zeitkonstante  $T_1$ , die von der angelegten Feldstärke und dem Gewebetyp abhängt. Je stärker das

Magnetfeld ist, desto genauer kann unterschiedliches Gewebe durch die verschiedene Wasserstoffprotonendichte dargestellt werden (KÖCHLI et al. 2009).

T1-gewichtete MRT-Aufnahmen wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund ihres guten Ortsauflösungsvermögens für anatomische Analysen in Vorbereitung auf die stereotaktische Zelltransplantation angefertigt. Um die fhNPZ *in vivo* von normalem Hirngewebe differenzieren zu können, wurden diese vor der Transplantation markiert. Als Marker werden vor allem Eisenoxidnanopartikel unterschiedlicher Partikelgröße eingesetzt, da sie einen sehr guten Kontrast zum normalen Hirngewebe bilden. Sie werden in der Klinik häufig als Kontrastmittel, beispielsweise in der Tumordiagnostik oder Angiographie, angewendet (SCHMITZ et al. 2000, SIGAL et al. 2002). Der entstehende Bildkontrast zwischen Gewebe und Kontrastmittel wird durch die transversale Relaxationszeit T2 [ms] bestimmt. Die Relaxationszeit T2 beschreibt in der Kernspinresonanz (NMR) die Zeit, die ein Teilchen nach Auslenkung der Kernspinmagnetisierung benötigt, um wieder in seinen Gleichgewichtszustand zu gelangen, bzw. bis dessen Magnetisierung nach Anregung um 63% zerfallen ist (vgl. Abbildung 3 B).



**Abbildung 3: Bestimmung der T1- und T2-Zeitkonstanten**

**A:** Darstellung des Eigendrehimpulses eines Wasserstoffprotons (rot) und dessen Bewegungen entlang der  $M_Z$ - und der  $M_{XY}$ -Ebene (grau). **B:** Darstellung der Messung sowohl der T1- als auch der T2-Zeitkonstante, modifiziert nach RIDGWAY (2010).  $M_0$  entspricht der longitudinalen Magnetisierung zum Zeitpunkt  $t$ ,  $M_Z$  entspricht der Längsmagnetisierung entlang der  $M_Z$ -Ebene,  $M_{XY}$  entspricht der Transversalmagnetisierung entlang der  $M_{XY}$ -Ebene. Die Abbildung A wurde dem Internet entnommen (Bildquelle: <http://www.wikiwand.com/de/Magnetresonanztomographie>) und modifiziert.

T2-gewichtete Sequenzen erlauben eine sehr gute Kontrastdarstellung im Gewebe. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit zur *In-vivo*-Überwachung der transplantierten eisenmarkierten fhNPZ eine T2-gewichtete SWI (suszeptibilitätsgewichtete Sequenz)-Sequenz verwendet.

SWI-Sequenzen erlangten in den vergangenen Jahren essentielle Bedeutung bei der klinischen und experimentellen Untersuchung von Gehirnen. Die physikalische Grundlage liegt in ihrer Fähigkeit, die

magnetischen Suszeptibilitätsunterschiede zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin im Blutsystem zu messen (REICHENBACH und HAACKE 2001). Somit ist eine exakte Darstellung von venösen und arteriellen Blutgefäßen im Gehirn möglich, die sowohl eine genaue Diagnose bei einer fokalen zerebralen Ischämie, als auch eine Darstellung eisenmarkierter Stammzelltransplantate erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurden Eisenoxidnanopartikel mit einem Durchmesser von 5 nm, sogenannte *very small superparamagnetic iron oxide particles* (VSOP) eingesetzt. Die Anwendung dieser Nanopartikel zum Nachweis eisenmarkierter Stammzellen im Schafhirn wurde zuvor am Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig in einem ovinen Modell bei der Transplantation allogener MSZ (mesenchymalen Stammzellen) validiert (DREYER 2012). Ein wichtiger Fokus lag hierbei auf der Minimierung negativer Einflüsse der Markierung auf das oxidative Stresslevel der Stammzellen, wodurch eine gute Zellvitalität und Zellproliferation erreicht werden konnte. Vorausgegangene Studien an humanen neuronalen PZ konnten bereits zeigen, dass VSOP-markierten Stammzellen (0,5/1,5/3,0 mM) ähnliche Vitalitäten und unveränderte Zellzyklen im Vergleich zu unmarkierten Kontrollzellen aufwiesen (FOCKE et al. 2008). Um diese Voraussetzungen gewährleisten zu können, müssen die optimal verträglichen Eisenkonzentrationen bei der jeweilig angewendeten Stammzelllinie vor Versuchsbeginn jedoch zunächst individuell validiert werden (STROH et al. 2009).

#### **2.2.4.2 Der immunhistochemische Nachweis vitaler humaner Zellen *ex vivo* im Schafhirn**

Ein essentieller Bestandteil dieser tierexperimentellen Transplantationsstudie lag in einer sicheren Nachweismethode vitaler transplantierte fhNPZ im Schafhirn *ex vivo* zur Kontrolle des Transplantationserfolges.

Der monoklonale murine STEM101-Antikörper bindet laut Herstellerangaben (ANON. 2014) spezifisch an das Ku-80-Protein, welches als Antigen spezifisch im humanen Zellkern lokalisiert ist. Hierbei ist eine Zelldetektion verschiedenster humaner Zellgewebe, inklusive Hirngewebe, möglich. Eine Kreuzreaktivität mit Hirngewebe von Maus und Ratte kommt dabei nicht vor. Die Effektivität dieses Antikörpers zum Nachweis vitaler transplantierte humaner Zellen in Mäuse- und Rattenhirnen wurde bereits nachgewiesen (GUZMAN et al. 2007, TAMAKI et al. 2009). In beiden Studien wurde zum Nachweis der vitalen Stammzellen der Primärantikörper STEM101 mit einem Sekundärantikörper markiert, gefolgt von einem Peroxidase-umsetzenden Chromogen zur Sichtbarmachung humaner Zellkerne durch braune Niederschläge. Eine Quantifizierung vitaler humaner Zellen war somit möglich (GUZMAN et al. 2007). Zum Nachweis von Peroxidase-Aktivität wird standardmäßig in der Immunhistochemie und der pathologischen Diagnostik das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) eingesetzt (RIMM 2006).

Dahingegen ist bisher nichts zum Nachweis transplantierte humaner Stammzellen im Schafhirn bekannt. Aus diesem Grund erwies sich die Wahl der Nachweismethode als schwierig und es musste auf Daten aus validierten Kleintiermodellen zurückgegriffen werden. Demzufolge wurde in der vorliegenden Arbeit eine immunhistochemische *Ex-vivo*-Nachweismethode von humanen Zellkernen durch den Antikörper STEM101 und das Chromogen DAB angewendet.

## 2.3 Immunsuppression nach der Transplantation von Stammzellen

### 2.3.1 Wirkmechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems

Das Immunsystem (IS) lässt sich in das angeborene, nicht-adaptive und das erworbene, adaptive IS einteilen. Das angeborene IS erkennt spezielle, weit verbreitete molekulare Strukturen auf Pathogenoberflächen und kann diese durch lösliche Faktoren (Interferone, antibakterielle Peptide, Komplementsystem) oder zellvermittelt (natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen) eliminieren. Dabei reagiert das angeborene IS sehr schnell, aber auf immer dieselbe Art und Weise - es besitzt keine adaptiven Fähigkeiten. Das erworbene IS hingegen antwortet verzögert auf ein Antigen, kann sich jedoch neu auftretenden Pathogenen anpassen und diese zielgerichtet eliminieren. Es besteht, wie das angeborene IS, aus löslichen Faktoren. Diese setzen sich aus den von B-Lymphozyten produzierten Immunglobulinen, den Antikörpern, und den zellvermittelten Strukturen, den T-Lymphozyten, zusammen.

Lymphozyten entstehen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und werden durch Pathogenkontakt mit Hilfe von dendritischen Zellen aktiviert. Antikörper binden ein Antigen auf einer Pathogenoberfläche und führen letztlich zur Lyse dieses Pathogens. T-Lymphozyten lassen sich in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterteilen. Während die T-Helferzellen das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, welches den MHC (*major histocompatibility complex*)-II-Rezeptor bindet, weisen zytotoxische T-Zellen das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche auf, das seinerseits an den MHC-I-Rezeptor bindet. MHC-I-Rezeptoren kommen auf allen somatischen Zellen des Körpers vor und präsentieren Proteinfragmente des eigenen Stoffwechsels. Durch die Präsentation von Antigenen wie beispielsweise Virus-Proteinen, können zytotoxische Zellen an die somatische Zelle binden und die Zelllyse einleiten. MHC-II-Rezeptoren kommen nur auf antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten) vor. Auf ihnen werden die Antigene phagozytierter Pathogene präsentiert. Die T-Helferzellen können nun eine Eliminierung des Pathogens durch die Aktivierung einer Entzündungsreaktion einleiten (ENGELHARDT und AHRENS 2005).

### 2.3.2 Immunantwort nach Transplantation

Bei der Transplantation nicht-autologer (körperfremder) Zellen wird das Immunsystem durch das Vorhandensein von Allo- oder Xenoantigenen (allogen: von einem anderen Individuum derselben Spezies; xenogen: von einem anderen Individuum einer anderen Spezies) aktiviert. Hauptverantwortlich für die Abstoßungsreaktion ist eine T-Zell-vermittelte Reaktion. T-Zellen erkennen allogene oder xenogene MHC-Moleküle auf transplantierten Geweben oder Zellen und lösen daraufhin eine Abstoßungsreaktion aus. Diese Abstoßungsreaktionen können akut (innerhalb von Tagen) oder chronisch (innerhalb von Monaten bis Jahren) erfolgen. Eine chronische Abstoßung wird jedoch nicht nur durch die Allo- oder Xenoreaktivität der T-Zellen, sondern auch durch andere

Faktoren wie z.B. Reperfusionsschäden<sup>1</sup> nach Ischämie zum Zeitpunkt der Transplantation oder chronische Cyclosporin A (CsA)-Toxizität beeinflusst. Ein sehr geringes Abstoßungspotential weisen fetale Zellen auf. Sie lösen nach Transplantation selten immunologische Reaktionen aus. Die Ursache hierfür ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Es wird diskutiert, dass fetale Zellen eine lokale immunsuppressive Wirkung besitzen und eine T-Zell-Toleranz gegenüber MHC-Alloantigenen induzieren können. Eine weitere Besonderheit im Organismus bilden immunprivilegierte Regionen, wie z.B. das Gehirn oder die vordere Augenkammer. Dort werden ebenfalls nur verzögerte oder gar keine Abstoßungsreaktionen nach Transplantation von fremden Geweben oder Zellen induziert. Antigene aus einer immunprivilegierten Region führen zur einer Toleranz oder einer nicht das Gewebe zerstörenden Reaktion. Verantwortlich hierfür ist beispielsweise das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  (transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ ), das gemeinsam mit Antigenen die immunprivilegierte Region verlässt. Zudem verhindert z.B. die Blut-Hirn-Schranke einen Übertritt von naiven Lymphozyten in das Hirngewebe. Mit Ausnahme dieser immunprivilegierten Regionen im Körper besteht in der Transplantationsmedizin ein großes Problem von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation, vor allem auch, da beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke nach einer fokalen zerebralen Ischämie nicht mehr intakt ist. Eine erfolgreiche Prävention akuter oder chronischer Abstoßungsreaktionen ist momentan nur durch eine hinreichende Immunsuppression möglich.

Der heutige Erfolg in der Transplantationsmedizin ist vor allem der verbesserten immunsuppressiven Therapie zu verdanken, da eine 100%ige Übereinstimmung von MHC-Molekülen und anderen Allo- bzw. Xenoantigenen zwischen den Spendern praktisch nicht zu realisieren ist (JANEWAY 2002). Es existiert inzwischen eine große Bandbreite immunsuppressiv oder immunmodulatorisch wirksamer Substanzen, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden. Hierbei gibt es zahlreiche Protokolle immunsuppressiver Mono- oder Kombinationstherapien, in denen Immunsuppressiva oder immunmodulatorische Stoffe, wie beispielsweise Antikörper, allein oder in Kombination verabreicht werden. Die Wirksamkeit und Art der Anwendung dieser Medikamente variiert je nach angewandeter Tierart und Transplantationsart bzw. Transplantationsort. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Immunsuppressionsprotokoll in Hinblick auf dessen Eignung für eine intrazerebrale Xenotransplantation beim Schaf zu prüfen.

---

<sup>1</sup> Reperfusionsschäden beschreiben die Auswirkungen freier Sauerstoffradikale auf das Gewebe, die durch eine Ischämie (z.B. beim Transplantationsprozess oder hämorrhagischer Schock) entstehen und nach einer wiederhergestellten Durchblutung freigesetzt werden. Vor allem Nekrose und Entzündungsreaktionen können bei den betroffenen Organen auftreten und zu einer erhöhten Sterblichkeit nach Transplantationen führen (CURSIO et al. 2015).

### 2.3.3 Wirkstoffklassen von Immunsuppressiva

Immunsuppressiva lassen sich abhängig von ihrem Wirkmechanismus in verschiedene Wirkstoffklassen einteilen (s. Tabelle 5 und Abbildung 4).

Glukokortikoide werden oft wegen ihren breiten therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten eingesetzt. Sie besitzen einen unspezifischen antiinflammatorischen und antiallergenen Effekt (LATIF und MORRIS 2013) und werden bei Erkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis und Asthma, oder auch zur Immunsuppression nach Transplantation angewendet (LEE et al. 2013, VAN KOOTEN et al. 2009).

Zytostatika werden gemeinhin als Chemotherapeutikum zur Krebstherapie eingesetzt, besitzen jedoch neben ihrem zytotoxischen einen immunsuppressiven Effekt und können dementsprechend auch als Immunsuppressiva verwendet werden (DENEVE et al. 1989).

Der Wirkstoff Mycophenolat-Mofetil (MMF) besitzt eine zytostatische Wirkung, die vor allem die Lymphozyten-Proliferation beeinflusst (ALLISON und EUGUI 1993).

Immunophilin, wie die Wirkstoffe CsA und Tacrolimus (Tcr), wirken über eine Inhibition von Calcineurin und werden standardmäßig bei Stammzell- und Organtransplantationen zur Prävention von Abstoßungsreaktionen verabreicht (DUNCAN und CRADDOCK 2006, SCOTT et al. 2003).

**Tabelle 5: Einteilung von Immunsuppressiva in Wirkstoffklassen**

Wirkstoffklasse	Wirkstoffbeispiel	Wirkmechanismus
<b>Glukokortikoide</b>	Dexamethason Prednisolon	Komplexbildung durch Bindung an intrazellulären Rezeptor, Translokation des Komplexes in den Zellkern und Modulation der Transkription <sup>1</sup>
	Cyclophosphamid	Zytotoxisch durch Metabolisierung zu 4-Hydroxycyclophosphamid, welches an Aldophosphamid bindet und in den Zellkern transloziert <sup>2</sup>
<b>Zytostatika</b>	Methotrexat	Hemmung der Purinsynthese durch Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase <sup>3</sup>
	<b>Mycophenolat-Mofetil</b>	Hemmung der Purinsynthese durch Inhibition der Iosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase <sup>4</sup>
<b>Immunophilin</b>	Cyclosporin A	Hemmung der T-Zellproliferation durch Inhibition von Calcineurin <sup>5</sup>
	Tacrolimus	Hemmung der T-Zellproliferation durch Bindung an das intrazelluläre <i>FK-bindig protein</i> und Inhibition von Calcineurin <sup>6</sup>
	Rapamycin	Komplexbildung durch Bindung an intrazelluläres <i>protein FK506</i> , Herabsetzen der Zellproliferation durch Inhibition von mTOR <sup>7</sup>

<sup>1</sup> BAXTER und TOMKINS 1971; <sup>2</sup> CONNORS et al. 1974; <sup>3</sup> BERTINO 1993; <sup>4</sup> ALLISON und EUGUI 1993, FRANKLIN und COOK 1969; <sup>5</sup> HALLORAN et al. 1999; <sup>6</sup> ALOMAR et al. 2004, SCHREIBER und CRABTREE 1992; <sup>7</sup> ABRAHAM und GIBBONS 2007; mTOR = *mechanistic target of rapamycin*



### 2.3.4 Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein lipophiles Molekül, welches aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wird (ANJUM et al. 2012) und aufgrund seiner Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (BEGLEY et al. 1990, TSUJI et al. 1993). Seit dem Jahr 1978 wird CsA in der klinischen Praxis eingesetzt (CALNE et al. 1978) und ist das am häufigsten verwendete Medikament zur Immunsuppression nach Transplantationen, insbesondere nach allogenen Stammzelltransplantationen (DUNCAN und CRADDOCK 2006).

#### 2.3.4.1 Wirkmechanismus von Cyclosporin A

CsA ist ein Calcineurin-Inhibitor, der zu einer reversiblen Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation führt (HALLORAN et al. 1999). Es bildet durch die Bindung an das intrazelluläre Immunophilin einen Komplex. Dieser heftet sich an Calcineurin und verhindert die Aktivierung des *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (s. Abbildung 4). NFAT ist als ein wichtiger Faktor für die Regulierung der Transkription vieler proinflammatorischer Zytokine, z.B. der Interleukine (IL)-2, -3, -4, -5, -8, -13, sowie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verantwortlich (KIANI et al. 2000). Dabei spielt vor allem die Inhibition von IL-2 eine große Rolle, da dieses Interleukin entscheidend zur T-Zell-Aktivierung beiträgt (TAKAORI et al. 1992). Einige Studien konnten ähnliche Mechanismen der Inhibition von IL-2 und der T-Zell-Aktivierung durch CsA bei Mensch und Hund feststellen (PAYNE et al. 1986, TAKAORI et al. 1992). Zudem wird über eine neuroprotektive Wirkung von CsA berichtet (WENNBERG et al. 2001). Dies gilt sowohl für die Behandlung von neurologischen Erkrankungen, als auch bei therapeutischen Anwendungen wie beispielsweise der Administration neuraler Stammzellen ins Gehirn. CsA führt zu einem Anstieg der Zellproliferation und des Zellüberlebens von neuronalen Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* und wird deshalb häufig in neurologischen Studien eingesetzt (HUNT et al. 2010).

#### 2.3.4.2 Pharmakokinetik und Metabolisierung von Cyclosporin A

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von CsA ähneln beim Schaf denen des Menschen. CHARLES et al. (1993) berichtet beim Schaf von einer mittleren Clearance von  $0,45 \pm 0,05$  l/h/kg, einem Verteilungsvolumen von  $4,4 \pm 2,0$  l/kg und einer terminalen Halbwertszeit von  $12,1 \pm 3,1$  h nach intravenöser, sowie von 7,5 – 13,4 h nach oraler (abosomaler) Applikation. Die Metabolisierung von CsA findet in der Leber durch das Cytochrom P450 3A4 (CYP) statt. CYP-Inhibitoren wie beispielsweise Ketoconazol führen durch eine kompetitive Verdrängung zu einer verlangsamten Metabolisierung und daher zu verlängerten CsA-Wirkspiegeln (PICHARD et al. 1990a, PICHARD et al. 1990b). Ebenso können Induktoren von CYP, wie zum Beispiel Phenytoin und Diltiazem, zu einem bis zu 50% erniedrigtem CsA-Blutspiegel im Vergleich zu einer alleinigen Applikation von CsA führen (FREEMAN et al. 1984).

### **2.3.4.3 Applikation und Dosierung von Cyclosporin A**

Die Applikation von CsA kann intravenös (i.v.), oral (p.o.) oder topisch erfolgen.

Studien am Menschen zur oralen Bioverfügbarkeit von CsA zeigten interindividuelle Unterschiede bezüglich der Absorption von CsA im Gastrointestinaltrakt (KAHAN 2004). Diese Eigenschaft von CsA zeigte sich auch bei der Anwendung am Schaf. Die abomasale Applikation von CsA führte beim Schaf zu erheblichen interindividuellen pharmakodynamischen Unterschieden, vor allem bei der Applikation niedriger Dosierungen (CHARLES et al. 1993). In der experimentellen Forschung am Großtier (Schaf, Schwein) wird deshalb die intravenöse Applikation von CsA präferiert (ROSE et al. 2001, ROSENGARD et al. 1992). Im vorliegenden Versuch orientierte sich die Dosierung von 3 mg/kg 2x tägl. und das Applikationsintervall von 12 h am humanmedizinischen Standardprotokoll nach Stammzelltransplantationen (DUNCAN et al. 2010). Ein Immunsuppressionsprotokoll mit ähnlicher Dosierung (2 - 3 mg CsA/kg 2x tägl., 10 mg Ketoconazol/kg 2x tägl.) wurde bereits zuvor in einem ovinen Großtiermodell mit allo- und xenogener Hauttransplantation validiert (ROSE et al. 2001).

### **2.3.4.4 Nebenwirkungen und Toxizität von Cyclosporin A**

Die Anwendung von Immunsuppressiva in einem für eine Organ- oder Stammzelltransplantation benötigtem Maß geht immer mit Nebenwirkungen einher. Diese sind dabei oft eng mit der verabreichten Dosis assoziiert.

ROSE et al. (2001) beschreiben in ihrem ovinen Großtiermodell nach Hauttransplantation einen reversiblen Anstieg der Serum-Bilirubin-Konzentration nach 9 Wochen Behandlung mit CsA (2 - 3 mg/kg 2x tägl.). Zusätzlich erfolgte eine Reduktion der Albumin-Konzentration im Blut. Eine weitere Studie zeigte beim Schaf eine Abnahme der Kalium-Blutkonzentration bei einer Dosierung von 12 mg CsA/kg/d (WHITWORTH et al. 1987). Ebenfalls wird berichtet, dass CsA die Hämodynamik beeinflussen kann. Die CsA-Applikation führte zu Bluthochdruck, Tachykardie, einem Abfall des Herzindex, sowie zu einem erhöhten peripheren Widerstand (GREENBERG et al. 1985). WHITWORTH et al. 1987 konnten dies in ihrem Akutversuch (12 mg CsA/kg/d) am Schaf durch erhöhte Herzfrequenzen, erniedrigtes Herzminutenvolumen und Blutdruck belegen.

Eine weitere, sehr häufig beschriebene Nebenwirkung von CsA-Applikationen bei Mensch und Tier ist dessen Nephrotoxizität. Diese tritt vor allem in Abhängigkeit vom CsA-Blutspiegel auf, beispielsweise beim Menschen ab einer Dosierung von 5 mg CsA/kg/d p.o. (BACIGALUPO et al. 1984). Diese Nebenwirkungen treten nicht nur bei Nieren-, sondern auch bei anderen Transplantationen solider Organe auf (AHN et al. 2007). In einigen Untersuchungen führte die CsA-Applikation bis zur Flüssigkeitsretention in den Nieren (JOSS et al. 1982) oder Anurie (CRAVEDI et al. 2005). Toxizitätsstudien von WHITWORTH et al. (1987) am Schafsmodell konnten diesen negativen Einfluss von CsA auf die Nieren nicht bestätigen. Zwar sank die Kalium- und Natriumsekretion, der effektive Plasmafluss stieg jedoch an. Zudem wurde keine Veränderung in der glomerulären Filtrationsrate oder Aldosteron-Konzentration gemessen. Durch histologische

Untersuchungen konnten beim Schaf jedoch eine chronische renale Tubulonekrose nach CsA-Applikationen diagnostiziert werden (ROSE et al. 2001).

Zusätzlich wurden bei Mensch und Ratte von lebertoxischen Einflüssen wie Cholestase und induziertem Zellstress mit nachfolgender Schädigung der Hepatozyten durch CsA-Applikationen berichtet, die bis jetzt noch in keiner Studie am Schaf näher untersucht wurden (KIENHUIS et al. 2013, VAN SUMMEREN et al. 2013).

#### **2.3.4.5 Anwendung von Cyclosporin A in der tierexperimentellen Forschung**

Die standardmäßige Anwendung von CsA in der tierexperimentellen Forschung dient zum einen der Weiterentwicklung von Tiermodellen, beispielsweise Transplantationsmodellen (PAN et al. 2014). Diese führen zu einer Verbesserung humanmedizinischer Möglichkeiten und dienen damit dem Fortschritt des Gesundheitssystems. Zum anderen wird die Forschung im Bereich der Veterinärmedizin vorangetrieben, da auch hier immer komplexere Behandlungsmethoden wie beispielsweise Hauttransplantationen (HUNT et al. 2013) und langfristige immunsuppressive Therapien wie z.B. bei der atopischen Dermatitis oder anderen (Auto-) Immunerkrankungen (ARCHER et al. 2014) eingesetzt werden.

Die Entwicklung von Tiermodellen, die aussagekräftige Thesen für die humanmedizinische Anwendung produzieren sollen, erfordert Zwischenschritte bei der Übertragung von Kleintiermodellen auf den Menschen. Zum Beispiel besitzen Nager eine vielfach höhere Stoffwechselrate als der Mensch und benötigen daher verhältnismäßig deutlich höhere Medikamentendosierungen (SHARMA und MCNEILL 2009). Hier liegt die Notwendigkeit von Experimenten am Großtier als translationaler Zwischenschritt begründet, wie beispielsweise Transplantationsversuche am Schaf (ROSE et al. 2001). Dies muss unter der Voraussetzung geschehen, dass sich bestimmte Stoffwechselforgänge zwischen Mensch und Tier ähneln. Beim Schaf konnten beispielsweise dem Menschen ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften von CsA nachgewiesen werden (CHARLES et al. 1993). Die Datenlage zu CsA-Applikationen, die für eine erfolgreiche Transplantation als notwendig betrachtet wird, ist beim Schaf aber sehr limitiert. Insbesondere zu Stammzelltransplantationen ins Schafhirn existieren bisher keine Empfehlungen zu Immunsuppressionsregimen oder Dosierungsanwendungen von immunsupprimierenden Medikamenten. Hinsichtlich der Durchführung einer erfolgreichen Immunsuppression ist daher die weiterführende Exploration von Wirkungen, Nebenwirkungen und Toxizität einer CsA-Applikation nach Stammzelltransplantation ins Schafhirn notwendig.

## 2.4 Fragestellung und Versuchsziele der Dissertation

Anhand der erfolgten Literaturrecherche ergeben sich nun die Haupthypothesen dieser Arbeit:

- 1. Ein Nachweis eisenmarkierter fhNPZ *in vitro* via MRT-Aufnahmen als Voraussetzung für die *In-vivo*-Transplantationsstudie ist möglich.**
- 2. Die Langzeitgabe von dem Immunsuppressivum CsA besitzt einen Einfluss auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im immunprivilegierten Gehirn.**
- 3. Die Langzeitgabe von CsA mit verschiedenen Applikationsregimen über 64 Tage verursacht pathologische Veränderungen und klinische Symptome beim Schaf.**

Für die Beantwortung dieser Thesen müssen folgende Fragen geklärt werden:

1. Können die transplantierten fhNPZ *in vitro* durch Markierung mit Eisenoxidnanopartikeln mittels MRT-Aufnahmen dargestellt werden?
  - 1.1. Welche Eisenkonzentration ist in Hinblick auf das Proliferationsverhalten und die Vitalität der fhNPZ nach der Markierung am geeignetsten?
  - 1.2. Können markierte fhNPZ durch eine T2-gewichtete Sequenz dargestellt werden?
  - 1.3. Wo liegt das Detektionslimit markierter fhNPZ in einer T2-gewichteten MRT-Sequenz?
2. Inwiefern beeinflusst die CsA-Applikation das Überleben von ins Schafhirn transplantierten fhNPZ?
  - 2.1. Gibt es gruppenspezifische Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen nach Anwendung verschiedener Applikationsregime?
  - 2.2. Was geschieht mit den ins Schafhirn transplantierten fhNPZ im Zeitverlauf und Gruppenvergleich?
  - 2.3. Besitzt die Transplantation fhNPZ einen neurologischen Einfluss auf die Sensorik und Motorik?
  - 2.4. Können vitale fhNPZ 42 Tage nach Transplantation im Schafhirn nachgewiesen werden?
3. Verursacht CsA Nebenwirkungen beim Schaf?
  - 3.1. Beeinflusst die CsA-Applikation *in vivo* klinische Parameter oder Blutwerte beim Schaf?
  - 3.2. Können *ex vivo* toxische Einflüsse von CsA auf das Schaf nachgewiesen werden?

### 3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Zellkulturmedien und Zusammensetzung

Die benötigten Zellkulturmedien wurden nach den in Tabelle 6 aufgeführten Protokollen hergestellt und verwendet.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

Medium	Verwendung	Zusammensetzung
<b>Proliferationsmedium</b>	Auftauen	DMEM-F12 + Glutamax
	Aussaat	1:50 B27 Supplement minus Vitamin A 50x
	Passagieren	1:100 N2 Supplement 100x
	Eisenmarkierung	10 µg/ml LIF 20 µg/ml Recombinant Human EGF 100 µg/ml B-FGF
<b>Waschmedium</b>	Auftauen	DMEM-F12 + Glutamax
	Aussaat	1:50 B27 Supplement ohne Vitamin A 50x
	Ablösen	1:100 N2 Supplement 100x
<b>Transplantationsmedium</b>	Ablösen der Zellen für die Transplantation	DMEM-F12 + 15 mM HEPES
<b>PBS</b>	Auftauen	9,55 g PBS-Pulver
	Aussaat	1000 ml Millipore Wasser
	Eisenmarkierung	pH-Wert einstellen auf 7.4 mit HCl/NaOH

B-FGF = basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor; DMEM-F12 = *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*; EGF = *epidermal growth factor*; HCl = Salzsäure; NaOH = Natriumhydroxid; HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; LIF = *leucemia inhibitory factor*; PBS = phosphatgepufferte Salzlösung; pH = Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung

##### 3.1.2 Auftauen und Aussaat der Zellen

Die fetalen humanen neuralen Progenitorzellen (fhNPZ) wurden im Rahmen einer Kooperation zwischen der Universität Stanford, USA und dem Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig von Stanford nach Leipzig überführt. Die fhNPZ stammen von der 1998 etablierten Wisconsin H9 humanen embryonalen Stammzelllinie ab (THOMSON 1998) und wurden von den *National Institutes of Health* für die staatlich geförderte Forschung zugelassen (ANON. 2016).

Als Vorbereitung zum Auftauen der fhNPZ wurden das Proliferations- und das Waschmedium nach den in Tabelle 6 aufgeführten Protokollen hergestellt und auf 37°C erwärmt. Zusätzlich wurden Zellkulturgefäße mit Fibronectin beschichtet. Hierzu wurde Fibronectin in der Verdünnung 1:50 in sterilem PBS gelöst. Anschließend wurden 1,5 ml der Lösung (Lsg.) in die Zellkulturgefäße (T25 cm<sup>2</sup>) gegeben und über 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Flüssigkeit mit einer Vakuumpumpe vollständig abgesaugt und die Zellkulturgefäße 3x mit PBS gewaschen. Die kryokonservierten Zellen (Lagerung bei -196°C) wurden bei 37°C über 2 min im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde zügig in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und auf 10 ml

Endvolumen mit Proliferationsmedium aufgefüllt. Das Zellgemisch wurde bei 265x g über 6 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer definierten Menge Proliferationsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Gesamtzellzahl und die Vitalität mit Hilfe des Trypanblautests bestimmt (Kap. 3.1.4). Nach dem Zählen wurden ca. 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturgefäße ausgesät und 0,2 ml Proliferationsmedium/cm<sup>2</sup> hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und Normoxie inkubiert. Einen Tag nach der Aussaat der fhNPZ erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel.

### 3.1.3 Ablösen der Zellen

Für das Ablösen der fhNPZ wurde zunächst das Enzym TrypLE unmittelbar vor der Anwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt und nach Abnehmen des Mediums auf die Zellen gebracht bis diese vollständig bedeckt waren. Danach wurden die Zellen für wenige Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte eine Sichtkontrolle des Ablösungsprozesses. Die vollständig abgelösten Zellen wurden in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und mit Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 265x g über 6 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Zellpellet in einem definierten Volumen von Proliferationsmedium aufgenommen und mittels des Trypanblautests die Zellzahl bestimmt (vgl. Kap. 3.1.4).

### 3.1.4 Zellzählung mittels Trypanblautest

Für die Zählung der Zellen wurden die Zellen zunächst wie in Kap. 3.1.3 beschrieben enzymatisch abgelöst und anschließend 10 µl des Zellgemisches mit Trypanblau verdünnt. 10 µl dieses verdünnten Zellgemisches wurde in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und mittels eines Lichtmikroskops gezählt. Dabei wurden alle sich in den vier Eckquadraten befindlichen lebenden (farblos) und toten (blau angefärbt) Zellen separat gezählt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (ZZ) wurde der Durchschnitt aller lebenden Zellen in den ausgezählten Quadraten gebildet. Die Berechnung erfolgte anhand der Formel [ 1 ]. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe der Formel [ 2 ] ermittelt.

$$[ 1 ] \quad ZZ/ml = \text{lebende Zellen} \times 10.000 \times \text{Verdünnungsstufe}$$

$$[ 2 ] \quad \text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{lebende Zellen}}{ZZ} \times 100$$

### 3.1.5 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte mittels enzymatischer Ablösung (vgl. Kap. 3.1.3), sobald eine Konfluenz von etwa 90% erreicht wurde. Nach erfolgter Zellzählung (vgl. Kap. 3.1.4) wurden 30.000 lebende Zellen/cm<sup>2</sup> in geeignete Zellkulturgefäße (T25 [25 cm<sup>2</sup>], 5 ml Proliferationsmedium) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und Normoxie inkubiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 Tage. Der im Medium vorhandene Indikator zeigte hierbei durch einen Farbumschlag

(Farbumschlag von Phenolrot nach gelblich [sauer] bis pink [basisch]) einen notwendigen Medienwechsel an.

### 3.1.6 Eisenmarkierung der Zellen

Die Eisenmarkierung für die Proliferations- und Vitalitätstestung, die Bestimmung der NMR-Relaxationszeit, sowie für die Gelphantom-Detektionstests erfolgte am Tag des Experiments. Die Markierung für die Zelltransplantation fand einen Tag vor dem Tierversuch statt. Zunächst wurde die Arbeitslösung für die VSOP-Markierung in drei verschiedenen Konzentrationen (1,5/3,0/6,0 mM) aus einer entsprechenden Menge Proliferationsmedium und einer 50 mM VSOP-Stammlösung hergestellt. Anschließend wurde für die Eisenmarkierung das Proliferationsmedium von den Zellen abgenommen und die Zellen komplett mit der Arbeitslösung (ca. 1 ml/Kavität) bedeckt. Für die Proliferations- und Vitalitätstestungen, Bestimmung der NMR-Relaxationszeit und Anfertigung der Gelphantome wurden Arbeitslösungen aller drei Konzentrationen verwendet. Zu Transplantationszwecken wurden die Zellen aufgrund der erhobenen Daten (s. Kap. 4.1.1) ausschließlich mit der 3,0 mM Arbeitslösung markiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 min bei 37°C und Normoxie inkubiert und danach 3x vorsichtig mit PBS gewaschen. Folgend wurde erneut Proliferationsmedium zugegeben und die Zellen bis zu ihrer Verwendung in den Zellinkubator überführt.

### 3.1.7 Proliferations- und Vitalitätstests

Für die Qualitätssicherung der Transplantationsversuche wurden Proliferations- und Vitalitätstests der eisenmarkierten Zellen durchgeführt. Hierzu erfolgte zunächst, wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, das Auftauen und die Aussaat der Zellen (30.000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Bis zum Versuchsbeginn wurden die Zellen 2x passagiert (vgl. Kap. 3.1.5) und zeigten am Versuchstag eine Konfluenz von etwa 80%. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen mit verschiedenen Eisenkonzentrationen (1,5/3,0/6,0 mM) markiert (s. Kap. 3.1.6). Gleichzeitig wurden für jeden Zeitpunkt Kontrollen (unmarkierte Zellen) mitgeführt. Um ähnliche Bedingungen zwischen der Kontrolle und den eisenmarkierten Zellen herzustellen, wurde die Kontrolle zum Zeitpunkt der Eisenmarkierung 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fhNPZ inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0/4/24/48 h nach Markierung) die Zellzahl (ZZ) sowie deren Vitalität bestimmt (vgl. Kap. 3.1.4). Pro Zeitpunkt wurden je 3 biologische Replikate getestet (n = 3).

### 3.1.8 Ablösen der Zellen für Transplantationsexperimente

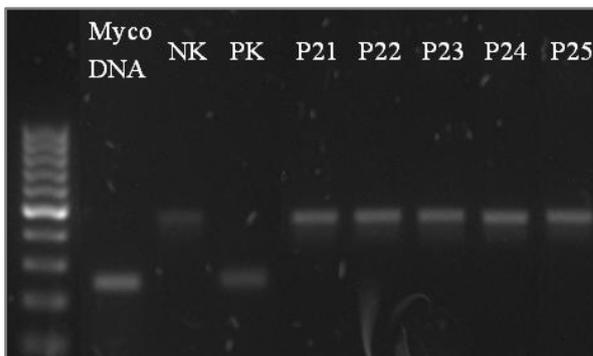
Das Ablösen der Zellen für die Transplantation erfolgte wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Im Unterschied zum dort beschriebenen Vorgehen wurde jedoch nach der Zentrifugation und Abnahme des Überstandes Transplantationsmedium anstelle des üblicherweise genutzten Proliferationsmediums in einem definierten Volumen ( $V_1$ ) verwendet. Daraufhin wurden die fhNPZ ausgezählt ( $c_1$  [ $\mu$ l]), deren Vitalität bestimmt (s. Kap. 3.1.4) und auf eine Zielkonzentration von 4.000 Zellen/ $\mu$ l zur

Transplantation (50  $\mu\text{l}$  Transplantationsvolumen) eingestellt. Diese Einstellung der Zielkonzentration erfolgte mit Hilfe der Formel [ 3 ], wobei  $V_1$  = ein definiertes Volumen,  $V_2$  = die Menge des hinzuzufügenden Medium und  $c_1$  = die IST-Zellzahl [ $\mu\text{l}$ ] darstellen. Anschließend wurde die stereotaktische Zelltransplantation durchgeführt (vgl. Kap. 3.5.5.2).

$$[ 3 ] \quad V_2 = \frac{1 \mu\text{l} \times c_1}{4.000 \text{ Zellen}} \cdot V_1$$

### 3.1.9 Mykoplasmentest

Regelmäßig wurden die für die Transplantation verwendeten Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Dafür wurde ein kommerzieller Testkit (LookOut<sup>®</sup> Mycoplasma PCR Detection Kit) von Sigma-Aldrich verwendet. Im Einzelfall konnte eine Kontamination mit Mykoplasmen festgestellt werden; diese Zellen wurden vom Versuch ausgeschlossen. Die im Versuch verwendeten Zellen waren zu jedem der getesteten Zeitpunkte frei von Mykoplasmen (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Ergebnisse des Mykoplasmentests nach Gelelektrophorese**

Abbild der DNA-Fragmente nach PCR und anschließender Gelelektrophorese. Myco DNA = Mykoplasmen-Desoxyribonukleinsäure als Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle; P = Passage; PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion; PK = Positivkontrolle

### 3.2 Bestimmung der T2 NMR-Relaxationszeit

Für die Darstellung der eisenmarkierten fhNPZ *in vivo* mittels einer T2-gewichteten MRT-Sequenz erfolgte zuvor die Analyse der für eine ausreichend kontrastreiche Darstellung benötigten Eisenkonzentration *in vitro*. Hierfür wurden die Zellen wie in Kap. 3.1.6 beschrieben mit den Konzentrationen 1,5 mM, 3,0 mM und 6,0 mM eisenmarkiert. Anschließend erfolgte die Aussaat und Kultivierung in Zellkulturflaschen (175  $\text{cm}^2$ ) (vgl. Kap. 3.1.2). Zum Zeitpunkt 0 und 24 h nach Eisenmarkierung wurden jeweils 6 biologische Replikate der markierten Zellen und der Kontrollpopulation (keine Eisenmarkierung) für die Messung aus der Zellkultur verwendet. Hierfür wurden die Zellen abgelöst (s. Kap. 3.1.3) und gezählt (vgl. Kap. 3.1.4). Je Replikat wurden  $9 \times 10^5$  fhNPZ in 3 ml PBS gelöst und anschließend zur Messung in ein NMR-Relaxometer (Minispec<sup>®</sup>) bei

einer Feldstärke von 0,47 Tesla (T) überführt. Es wurden 3 Messungen je Probe mit der T2-gewichteten Turbospin-Multiechosequenz (TSE) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der jeweiligen T2-Relaxationszeit durch das Programm Microsoft® Office Excel® 2007. Dies erfolgte durch die Berechnung der Zerfallsfunktion (Exponentialfunktion) anhand der erhobenen Datenpunkte und der anschließenden Bestimmung der T2-Zeitkonstanten (s. Formel [ 4 ], wobei  $M_{xy}(t)$  die transversale Magnetisierung zu der Zeit  $t$  und  $M_0$  die longitudinale Magnetisierung darstellen, vgl. Kap. 2.2.4.1 und Abbildung 3). Für die nachfolgende statistische Auswertung wurde der Mittelwert der 3 Messungen pro Replikat verwendet.

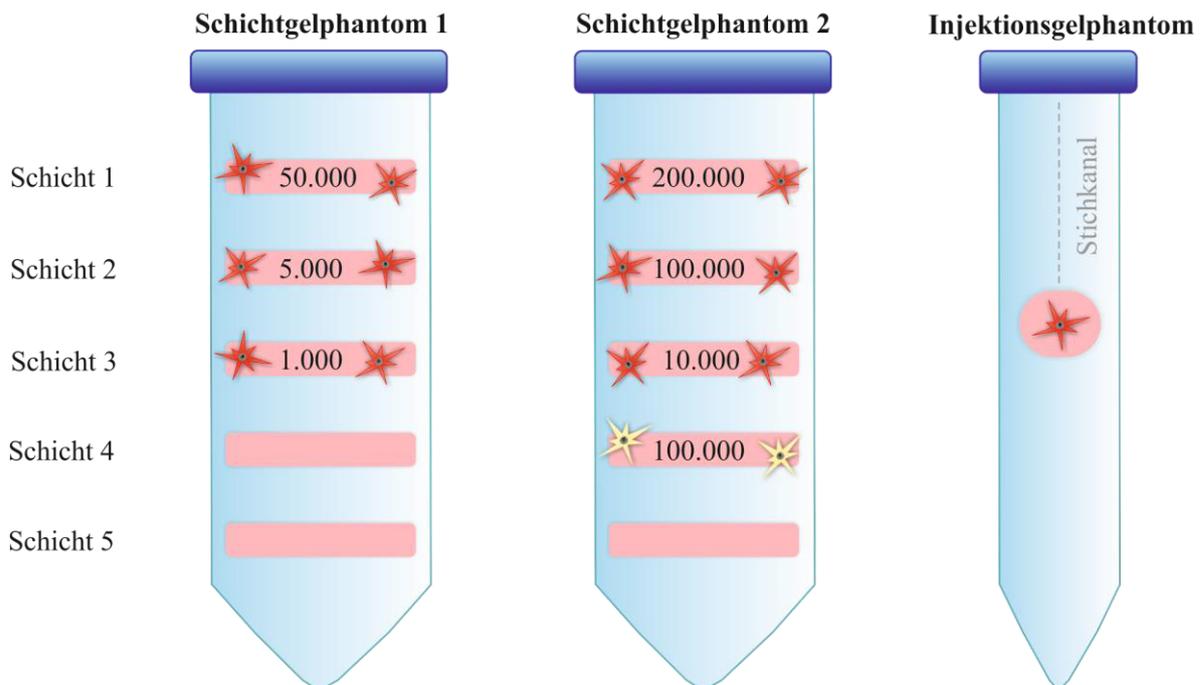
$$[ 4 ] \quad M_{xy}(t) = M_0 \times e^{-\frac{t}{T_2}}$$

### 3.3 Gelphantome

Die Gelphantome wurden zur Ermittlung der Detektionsmenge eisenmarkierter fhNPZ für die Transplantation am Schaf hergestellt. Es wurden Gelphantome mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen gegossen und anschließend die Detektierbarkeit dieser Zellzahlen mittels 3,0 T MRT-Aufnahmen über eine T2-gewichtete Sequenz überprüft. Die verwendeten Protokolle zur Herstellung der Gelphantome wurden bereits in einem ovinen Modell mit Transplantation eisenmarkierter oviner MSZ validiert (DREYER 2012).

#### 3.3.1 Herstellung und Ausgießen

Zur Herstellung der Gelphantome wurden die fhNPZ wie in Kap. 3.1.3, 3.1.6 und 3.1.8 beschrieben abgelöst, eisenmarkiert (Konzentration: 3,0 mM) und gezählt. Anschließend wurden zwei verschiedene Arten von Gelphantomen hergestellt: Zum einen wurden Schichtgelphantome gegossen, in denen verschiedene Mengen der eisenmarkierten fhNPZ als Schichten, getrennt durch Agarose-Gel, aufgetragen wurden (s. Abbildung 6). Zum anderen wurden Injektionsgelphantome hergestellt, bei denen die fhNPZ in das Agarosegel injiziert wurden.



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Gelphantome**

**Schichtgelphantom 1:** Schicht 1 = 50.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 2 = 5.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 3 = 1.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 4 und 5 = Transplantationsmedium, keine Zellen. **Schichtgelphantom 2:** Schicht 1 = 200.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 2 = 100.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 3 = 10.000 eisenmarkierte fhNPZ (3,0 mM); Schicht 4 = 100.000 unmarkierte fhNPZ; Schicht 5 = Transplantationsmedium, keine Zellen. **Injektionsgelphantom:** Injektion eisenmarkierter fhNPZ in das Gel mittels einer Hamilton-Spritze (10  $\mu$ l, 26 G, 5 cm). fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen

Für die Herstellung der Gelphantome wurde zunächst Agarosegel (AG) hergestellt. Dafür wurde 7,5 g Agarose (1,5%ig) mit 500 ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) in einem geeigneten Gefäß mittels eines Heizmagnetrührers auf 88°C erhitzt. Die Schichtgelphantome wurden nach dem im Anhang in Tabelle 38 aufgeführten Protokoll gegossen. Für die Injektionsgelphantome wurden konische Zentrifugationsgefäße komplett mit AG befüllt und nach dessen Aushärtung eisenmarkierte fhNPZ in 3  $\mu$ l Transplantationsmedium mit einer Hamilton-Spritze (10  $\mu$ l, 26 G, 5 cm) injiziert.

### 3.3.2 Anfertigen von *In-vitro*-MRT-Aufnahmen zum Nachweis der eisenmarkierten fhNPZ

Die bildgebenden Verfahren zur Darstellung der eisenmarkierten fhNPZ in den Gelphantomen fand in einem 3,0 T MRT des Universitätsklinikums Leipzig mit Hilfe von Herrn Dr. Donald Lobsien (Facharzt für Radiologie, Universität Leipzig) statt. Es wurde eine T2-gewichtete SWI-Sequenz mit einer räumlichen Auflösung von 0,31 x 0,27 x 0,25 mm bei einer Messzeit von 6 h und 46 min mittels einer 8-Kanal-Spule (Siemens) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte verblindet durch 2 voneinander unabhängige Personen (Frau Dr. med. vet. Antje Dreyer und Rita Diehl). Hierbei wurden die MRT-Aufnahmen in Hinblick auf die Erkennbarkeit der eisenmarkierten fhNPZ betrachtet.

### 3.4 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 15 männlich-kastrierte Merinofleischschafe im Alter von 12 - 24 Monaten vom Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Universität Leipzig bezogen. Vor Versuchsbeginn wurden die Schafe gegen Parasiten mit den Medikamenten Baycox® (20 mg Toltrazuril/kg p.o.) und Dektomax® (0,2 mg Doramectin/kg i.m.) behandelt. Das Forschungsprojekt wurde als Tierversuchsvorhaben 09/11 vom Regierungspräsidium Leipzig mit Sitz in Leipzig genehmigt.

#### 3.4.1 Tierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Außenställen auf dem Gelände der Universität Leipzig. Die Tiere wurden 2x tägl. mit Heu, Karotten und Hafer gefüttert. Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Schafe erhielten täglich Auslauf auf einer Weide, wenn es die Witterung zuließ. Der Stall wurde wöchentlich gemistet und in regelmäßigen Abständen gereinigt und desinfiziert.

#### 3.4.2 Versuchstiere im tierexperimentellen Versuch

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Freigabe der Tiere für den Versuch. Hierfür wurden eine allgemeine tierärztliche Untersuchung, eine Blutuntersuchung (großes Blutbild) und ein neurologischer Untersuchungsgang durchgeführt. Nach der Freigabe wurden die Tiere zufällig einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt (s. Tabelle 7).

**Tabelle 7: Gruppeneinteilung und jeweiliges Behandlungsregime**

Gruppe	Anzahl der Tiere	Behandlungsregime
<b>Kon</b>	5	keine CsA-Applikation
<b>iCsA</b>	5	3 mg CsA/kg 2x tägl. bis Tag 36, danach jeden 3. Tag 3 mg CsA/kg 1x tägl.
<b>kCsA</b>	5	3 mg CsA/kg 2x tägl. durchgehend bis Tag 64

CsA = Cyclosporin A; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; mg = Milligramm; x = mal

##### 3.4.2.1 Tierärztliche Untersuchung der Vitalparameter

Die Versuchstiere wurden vor dem Tierversuch im Rahmen der Bestandsbetreuung 3x pro Woche, für die Freigabe und während des Experiments täglich tierärztlich untersucht. Die Untersuchung umfasste hierbei eine Allgemeinuntersuchung mit Erfassung der Vitalparameter Puls, Atmung und Körpertemperatur, die Untersuchung des Allgemeinbefindens, des Atmungstrakts und der Schleimhäute. Zudem wurde einmal wöchentlich das Körpergewicht der Tiere erfasst.

### 3.4.2.2 Durchführung des neurologischen Untersuchungsgangs

Ein neurologischer Untersuchungsgang zur Überwachung sensorischer und motorischer Einflüsse durch die Transplantation von fhNPZ wurde vor Versuchsbeginn am Tag der Freigabe und während des Versuchs an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 (Tag der Transplantation), 23, 25, 29, 36, 43, 50, 57 und 64 durchgeführt. Dabei wurden die Tiere zunächst in der freien Bewegung hinsichtlich ihres Allgemeinverhaltens, Bewusstseins, ihrer Bewegungsrichtung und Motorik beurteilt. Anschließend wurde das Vorhandensein/Nichtvorhandensein der Korrekturreaktionen aller Gliedmaßen bei folgenden Untersuchungen erfasst:

- passives Überköten der Gliedmaßen
- Provokation der medial gerichteten Korrekturreaktion mittels induziertem Ausgrätschen einer einzelnen Gliedmaße mit Hilfe eines Stück Pappkartons. Dabei wurde die Klaue auf ein Stück Pappkarton gestellt und anschließend wurde der Pappkarton langsam nach lateral gezogen.
- laterale und mediale Hüpfreaktion

Folgend wurde die Schubkarren-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurden die Versuchstiere auf einen koordinierten Bewegungsablauf hin untersucht. Den Abschluss des neurologischen Untersuchungsgangs bildete die freie Bewegung bei verbundenen Augen. Hier wurde vor allem die Bewegungsrichtung beurteilt. Die Bewertung der Untersuchung erfolgte durch den in Tabelle 8 festgelegten Bewertungsschlüssel.

**Tabelle 8: Bewertungsschlüssel des neurologischen Untersuchungsgangs**

Score	Bewertungsschlüssel
0	obB, keine neurologischen Auffälligkeiten
1	verzögerte Reaktion
2	ausgefallene Reaktion

obB = ohne besonderen Befund

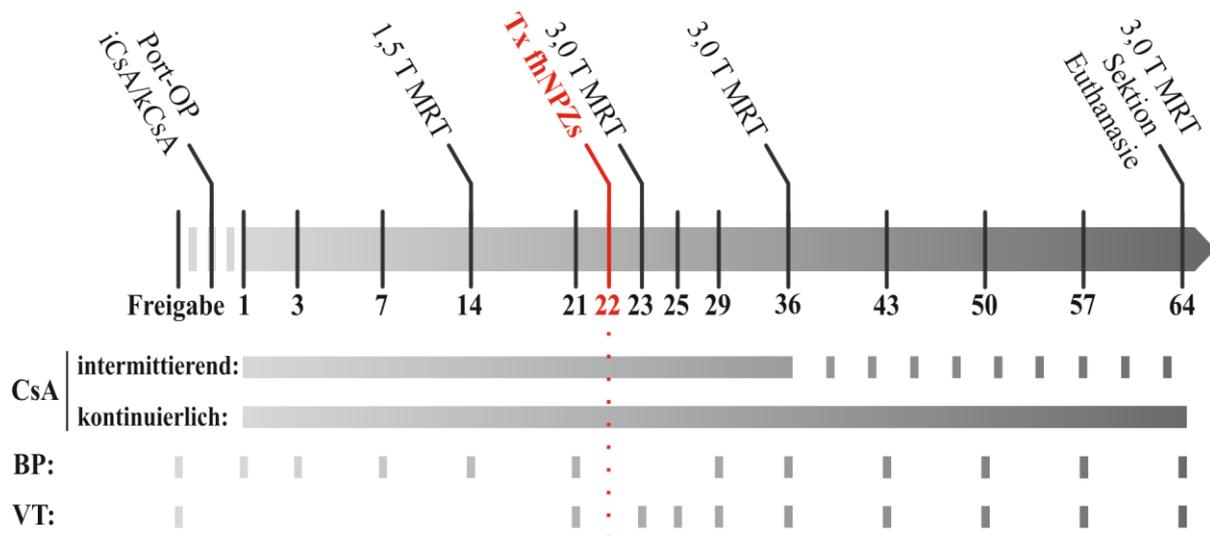
### 3.4.2.3 Blutprobenentnahme, Versand und Detektiermethode

Für die Analyse der Blutparameter wurde den Versuchstieren an den Versuchstagen 1, 7, 14, 21, 29, 36, 43, 50, 57 und 64 morgens vor der Fütterung Blut aus der Portkammer entnommen (s. Abbildung 10 A, B und D). Das gewonnene Blut wurde in einem mit EDTA behaftetem Blutröhrchen aufgefangen und vorsichtig zum Labor der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig transportiert, wo die Analyse (großes Blutbild, Blutchemie) erfolgte. Die Blutprobenentnahme für die Messung der CsA-Konzentrationen erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21, 29, 36, 43, 50, 57 und 64 abends vor der CsA-Applikation durch die Punktion der *V. jugularis*. Dafür wurde die entsprechende Stelle zunächst geschoren und mit Ethanol (70%ig) desinfiziert. Anschließend wurde die *V. jugularis* in der Drosselrinne unterhalb der Einstichstelle angestaut und die Vene mit einer Kanüle punktiert. Das Blut wurde hierbei in speziellen EDTA-beschichteten Monovetten aufgefangen. Anschließend wurden diese Monovetten bei -20°C eingefroren und auf Trockeneis an das Institut für

Laboratoriumsmedizin in Leipzig zur Analyse überführt. Dort erfolgte die Messung der CsA-Konzentration durch das Gerät API 4000<sup>TM</sup> System des Herstellers AB Sciex mittels der Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-TMS).

### 3.5 Versuchsaufbau und Durchführung

Nach der Freigabe (s. Kap. 3.4.2) wurde den Tieren der iCsA und kCsA 2 Wochen vor Versuchsbeginn ein Portsystem implantiert (s. Kap. 3.5.3). Dadurch konnte eine venöse Applikation von CsA mehrmals täglich über den Versuchszeitraum von 64 Tagen gewährleistet werden (s. Kap. 3.5.4). Der Versuchsablauf ist in Abbildung 7 als Übersicht dargestellt. Der kCsA wurde über den gesamten Versuchszeitraum (Tag 1 - 64) 2x tägl. 3 mg CsA/kg appliziert. Die iCsA erhielt von Versuchstag 1 bis 36 2x tägl. 3 mg CsA/kg. Ab Tag 37 wurde der iCsA nur noch jeden 3. Tag 3 mg CsA/kg 1x tägl. verabreicht. Die Kon erhielt kein CsA. Am Tag 14 wurde von allen Tieren eine MRT-Untersuchung (1,5 T) durchgeführt (s. Kap. 3.5.5.1). Sie diente zur Planung der stereotaktischen Zelltransplantation, die am Versuchstag 22 erfolgte (vgl. Kap. 3.5.5.3). An den Tagen 23, 36 und 64 wurden MRT-Untersuchungen (3,0 T) zur Detektion der eisenmarkierten fhNPZ im Schafhirn durchgeführt (vgl. Kap. 3.5.6). An Tag 64 erfolgte nach Abschluss der bildgebenden Verfahren die Euthanasie und anschließend eine pathologische und histopathologische Untersuchung (vgl. Kap. 3.5.7).



**Abbildung 7: Übersicht des Versuchsablaufs über 64 Tage**

**CsA intermittierend:** Diese Gruppe erhielt bis Tag 36 2x tägl. 3 mg CsA/kg (durchgehender Balken), danach 1x tägl. 3 mg CsA/kg alle 3 Tage (einzelne Balken). **CsA kontinuierlich:** Diese Gruppe erhielt bis einschließlich Tag 64 2x tägl. 3 mg CsA/kg (durchgehender Balken). **BP:** Blutproben wurden am Tag der Freigabe und an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21, 29, 36, 43, 50, 57 und 64 entnommen (einzelne Balken). **VT:** Der neurologische Untersuchungsgang wurde am Tag der Freigabe und an den Tagen 21, 23, 25, 29, 36, 43, 50, 57 und 64 durchgeführt (einzelne Balken). BP = Blutprobe; CsA = Cyclosporin A; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; MRT = Magnetresonanztomografie; T = Tesla; Tx = Transplantation; VT = neurologischer Verhaltenstest (Untersuchungsgang)

### 3.5.1 Anästhesie

Grundlegend wurden zwei verschiedene Narkosearten angewendet. Für die chirurgischen Eingriffe (Portimplantation und stereotaktische Zelltransplantation) wurde eine Inhalationsnarkose durchgeführt, während für die bildgebenden Maßnahmen (MRT-Aufnahmen) eine Injektionsnarkose verwendet wurde. Vor jeder Narkose wurden die Tiere mindestens 3 h gefastet und eine tierärztliche Untersuchung der Vitalparameter (Allgemeinbefinden, Puls, Atmung, Temperatur) vorgenommen.

#### Prämedikation und Narkoseeinleitung

Für die Prämedikation und Einleitung der Narkose wurde zunächst ein venöser Zugang in die *V. jugularis* geschoben. Hierzu wurde der entsprechende Halsabschnitt der Schafe geschoren, mit Ethanol (70%ig) desinfiziert und der venöse Zugang mittels eines Venenverweilkatheters hergestellt. Über diesen Zugang wurde anschließend die Narkoseeinleitung mit einer Kombination aus 4,4 mg Ketamin/kg und 0,1 mg Xylazin/kg durchgeführt. Des Weiteren erhielten die Tiere bei chirurgischen Eingriffen 0,25 mg Diazepam/kg i.v. und bei Bildgebungsverfahren 0,2 mg Midazolam/kg i.v. Anschließend wurde die Narkose mit einem Bolus Propofol (2,5 mg/kg i.v.) vertieft. Daraufhin erfolgte die Intubation. Hierzu wurde das Maul mit zwei Mullkompressen von einer Hilfsperson gespreizt und mit Hilfe eines Laryngoskops der Tubus unter Sichtkontrolle eingeführt. Der Tubus wurde anschließend gesichert und mit einer Mullbinde am Kopf befestigt. Die Tiere mussten sowohl zum Operationsaal (OP), als auch zu den Bildgebungsverfahren transportiert werden. Dies erfolgte unter der beschriebenen Narkose. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde während des Transports durch die Applikation von Propofol-Boli unter Erhaltung der Spontanatmung gewährleistet.

#### Inhalationsnarkose

Für die Inhalationsnarkose wurden die Tiere nach Ankunft im Vorbereitungsraum des OPs in die Inhalationsnarkose mit Isofluran übergeleitet (s. Abbildung 8 A). Hierzu erhielten sie einen Bolus Propofol, der zu einem kurzzeitigen Aussetzen der Spontanatmung führte, wodurch ein Anschließen an das Anästhesiegerät ermöglicht werden konnte. Die Schafe wurden mit einem Luftgemisch (40% O<sub>2</sub>-Gehalt) bei einem Atemvolumen von 10 ml/kg und einer Atemfrequenz von 10 - 20/min beatmet. Für eine ausreichende Narkosetiefe wurde eine Isofluran-Konzentration von 2 - 4% eingesetzt, die zu einer angestrebten MAC (mittleren alveolären Konzentration) von 1,3 - 1,5% führte. Zur perioperativen Schmerzausschaltung und Antibiose erhielten die Schafe während der Operationsvorbereitungen 0,07 mg Butorphanol/kg i.m. alle 4 h, 50 mg Enrofloxacin/kg/d i.m. und 2,2 mg Flunixin-Meglumin/kg/d i.m. Die Narkoseausleitung erfolgte bei der Inhalationsnarkose durch das stufenweise Absenken der Isofluran-Konzentration, des Atemvolumens und der Atemfrequenz bis zum Einsetzen der Spontanatmung.

### Injektionsnarkose

Für die Injektionsnarkose erhielten die Schafe nach Ankunft im MRT (während des Transports wurde die Narkose über die Applikation von Propofol-Boli erhalten) eine Kombination aus 3 - 15 mg Ketamin/kg/h, 0,2 - 0,4 mg Midazolam/kg/h und 6 - 12 mg Propofol/ kg/h je nach Bedarf (vgl. Abbildung 8 B). Für den Rücktransport (sowohl nach chirurgischen Eingriffen, als auch nach den Bildgebungsverfahren) zum Stall wurden erneut Propofol-Boli nach Bedarf eingesetzt. Die Schafe wurden anschließend während der Aufwachphase bis zum Erlangen der Stehfähigkeit intensiv überwacht.



**Abbildung 8: Inhalations- und Injektionsnarkose beim Schaf**

**A:** Schaf in Inhalationsnarkose nach der OP-Vorbereitung. Im Maulwinkel ist ein O<sub>2</sub>-Sensor befestigt, am linken Vorderbein die nicht-invasive Blutdruckmanschette. In der Achsel- und Leistengegend sind die EKG-Elektroden angebracht. **B:** Schaf in Injektionsnarkose während des Transports. Links auf der Transportliege befinden sich die Perfusionspumpen mit den Narkotika

### 3.5.2 Schmerzmittelregime und Infektionsprophylaxe

Jeder potenziell schmerzhaftem Eingriff an den Versuchstieren wurde ausschließlich unter Verwendung von entsprechenden Schmerzmitteln durchgeführt. Bei der Portimplantation und Stammzelltransplantation wurden die Tiere präoperativ mit 2,2 mg Flunixin-Meglumin/kg, sowie intraoperativ mit 4,4 mg Ketamin/kg und 0,1 mg Xylazin/kg zur Narkoseeinleitung und 0,07 mg Butorphanol/kg i.m. alle 4 h behandelt (s. Tabelle 9). Postoperativ erfolgte eine Gabe von 2,2 mg Flunixin-Meglumin/kg/d über 3 Tage zur Schmerzbehandlung. Am Tag der MRT-Untersuchung im 1,5 T MRT (Tag 14) erhielten die Tiere vor dem Eingriff 2,2 mg Flunixin-Meglumin/kg KG. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere sowohl nach der Portimplantation, als auch nach der Stammzelltransplantation 50 mg Enrofloxacin/kg/d i.m. für 5 Tage.

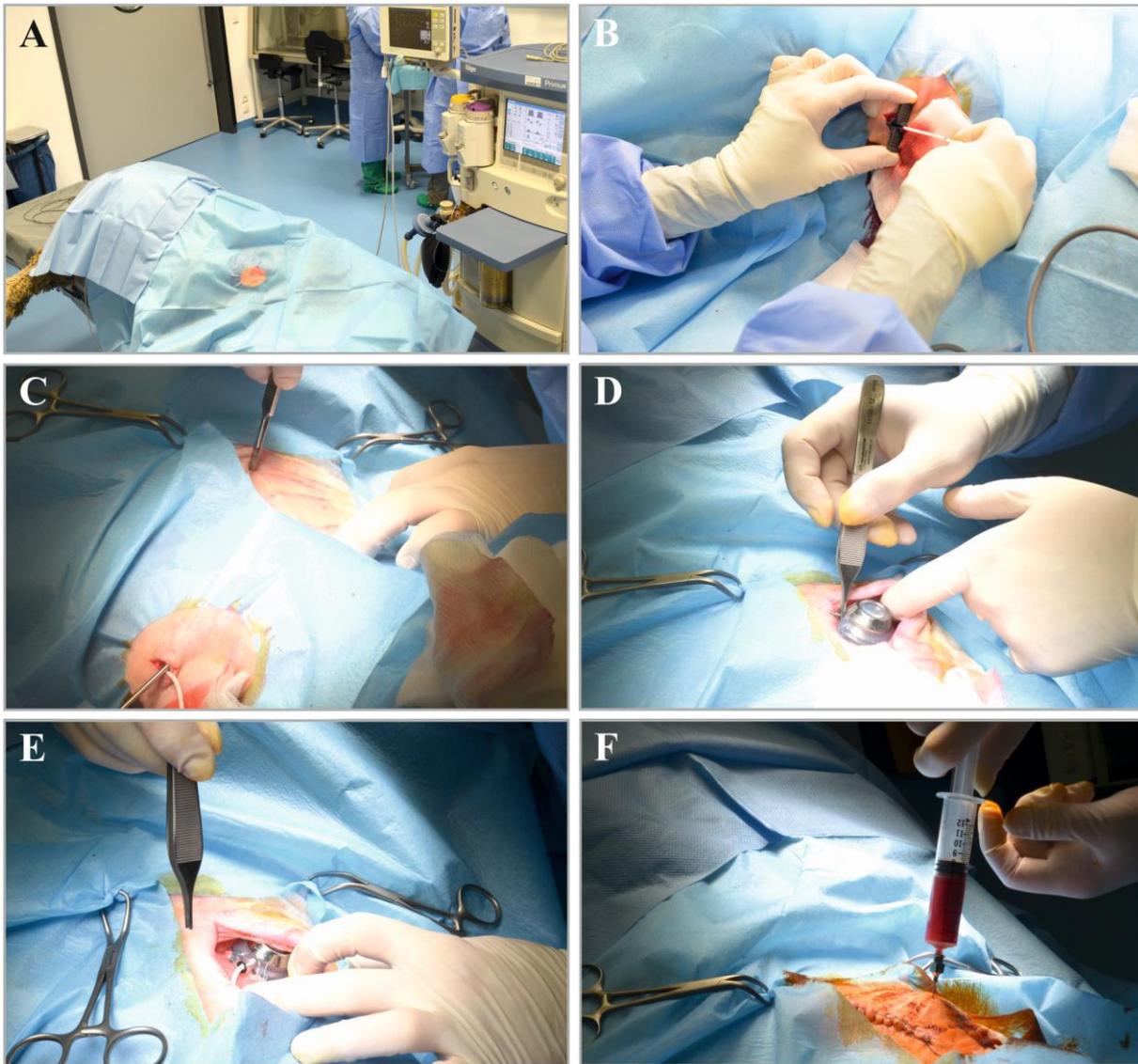
**Tabelle 9: Behandlungsregime nach operativen Eingriffen**

Medikament (Wirkstoff)	Tage post OP				
	0	1	2	3	4
<b>Butorphanol:</b> 0,07 mg/kg alle 4 h	x	bzw. bei Bedarf (Verdacht auf Schmerzhaftigkeit)			
<b>Flunixin-Meglumin:</b> 2,2 mg/kg/d	x	x	x		
<b>Enrofloxacin:</b> 50 mg/kg/d	x	x	x	x	x

0 = Tag der Operation (OP); 1 = Tag 1 post OP; 2 = Tag 2 post OP; 3 = Tag 3 post OP; 4 = Tag 4 post OP, alle Medikamente wurden i.m. verabreicht.

### 3.5.3 Implantation des Portsystems

Die Implantation des Portsystems erfolgte nach der Versuchsfreigabe (s. Kap. 3.4.2) und vor Versuchsbeginn bei Tieren der Gruppen iCsA und kCsA. Es wurde dabei wie in Kap. 3.5.1 beschrieben eine Inhalationsnarkose durchgeführt. Zur Vorbereitung der Operation wurde der linke Nacken- und Schulterbereich der Schafe großzügig geschoren, rasiert und desinfiziert (s. Abbildung 9 A). Anschließend wurde ein 1 cm langer Hautschnitt in Bereich der *V. jugularis* durchgeführt. Es erfolgte die stumpfe Präparation bis zur linken *V. jugularis*. In diese wurde der Portkatheter mittels Seldinger-Technik eingesetzt. Hierfür wurde die Vene mit einer Kanüle punktiert und darüber ein Führungsdraht eingebracht. Nach dem Entfernen der Kanüle wurde über den Führungsdraht eine Schleuse in die *V. jugularis* eingebracht (s. Abbildung 9 B). Anschließend wurde der Draht herausgezogen und der mit isotonischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl-Lsg.) gespülte Portkatheter eingeführt. Daraufhin konnte die Schleuse entfernt werden. Im Anschluss erfolgte die Positionskontrolle des Portkatheters mittels des Portlagesystems. Dafür wurde der Katheter mit einem Sensor versehenen Dreiwegehahn und mit dem Elektrokardiogramm (EKG) verbunden. Durch die Kontrolle der Ableitungssignale des EKGs konnte der Katheter bis 2 cm vor die linke Vorkammer des Herzens vorgeschoben werden. Anschließend wurde der Katheter mit einem Einzelheft in der Subkutis verankert. Nun erfolgte ein Hautschnitt von 4 cm im Nackenbereich für das Einsetzen der Portkammer (s. Abbildung 9 C). Es wurde stumpf eine Wundhöhle von 4 x 4 cm in die Subkutis präpariert (s. Abbildung 9 D). Für den Anschluss an die Portkammer wurde der Katheter zunächst mit einer stumpfen Präpariernadel verbunden und anschließend durch die Unterhaut zur Wundhöhle im Nackenbereich geführt. Nach Kürzung des Katheters auf den entsprechenden Bewegungsradius des Schafes wurde er mit der gespülten Portkammer verbunden. Anschließend wurde die Portkammer in der Subkutis mittels Einzelheften fixiert (s. Abbildung 9 E) und die Wundhöhle mit einer Iod-Lsg. gespült. Der Wundverschluss erfolgte sowohl im Nacken- als auch im Venenbereich mit Einzelheften (s. Abbildung 9 F). Nach dem Eingriff wurden die Tiere in den Stall rücküberführt und bis zum vollständigen Erwachen beobachtet. Die postoperative Nachbehandlung erfolgte wie in Tabelle 9 beschrieben.



**Abbildung 9: Portimplantation beim Schaf**

**A:** Narkotisiertes Schaf im Operationssaal vor Beginn der OP mit bereits vorbereitetem OP-Feld. **B:** Einbringen des Portkatheters in die *V. jugularis* mittels einer Schleuse. **C:** Fixierter Portkatheter im Bereich der *V. jugularis*, im Nackenbereich Planung des Hautschnitts. **D:** Einbringen der Portkammer in die Wundhöhle. **E:** Verbindung der Portkammer mit dem Portkatheter. **F:** Wundverschluss im Nackenbereich neben der eingesetzten Portkammer. Kontrolle des Zugangs zur *V. jugularis* durch Blutaspiration (siehe Spritze) und Spülen der Portkammer.

### 3.5.4 Applikation von CsA

Die Applikation des Immunsuppressivum CsA erfolgte als Infusionslösung 2x tägl. i.v. über das zuvor implantierte Portsystem.

#### 3.5.4.1 Herstellung der Infusionslösung

Für die CsA-Applikation wurde zunächst die entsprechende Infusionslösung hergestellt. Dafür wurde das pulverisierte CsA in einer Arbeitslösung (325 g Cremophor EL, 472 ml 94% Ethanol, 25 g CsA) gelöst und diese anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt (20 ml Arbeitslösung, 500 ml NaCl-Lsg.).

### 3.5.4.2 Applikation über das Portsystem

Nach der Herstellung der Infusionslösung erfolgte die Applikation von 3 mg CsA/kg 2x tägl. über das Portsystem. Hierzu wurde das Versuchstier zunächst fixiert, der Nackenbereich um den Port geschoren und mit Ethanol (70%ig) und einer Iod-Lsg. desinfiziert (s. Abbildung 10 B). Anschließend wurde die Portkammer steril mittels einer Portnadel punktiert. Die Gabe der Infusionslösung erfolgte langsam über ein steril angereichertes Infusionsbesteck (s. Abbildung 10 C). Nach Beendigung der Infusion erfolgten das Spülen der Portkammer mit verdünntem Heparin und eine erneute Desinfektion mit einer Iod-Lsg. (s. Abbildung 10 D).



**Abbildung 10: Applikation von CsA beim Schaf**

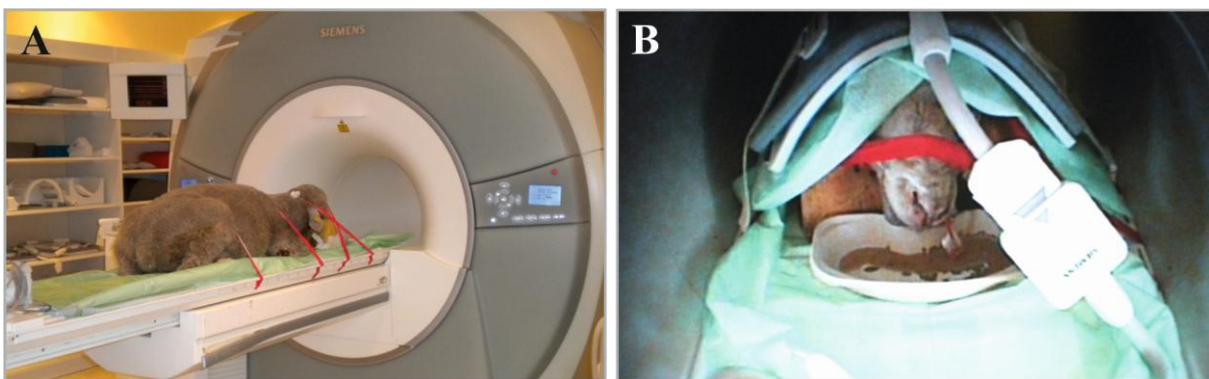
**A:** Vorbereitung der Verbrauchsmittel. **B:** Desinfektion der Portkammer mit Ethanol (70%ig) vor CsA-Applikation. **C:** Infusion von CsA i.v. via Portnadel über die Portkammer. **D:** Spülen der Portkammer mit Heparin nach CsA-Applikation.

### 3.5.5 Stammzelltransplantation

Zur Vorbereitung der Stammzelltransplantation wurde an dem Versuchstag 14 MRT-Aufnahmen von dem jeweiligen Schafskopf in einem 1,5 T MRT angefertigt. Sie dienen als Grundlage für die Neuronavigation während der Stammzelltransplantation (DREYER et al. 2012). Nach der Implantation der fhNPZ am Tag 22 wurden an den Versuchstagen 23, 36 und 64 MRT-Aufnahmen in einem 3,0 T MRT zum Nachweis der eisenmarkierten fhNPZ im Gehirn angefertigt. Am Tag 64 wurden die Tiere euthanasiert und Proben zur histologischen Aufarbeitung entnommen (Versuchsablauf s. Abbildung 7).

### 3.5.5.1 Anfertigen von MRT-Aufnahmen im 1,5 T MRT

Für die MRT-Aufnahmen in dem 1,5 T MRT wurden die Schafe wie in Kap. 3.5.1 beschrieben prämediziert, in die Narkose eingeleitet und mittels einer Injektionsnarkose anästhesiert. Im MRT erfolgte zunächst die Vorbereitung und Fixierung der Schafe für die Bildgebung (s. Abbildung 11). Anschließend wurden Lokalisationssequenzen und eine T1-gewichtete Sequenz mit einer Auflösung von 1,0 x 1,0 x 1,0 mm bei einer Messzeit von ca. 27 min durchgeführt. Mit einer T1-gewichteten Sequenz ist es möglich, detaillierte Aufnahmen von der Anatomie des Schafhirns für die Planung der stereotaktischen Zelltransplantation zu erstellen (Erklärung s. Kap. 2.2.4.1). Nach Abschluss der bildgebenden Verfahren wurden die Schafe in den Stall zurück transportiert und dort bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht.



**Abbildung 11: Durchführung der MRT-Aufnahmen**

**A:** Narkotisiertes Schaf während der Vorbereitung für die Aufnahmen im MRT. **B:** Bild der Überwachungskamera während der MRT-Aufnahmen.

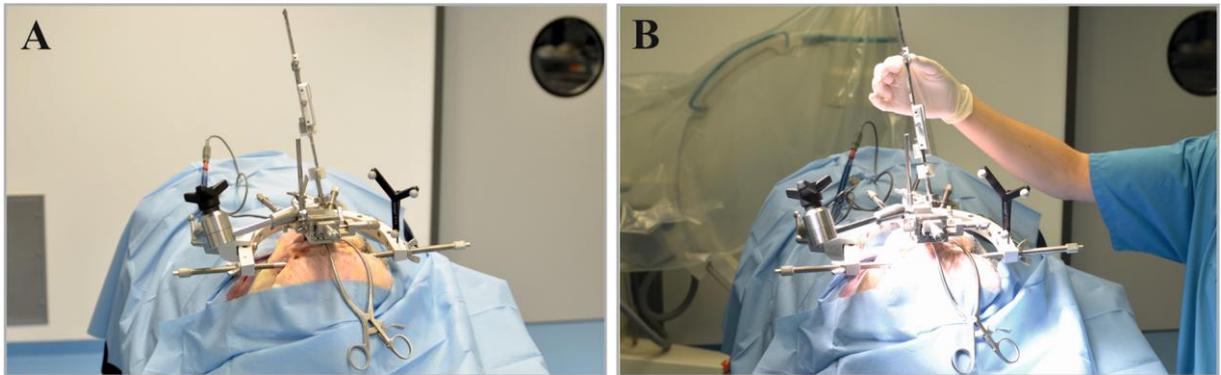
### 3.5.5.2 Planung der stereotaktischen Zelltransplantation

Im Vorfeld des operativen Eingriffes wurde anhand der im 1,5 T MRT angefertigten Aufnahmen die Lokalisation der Zelltransplantation bestimmt und die Neuronavigation nach (DREYER et al. 2012) geplant. Dies erfolgte mit Hilfe des Programms BrainSight® (Rogue).

### 3.5.5.3 Stereotaktische Zelltransplantation

Die Schafe wurden vor dem operativen Eingriff bezüglich ihrer Narkosetauglichkeit untersucht (Allgemeinbefinden, Puls, Atmung, Körpertemperatur) und ca. 12 h nüchtern gehalten. Es erfolgte die Prämedikation der Tiere mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin und anschließend die Einleitung der Narkose mit Propofol und Diazepam (vgl. Kap. 3.5.1). Die perioperative analgetische und antibiotische Versorgung erfolgte mit Butorphanol, Flunixin-Meglumin und Enrofloxacin (vgl. Tabelle 9). Nach dem Transport in den Operationssaal wurde die Anästhesie mittels Inhalationsnarkose durchgeführt (vgl. Kap. 3.5.1). Zur Operationsvorbereitung wurde der Kopf- und Halsbereich der Schafe geschoren, gewaschen und mit Ethanol (70%ig) und Iod-Lsg. desinfiziert. Anschließend wurde die Transplantation der fhNPZ wie bereits in der Literatur beschrieben

durchgeführt (s. Abbildung 12) (DREYER 2012, DREYER et al. 2012). Dabei wurden je Hemisphäre 4.000 Zellen/ $\mu\text{l}$  in einem Transplantationsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  transplantiert. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere in den Stall transportiert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose betreut. Das Medikamentenregime der Nachbehandlung ist in Tabelle 9 aufgeführt.



**Abbildung 12: Stereotaktische Zelltransplantation**

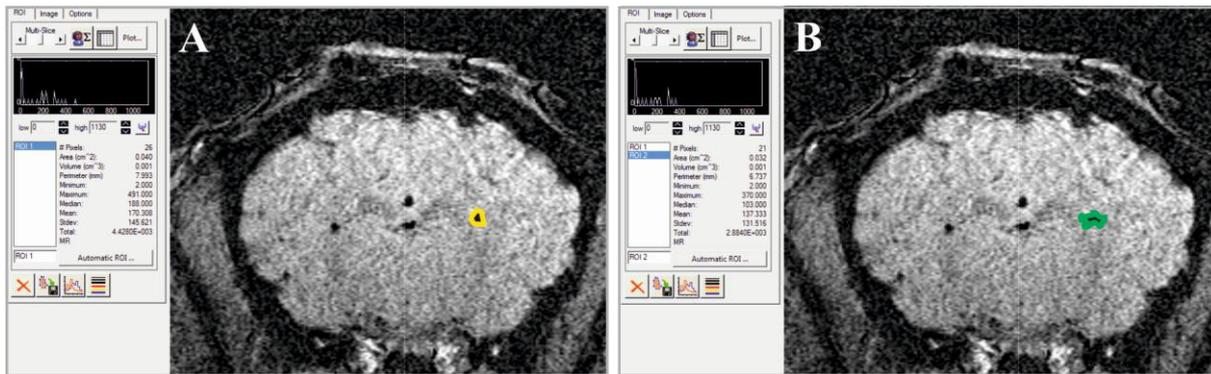
**A:** Aufbau der Transplantationsvorrichtung am Schaf. **B:** Durchführung der Stammzelltransplantation.

### 3.5.6 Nachweis der eisenmarkierten Stammzellen im 3,0 T MRT

Als bildgebendes Verfahren zum Nachweis der Eisenoxidnanopartikel im Gehirn nach der Stammzelltransplantation wurden an den Versuchstagen 23, 36 und 64 Untersuchungen im 3,0 T MRT durchgeführt. Hierfür wurden die Schafe erneut mittels Injektionsnarkose (vgl. Kap. 3.5.1) in Narkose gelegt und ins 3,0 T MRT transportiert (s. Abbildung 11). Die Darstellung der Eisenpartikel erfolgte über eine T2-gewichtete SWI-Sequenz mit einer Auflösung von 0,56 x 0,30 x 0,25 mm über 1 h und 26 min (8-Kanal-Spule, Siemens). Nach erfolgter Bildgebung wurden die Schafe an den Versuchstagen 23 und 36 in den Stall transportiert und dort bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht. Am Versuchstag 64 wurden die Tiere nach den MRT-Aufnahmen narkotisiert in das Gebäude des Veterinär-Anatomischen Instituts der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig gebracht. Dort wurden die Schafe euthanasiert, pathologisch untersucht und Gewebeproben für die histologische Aufarbeitung entnommen (s. Kap. 3.5.7).

#### 3.5.6.1 Methodik zum Nachweis und zur Quantifizierung der eisenmarkierten fhNPZ im Schafhirn

Die Auswertung der MRT-Datensätze der 3,0 T MRT-Aufnahmen erfolgte mit der Computergestützten *multislice planimetric and voxel threshold technique* des Programms MISTar 3.2 (Apollo Medical Imaging Technology, Australien). Mit diesem Programm konnte jeweils eine Fläche (ROI = *region of interest* [ $\text{cm}^2$ ]) um die erkennbare Lokalisation der eisenmarkierten Zellen pro Bild gelegt werden (s. Abbildung 13). So konnte das Volumen des erkennbaren Signals durch die Multiplikation der Fläche mit der Schichtdicke der MRT-Aufnahmen errechnet werden. Die Volumina der eisenmarkierten Partikel wurden im Zeitverlauf und Gruppenvergleich statistisch ausgewertet.



### Abbildung 13: Quantifizierung von eisenmarkierten fhNPZ im Schafhirn

Nach Auffinden des Signals der eisenmarkierten Partikel im MRT-Bild wurde ein ROI freihändig in die entsprechende Lokalisation gezeichnet (A: ROI 1, gelb markiert). Anschließend wurde von dem Computerprogramm durch die Funktion *Automatic ROI* und *Grow by multiple std. dev.* automatisch ein weiteres ROI generiert (B: ROI 2, grün markiert). Dieses ROI 2 beinhaltetete alle Pixel der gleichen Graustufe an der ausgewählten Lokalisation. Die exakte Fläche des ROI 2 konnte im Computertool unter *Area (cm<sup>2</sup>)* abgelesen werden.

### 3.5.7 Sektion der Versuchstiere und Probenentnahme

Am Versuchstag 64 wurden die Schafe nach Beendigung der bildgebenden Verfahren narkotisiert in das Veterinär-Anatomische Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Leipzig transportiert. Dort wurden die Tiere mittels 20 ml Narcoren® (Wirkstoff: Pentobarbital) durch den diensthabenden Tierarzt euthanasiert. Anschließend wurden die Köpfe abgesetzt und durch die rechte und linke *A. carotis* mittels Knopfkanülen mit insgesamt 3 l PBS gespült. Danach wurden die Schafsköpfe über Knopfkanülen mit insgesamt 15 l 4% PFA über einen Zeitraum von ca. 45 min perfundiert und anschließend über Nacht in 4% PFA fixiert. Die Schafskörper wurden einer pathologischen Untersuchung unterzogen. Hierfür wurden die einzelnen Organe entnommen, gewogen, makroskopisch beurteilt (deskriptiv), fotografiert und anschließend Proben von Leber (3 Proben: Rand, Mitte, *Lobus caudatus*) und Nieren (1 Probe je Niere) für die histologische Aufarbeitung entnommen. Diese wurden in 4% PFA fixiert und direkt in die Kühlzelle des Cluster F1, Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig überführt. 24 h nach der Euthanasie wurden die Schädeldecken der in 4% PFA fixierten Köpfe eröffnet und nach erneuten 24 h Lagerung in 4% PFA die Gehirne entnommen. Diese wurden anschließend in geeigneten, mit 4% PFA gefüllten Gefäßen in die Kühlzelle des Cluster F1, Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig gebracht.

### 3.5.8 Anfertigen der histologischen Gewebeschnitte

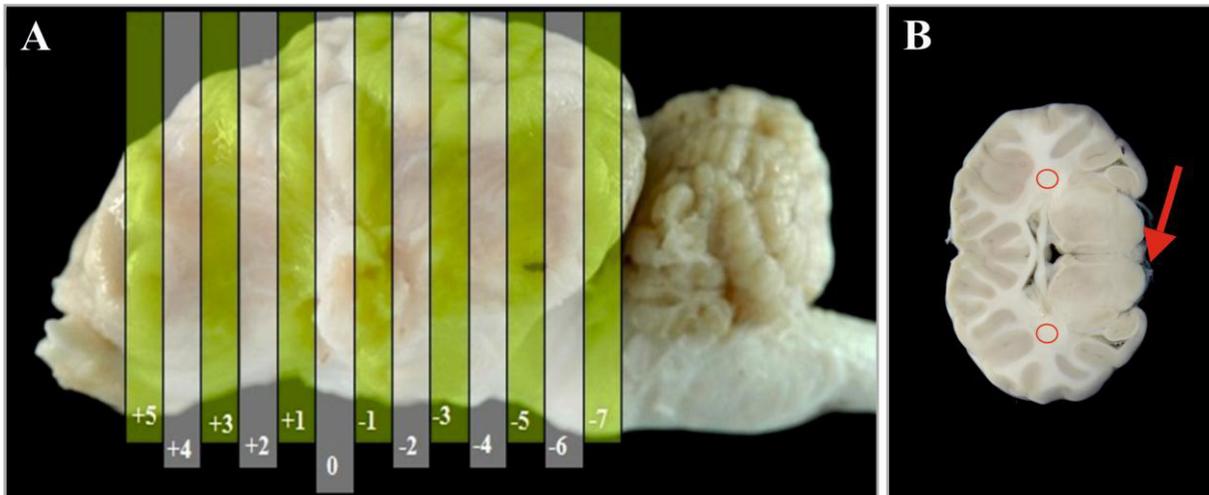
Die Aufarbeitung der histologischen Gewebeschnitte erfolgte in mehreren Arbeitsschritten: Die nach der Euthanasie entnommenen Gewebeproben der Organe wurden entwässert, in Paraffin eingebettet, geschnitten, gefärbt und anschließend eingedeckt. Die entnommenen Gehirne wurden nach der Fixierung in 4% PFA zunächst lamelliert. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt, gefärbt und eingedeckt.

### **3.5.8.1 Herstellung der Paraffinschnitte**

Für die Herstellung der paraffinierten Schnitte wurden die nach der Entnahme in 4% PFA fixierten Organproben in ca. 1 cm x 1 cm x 0,3 cm große Stücke geschnitten und in Einbettkassetten überführt. Anschließend wurde eine automatisierte Entwässerung durch den Entwässerungsautomat Leica TP1020 durchgeführt (s. Tabelle 39 im Anhang). Danach wurden die Proben in Paraffinblöcken mittels der Paraffinausgießstation (Leica EG1150H) gegossen. Hierfür wurde das Paraffin auf 65°C erwärmt. Die Ausgießförmchen wurden unter den Dispenser (Teil des Gerätes) gestellt und bis zu 1/3 mit Paraffin gefüllt. Anschließend wurden die Einbettkassetten mittels einer Pinzette aus der Kassettenwanne (Teil des Gerätes) entnommen und geöffnet. Die Gewebeproben wurden in die Ausgießförmchen überführt und diese anschließend auf den Kühlspot (Teil des Gerätes) platziert. Das Gewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette auf den Boden des Ausgießförmchens angedrückt, bis es haften blieb. Das Unterteil der Einbettkassette wurde wieder auf das Ausgießförmchen gelegt und dieses mit Paraffin vollständig aufgefüllt. Zum Auskühlen wurden die Förmchen auf eine Auskühlplatte überführt. Nach dem Anfertigen der Paraffinblöcke wurden je Block 5 nachfolgende Gewebeschnitte mittels eines Mikrotoms mit einer Schnittdicke von 3 µm geschnitten, im heißen Wasserbad (Leica HI1210) bei 43°C gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden danach bei 56°C auf dem Paraffinstrecktisch Leica HI1220 getrocknet.

### **3.5.8.2 Probenaufarbeitung und Lamellieren der Gehirne**

Die Schafhirne wurden nach der Entnahme und Fixierung fotografiert und in Lamellen zugeschnitten. Dafür wurde die mittlere Zerebralarterie (MCA) identifiziert und hier der erste Sagittalschnitt durchgeführt. Ausgehend von diesem Schnitt wurden sowohl in kranialer als auch in kaudaler Richtung in einem Abstand von 0,4 cm weitere Sagittalschnitte (Lamellen) angefertigt. Für die weitere Identifizierung der Lamellen wurden diese nach dem in Abbildung 14 A folgendem Schema benannt: Die erste Lamelle in kaudaler Richtung der MCA wurde als Lamelle 0 benannt, alle weiteren in kaudaler Richtung geschnittenen Lamellen wurden aufsteigend numerisch mit negativen Vorzeichen bezeichnet. In kranialer Richtung geschnittenen Lamellen wurden aufsteigend numerisch mit positiven Vorzeichen benannt.



**Abbildung 14: Schema des Lamellierens eines Schafhirns**

**A:** Die Lamelle 0 entspricht der ersten Lamelle kaudal der MCA. Jede weitere Lamelle in kaudaler Richtung wurde aufsteigend numerisch mit negativen, die Lamellen in kranialer Richtung mit positiven Vorzeichen benannt. **B:** Hirnlamelle nach Zuschnitt. Die roten Kreise markieren die geplante Position der transplantierten fhNPZ im Hirnparenchym. MCA = mittlere Zerebralarterie (s. roter Pfeil); Bildquelle: Elfi Quente

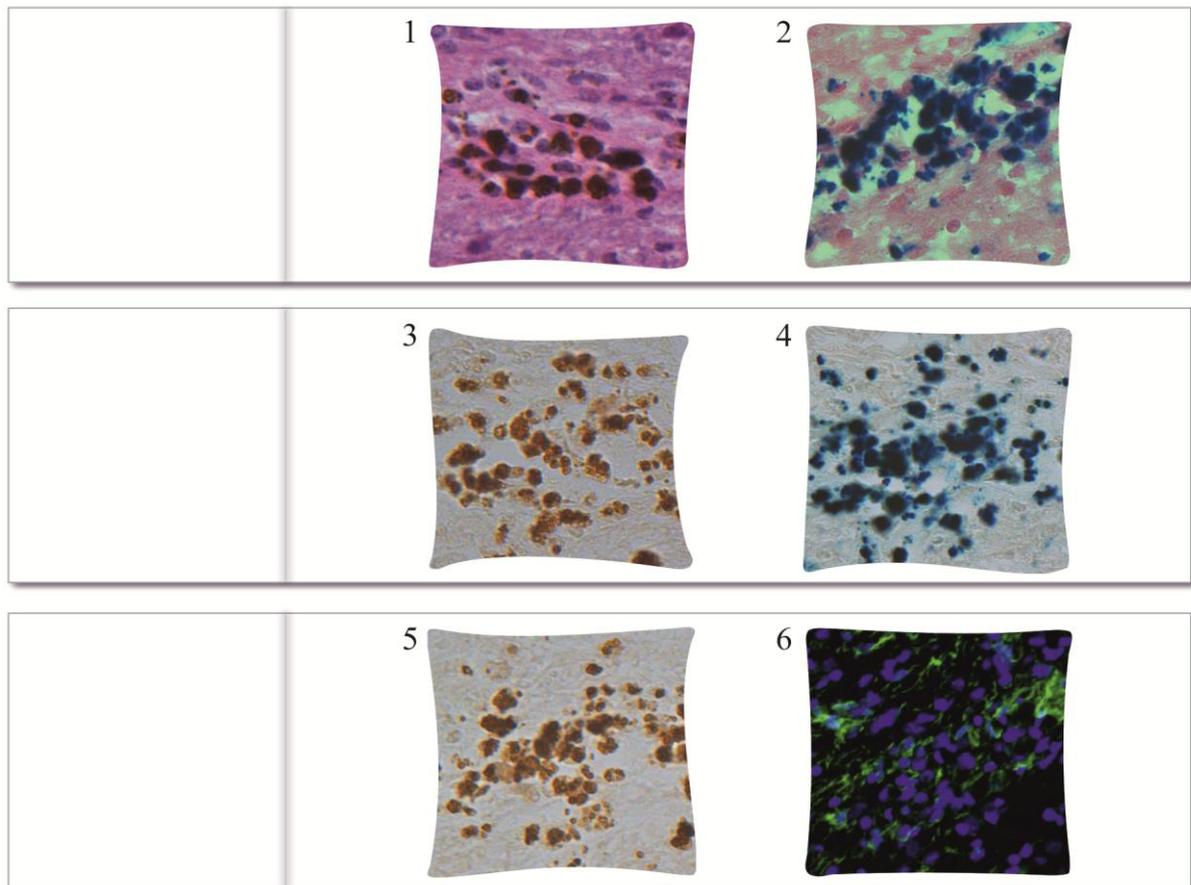
Anschließend wurden alle Lamellen von der kranialen und kaudalen Seite fotografiert. Danach wurden diese in 30%iges D(+)-Saccharose/Natriumazid überführt und bei 4°C gelagert. Nach 3 Tagen erfolgte der Zuschnitt der Lamellen in ca. 1 cm x 1 cm x 0,4 cm große Stücke. Daraufhin wurde eine Kryokonservierung in -65°C kaltem 2-Methylbutan für 15 s durchgeführt.

### 3.5.8.3 Herstellung der Gefrierschnitte

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte im Kryostat Leica CM3050 S. Dabei betrug die Kammertemperatur -23°C und die Objekttemperatur -21°C. Die kryokonservierten Gewebestücke wurden auf einen Objektträger mittels Gefriereinbettmedium aufgefroren. Anschließend wurden 50 Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und bei -20°C gelagert.

### 3.5.9 Histologische Färbungen

Für die histologischen Färbungen wurden von jeder Organprobe je ein Schnitt in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-, Berliner Blau (BB)- und Fouchét-Färbung angefertigt. Die Fouchét-Färbung entspricht einer modifizierten Van Gieson-Färbung. Hierbei wird das Gallepigment Bilirubin durch Trichloressigsäure und Eisen-(III)-Chlorid zu Biliverdin oxidiert und so als grünliches Farbprodukt sichtbar. Von den Gefrierschnitten der Schafhirne wurden die Lamellen, die auf den 3,0 T MRT-Aufnahmen ein eisenpositives Signal aufwiesen (vgl. Abbildung 13), BB gefärbt. Bei den positiven Arealen (blaue Pigmente im Mikroskop sichtbar) wurden Serienschnitte weiteren diagnostischen Färbungen unterzogen (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der gefärbten Serienschnitte auf den Objektträgern**

Bei eisenpositiven Befund in den MRT-Aufnahmen wurde von der jeweiligen Region Serienschnitte angefertigt, je 6 hintereinander und diese dann nachfolgend HE (1)-, BB (2)-, STEM101-DAB (3)-, STEM101-DAB + BB (4)-, Proben-NK-DAB (5)- und Iba1 (6)-gefärbt. BB = Berliner Blau-Färbung; HE = Hämatoxylin-Eosin; Iba1 = ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1; Proben-NK-DAB = Negativkontrolle, nur mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) gefärbt; STEM101 = monoklonaler Mäuseantikörper, der spezifisch an den humanen Ku80-Zellkernmarker bindet

Der erste Serienschnitt wurde zur Übersicht HE gefärbt (s. Kap. 3.5.9.1), der zweite Serienschnitt wurde BB gefärbt (vgl. Kap. 3.5.9.2) und der dritte Serienschnitt wurde STEM101-DAB gefärbt (s. Kap. 3.5.9.4). Bei der Immunmarkierung mit dem STEM101-Antikörper wird das ausschließlich im humanen Zellnukleus vorliegende Protein Ku80 markiert. Zur Visualisierung wird das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) nach der Markierung aufgetragen. Es entstehen dabei braune, wasserunlösliche Niederschläge. So kann mittels eines Lichtmikroskops eine Unterscheidung zwischen humanen und tierischen Zellkernen vorgenommen werden (s. Abbildung 28). Über diese Methode können vitale transplantierte fhNPZ im Schafhirn nachgewiesen werden. Der vierte Serienschnitt wurde mit STEM101-DAB und BB gefärbt (s. Kap. 3.5.9.4). Anschließend wurde ein Serienschnitt ohne Primärantikörper, nur mit DAB als Proben-Negativkontrolle gefärbt. Der letzte Schnitt wurde mit dem Iba1-Antikörper markiert (vgl. Kap. 3.5.9.5).

Das Protein Iba1 stellt einen Marker in entzündlichen Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen dar. Es wird vor allem im Gehirn in Mikrogliazellen, aber auch in aktivierten Makrophagen während Entzündungsreaktionen exprimiert. Über die Markierung des Proteins Iba1 mittels eines Primär- und

eines Sekundärantikörpers können aktivierte Mikrogliazellen durch ein Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Die angewendeten Färbe- und Markierungsprotokolle werden im Anhang (s. Kap. 9.2.2) aufgeführt.

### **3.5.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurde mit Hilfe des Färbeautomaten Leica ST5010 Autostainer XL durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte dieses Gerätes sind im Anhang in der Tabelle 40 aufgeführt. Anschließend wurden die gefärbten histologischen Präparate mit Hilfe des Entellan/Roti-Histo-Kit eingedeckt. Die Gefrierschnitte wurden ebenfalls nach dem in Tabelle 40 dargestellten Protokoll HE gefärbt. Hierbei wurde der Entparaffinierungsschritt mit Xylol ausgelassen.

### **3.5.9.2 Berliner Blau-Färbung**

Die Berliner Blau (BB)-Färbung wurde nach dem im Anhang in Tabelle 41 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Nach der Färbung der histologischen Präparate wurden diese mit Hilfe des Entellan/Roti-Histo-Kit eingedeckt.

### **3.5.9.3 Fouchét-Färbung**

Die Färbung wurde nach dem im Anhang in Tabelle 42 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mittels des Entellan/Roti-Histo-Kits eingedeckt.

### **3.5.9.4 Immunmarkierung mit STEM101-DAB und Berliner Blau-Färbung**

Der erste Serienschnitt wurde zur Übersicht mit HE gefärbt (s. Kap. 3.5.9.1), der zweite Serienschnitt wurde BB gefärbt. Der dritte Serienschnitt wurde mit STEM101-DAB gefärbt (s. im Anhang Tabelle 43 ohne den Arbeitsschritt BB-Färbung), während der vierte Serienschnitt mit STEM101-DAB und BB gefärbt wurde (s. Tabelle 43). Anschließend wurde ein Serienschnitt ohne Primärantikörper, nur mit N-Histofine Simple Stain Max PO und DAB als Negativkontrolle gefärbt. Statt des Primärantikörpers (Mouse anti STEM101 1:50) wurde Blockpuffer (Tris-Waschpuffer + 5% Eselserum) verwendet (s. Tabelle 43 ohne den Arbeitsschritt BB-Färbung). Der letzte Schnitt wurde mit dem Iba1-Antikörper markiert. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mittels des Entellan/Roti-Histo-Kits eingedeckt.

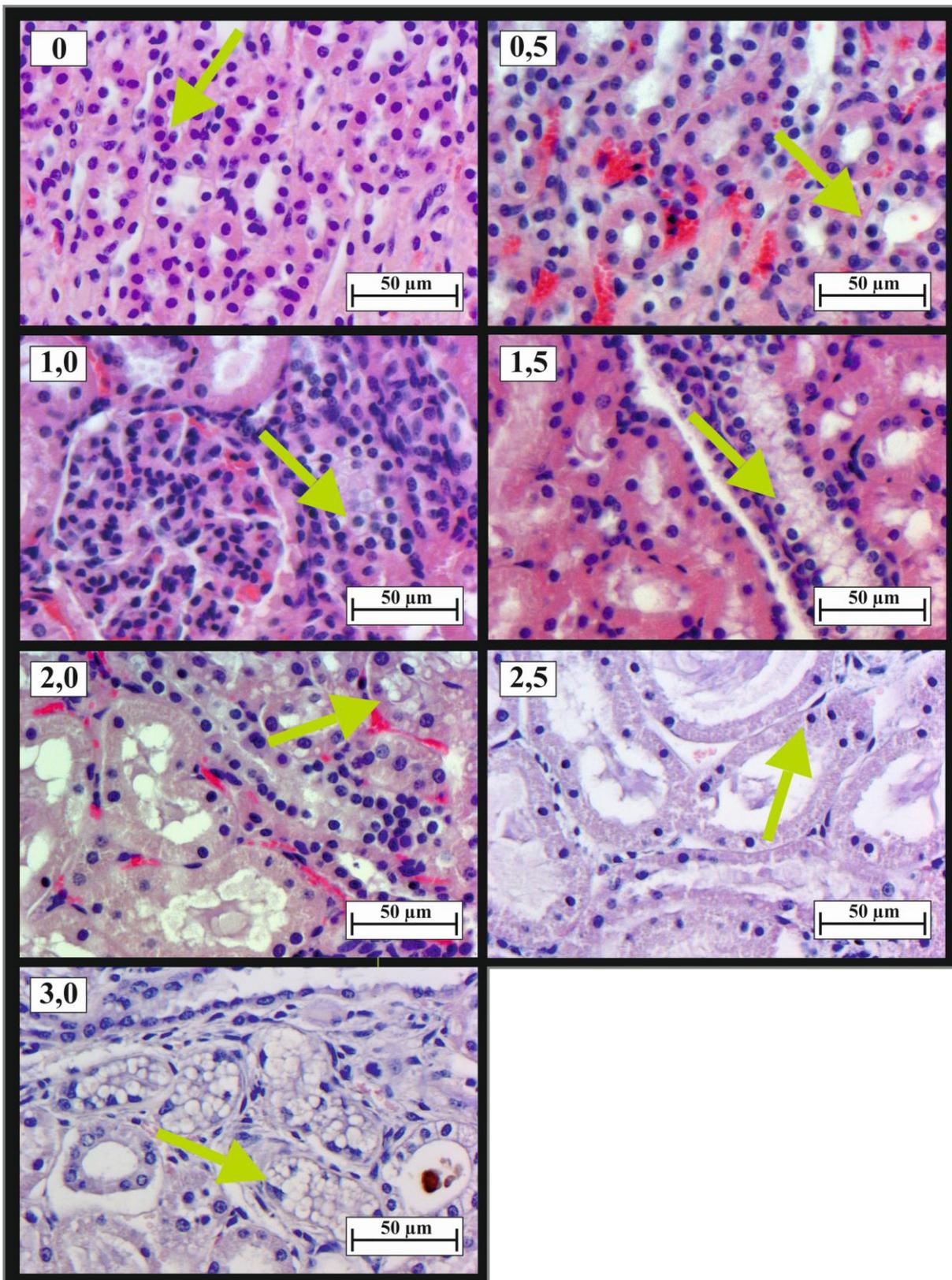
### **3.5.9.5 Immunhistologische Markierung mit Iba1-Antikörpern**

Zur Darstellung der Mikrogliazellen im vorliegenden Versuch wurden die Gefrierschnitte der Schafhirne nach dem im Anhang in Tabelle 44 aufgeführten Protokoll gefärbt. Anschließend wurden sie feucht mit DAKO Mounting Medium eingedeckt.

### 3.5.10 Auswertung der histologischen Präparate

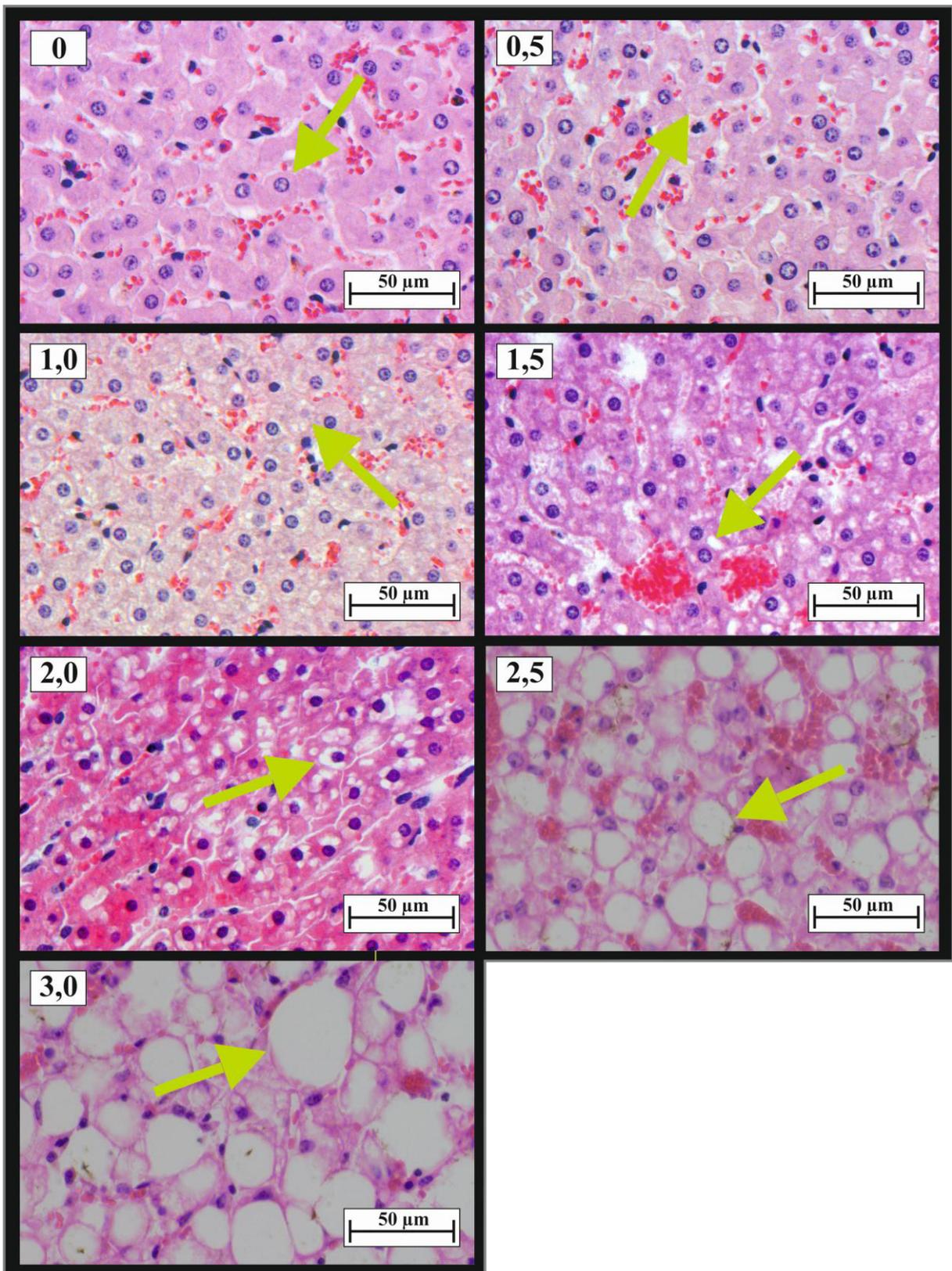
Für die Auswertung der histologischen Präparate wurden alle Schnitte von einer unabhängigen Person verblindet. Die histologischen Schnitte von Leber und Nieren wurden nach Zeichen degenerativer Prozesse bewertet. Hierbei wurden jeweils gesunde Hepatozyten und gesunde Nierentubulusepithelzellen definiert (vgl. Abbildung 16 0 und Abbildung 17 0). Anschließend wurden die Präparate nach den in Abbildung 16 und Abbildung 17 festgelegten Kriterien mit unterschiedlichen Graden der Zelldegeneration bewertet, wobei als degenerative Prozesse Pigmenteinlagerungen, Verfettung, hydrophische Degeneration und Nekrosen definiert wurden. Die Bewertung dieser Präparate wurde unter unabhängiger Aufsicht, verblindet und in Rücksprache mit Frau Dr. med. vet. Kristin Müller, Fachtierärztin für Pathologie, durchgeführt. Die BB und Fouchét gefärbten Präparate wurden mittels des Axio Scan.Z1 in der Vergrößerung 200 eingescannt und anschließend wurde mittels der ZEN Mikroskopsoftware von Zeiss ein Histogramm erstellt. Dadurch konnte quantitativ der Farbanteil Blau bei der BB-Färbung (je höher der Blau-Wert, desto größer der Anteil des Blutabbauprodukts Hämosiderin) und der Farbanteil Grün bei der Fouchét-Färbung (je höher der Grün-Wert, desto größer der Anteil des Gallenpigments Bilirubin) bestimmt werden.

Für die Auswertung der Gehirn-Schnitte wurden zunächst die in den 3,0 T MRT-Aufnahmen Eisen enthaltenden Lamellen in der BB-Färbung (blau angefärbte Eisenpigmente) analysiert. Bei positivem Befund wurden die weiteren Färbungen der jeweiligen Serienschnitte durchgeführt und analysiert (s. Kap. 3.5.9). Das Augenmerk der Untersuchungen lag hierbei auf der Detektion STEM101 positiver Areale und dem Auffinden intakter humaner Zellkerne. Dies erfolgte mittels des Mikroskops Axio Imager A.1 von Zeiss. Wurden STEM101 positive Areale gefunden, wurden diese mittels des Fluoreszenzmikroskops Nikon eclipse Ti zusätzlich auf das Vorhandensein von Mikrogliazellen (s. Iba1-Färbung in Kap. 3.5.9.5) analysiert.



**Abbildung 16: Bewertungsschlüssel für die Beurteilung der Nierentubulusepithelzellen**

**0:** ObB, degenerative Prozesse nicht nachweisbar. **0,5:** Degenerative Prozesse angedeutet nachweisbar. **1,0:** Degenerative Prozesse ggr. nachweisbar. **1,5:** Degenerative Prozesse ggr.-mgr. nachweisbar. **2,0:** Degenerative Prozesse mgr. nachweisbar. **2,5:** Degenerative Prozesse mgr.-hgr. nachweisbar. **3,0:** Degenerative Prozesse hgr. nachweisbar. ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; obB = ohne besonderen Befund



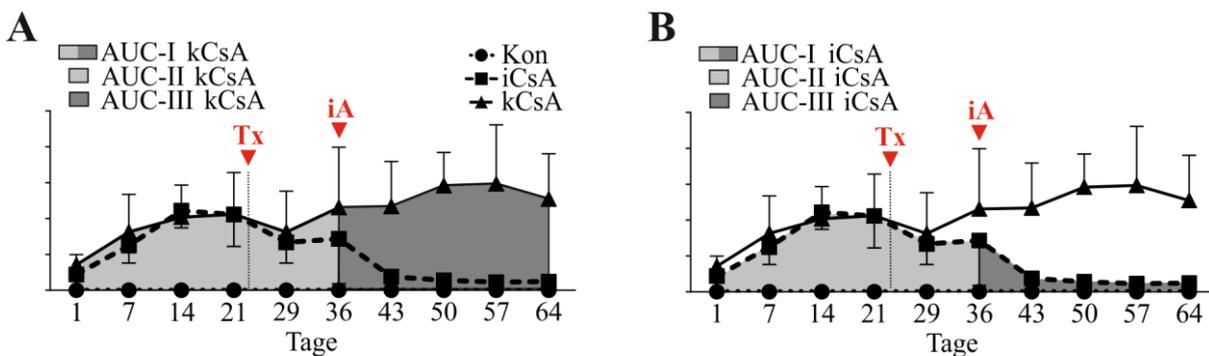
**Abbildung 17: Definition des Bewertungsschlüssels für die Beurteilung der Hepatozyten**

**0:** ObB, degenerative Prozesse nicht nachweisbar. **0,5:** Degenerative Prozesse angedeutet nachweisbar. **1,0:** Degenerative Prozesse ggr. nachweisbar. **1,5:** Degenerative Prozesse ggr.-mgr. nachweisbar. **2,0:** Degenerative Prozesse mgr. nachweisbar. **2,5:** Degenerative Prozesse mgr.-hgr. nachweisbar. **3,0:** Degenerative Prozesse hgr. nachweisbar. ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; mgr. = mittelgradig; obB = ohne besonderen Befund

### 3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad® Software, Inc., USA). Mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests und des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Daten wurden die Gruppen über den einfaktoriellem ANOVA (1-Way-ANOVA) als Signifikanztest, über den Bonferroni Test oder den T-Test auf Signifikanzen und Tendenzen hin analysiert. Als signifikant wurden p-Werte von  $p < 0,05$  gewertet, während  $p < 0,01$  als hochsignifikant angesehen wurden. Ein Trend wurde als  $0,05 \leq p < 0,1$  definiert. Bei nicht normalverteilten Daten wurden die Gruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und des Dunn-Mehrfachvergleichstests (*Dunn's multiple comparisons test*) oder eines ungepaarten T-Tests auf Signifikanzen bzw. Trends hin überprüft. Bei wiederholten Messungen wurde ein einfaktoriellem ANOVA mit wiederholten Messungen (RM-1-Way-ANOVA) durchgeführt.

In Tabelle 10 sind die bei der Auswertung der Daten angewendeten, verschiedenen, statistischen Tests als Übersicht erfasst. Es wurden pro Gruppe die Daten von jeweils 5 Tieren erhoben ( $n = 5$ ). Abweichungen in der Gruppenanzahl sind entsprechend durch ( $n = x$  [entspricht der tatsächlichen Gruppengröße]) in der zugehörigen Tabelle gekennzeichnet. Die Auswertung der CsA-Blutkonzentrationen, Körpertemperaturverläufe, Körpergewichte, mittleren arteriellen Blutdrücke und Blutparameter erfolgte durch die Berechnung von AUCs (*area under the curve*). Hierbei wurde die Fläche unter der jeweiligen Kurve ( $y = \text{Absolutwert}$ ;  $x = \text{Zeit}$ ) berechnet und statistisch ausgewertet. Es wurden zum einen die AUCs für den gesamten Versuchszeitraum von Tag 1 - 64 (AUC-I) berechnet und zum anderen je die AUCs für den Zeitraum Tag 1 - 36 (AUC-II), sowie für Tag 37 - 64 (AUC-III) (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Schema der Berechnung von AUCs**

**A:** Darstellung der Berechnung von AUCs für die kCsA. Hierbei wurde für die AUC-II die hellgraue Fläche (Tag 1 - 36) unter der Kurve berechnet, während für die AUC-III die dunkelgraue Fläche (Tag 37 - 64) unter der Kurve berechnet wurde. Die AUC-I errechnete sich aus der Addition von AUC-II und AUC-III (Tag 1 - 64). **B:** Darstellung der Berechnung von AUCs für die iCsA. Hierbei wurde für die AUC-II die hellgraue Fläche (Tag 1 - 36) unter der Kurve berechnet, während für die AUC-III die dunkelgraue Fläche (Tag 37 - 64) unter der Kurve berechnet wurde. Die AUC-I errechnete sich aus der Addition von AUC-II und AUC-III (Tag 1 - 64). AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation der Stammzellen

Die Aufteilung der Zeiträume erfolgte aus dem Grund, dass sowohl der intermittierenden Gruppe (iCsA), als auch der kontinuierlichen Gruppe (kCsA) bis zum Tag 36 2x tägl. CsA appliziert wurde (s. Tabelle 7). Durch die gleiche Behandlung konnten sie im Zeitraum AUC-II einer gemeinsamen Gruppe, nämlich der kCsA, zugeordnet werden. Dadurch konnte eine höhere Aussagekraft der statistischen Auswertung des Zeitraums AUC-II erreicht werden (Kon: n = 5, kCsA: n = 10).

Ab Tag 36 erhielten die beiden Gruppen eine unterschiedliche Behandlung und wurden deshalb im Zeitraum AUC-III gesondert gewertet (n = 5). Für den gesamten Versuchszeitraum AUC-I wurde jede Gruppe einzeln betrachtet und die statistische Auswertung erfolgte mit einer Gruppengröße von n = 5. Für die Bewertung der neurologischen Untersuchungsgänge wurden die Ergebnisse mittels des in Kap. 3.4.2.2 aufgeführten Bewertungsschlüssels (Score) beschrieben. Es erfolgte eine statistische Betrachtung über die Berechnung von AUCs (AUC-I, AUC-II und AUC-III) aus der Summe der Bewertungsschlüssel jedes Tieres am entsprechenden Versuchstag. Abweichungen von der Gruppengröße (n) bei der Auswertung sind in den jeweiligen Tabellen vermerkt.

Der Ausschluss von Rohdaten wurde aufgrund der geringen Gruppengröße biologisch begründet. Diese von der Statistik ausgeschlossenen Daten und dessen Gründe sind in der Tabelle 45 separat aufgeführt.

**Tabelle 10: Übersicht der statistisch angewandten Tests**

Zu testende Datensätze	Zeiträume	Zu vergleichende Gruppen	Normalverteilung	Angewandte Tests
Proliferationstests	0/4/24 h		+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
	48 h	Unmarkierte fhNPZ (n = 6)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
Vitalitätstests	0/4 h	1,5 mM (n = 6)	+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
	24/48 h	3,0 mM (n = 6) 6,0 mM (n = 6)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
T2-Relaxationszeit	0/24 h		+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
MRT-Daten der eisenmarkierten fhNPZ im Gehirn	Tag		+	1-Way-ANOVA, Bonferroni, RM-1-Way-ANOVA
	23/36/64	Kon (n = 5)		
	AUC-I	iCsA (n = 8)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
	AUC-II	kCsA (n = 10)		
	AUC-III		+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
Neurologische Untersuchungsgänge	AUC-I	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
	AUC-II	Kon (n = 5) kCsA (n = 10)	+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
	AUC-III	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
Albumin, ALP, Bilirubin, Kreatinin, CsA, Erythrozyten, Gesamtprotein, GGT, Hämoglobin, Harnstoff, Körpergewicht, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten	AUC-I	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
	AUC-II	Kon (n = 5) kCsA (n = 10)	+	ungepaarter T-Test
	AUC-III	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	+	1-Way-ANOVA, Bonferroni
ASAT, Kalzium, Chlorid, CK, Eosinophile Granulozyten, GLDH, Hämatokrit, Kalium, Körpertemperatur, LDH, Leukozyten, Magnesium, Natrium	AUC-I	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
	AUC-II	Kon (n = 5) kCsA (n = 10)	-	Mann-Whitney Test
	AUC-III	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
Mittlerer arterieller Blutdruck Narkose	min nach OP-Beginn	Kon/iCsA/kCsA (n = 5)	+	2-Way-ANOVA, Bonferroni
Organgewichte		Kon/iCsA/kCsA (n = 4)	-	1-Way-ANOVA, KWT, DMC
Histologie Organe			+	1-Way-ANOVA, Bonferroni

- = Daten nicht normalverteilt; + = Daten normalverteilt; 1-Way-ANOVA = einfaktorierter ANOVA; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; DMC = *Dunn's multiple comparisons test*; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; KWT = Kruskal-Wallis Test; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe; Normalitätstests: Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test; OP = Operation; RM-1-Way-ANOVA = einfaktorierter ANOVA mit wiederholten Messungen

## 4 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Dissertation besteht in der Beantwortung der in Kap. 2.4 aufgestellten Arbeitshypothesen. Dafür musste zunächst die Markierung der fhNPZ mit Eisenoxidnanopartikeln *in vitro*, ebenso wie deren Darstellung in MRT gestützten Verfahren erfolgreich etabliert werden. Daraufhin konnte im Tierversuch das Überleben der transplantierten fhNPZ in Abhängigkeit von der Langzeitapplikation des Immunsuppressivums CsA, sowie dessen Nebenwirkungen eruiert werden.

### 4.1 Nachweis eisenmarkierter fhNPZ *in vitro* via MRT-Aufnahmen

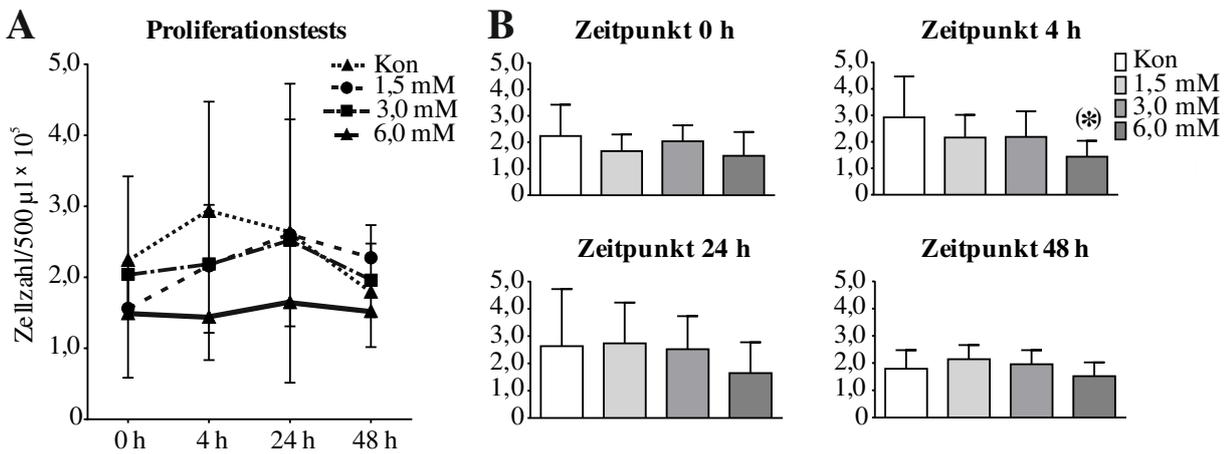
#### 4.1.1 Welche Eisenkonzentration ist für die Markierung der fhNPZ am geeignetsten?

Die geeignete Konzentration für die Markierung der fhNPZ mittels Eisenoxidnanopartikeln wurde im Hinblick auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten der markierten Zellen im Vergleich zu unmarkierten Zellen (Kon) eruiert. Die Auswertung des Proliferationsverhaltens nach Eisenmarkierung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle (Kon, unmarkierte fhNPZ) und den in verschiedenen Konzentrationen (1,5/3,0/6,0 mM) eisenmarkierten fhNPZ (s. Tabelle 11 und Abbildung 19). Zum Zeitpunkt 4 h nach der Eisenmarkierung konnte jedoch eine tendenziell kleinere Zellzahl der 6,0 mM im Vergleich zur Kon festgestellt werden.

**Tabelle 11: Auswertung der Proliferationstests zu verschiedenen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung**

Gruppe (n = 6)	0 h (ZZ x 10 <sup>5</sup> )	4 h (ZZ x 10 <sup>5</sup> )	24 h (ZZ x 10 <sup>5</sup> )	48 h (ZZ x 10 <sup>5</sup> )
<b>Kon</b>	2,2 ± 1,2	2,9 ± 1,6	2,6 ± 2,1	1,8 ± 0,7
<b>1,5 mM</b>	1,7 ± 0,6	2,2 ± 0,9 (n = 5)	2,7 ± 1,5	2,2 ± 0,5
<b>3,0 mM</b>	2,0 ± 0,6	2,2 ± 1,0	2,5 ± 1,2	2,0 ± 0,5
<b>6,0 mM</b>	1,5 ± 0,9	1,4 ± 0,6 <sup>(*)</sup>	1,7 ± 1,1	1,5 ± 0,5

<sup>(\*)</sup> = 0,05 ≥ p < 0,1 zur Kon; 0/4/24/48 h = Zeitpunkt der Proliferationstests nach Eisenmarkierung; 1,5/3,0/6,0 mM = fhNPZ markiert mit 1,5/3,0/6,0 mM VSOP-Stammlösung; h = Stunde; Kon = unmarkierte Zellen; mM = Millimolar; ms = Millisekunde; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe; ZZ = Zellzahl/500 µl



**Abbildung 19: Proliferationstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung**

**A:** Lineare Darstellung der Zellzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung der fhNPZ mit verschiedenen VSOP-Konzentrationen (1,5 mM, 3,0 mM und 6,0 mM). **B:** Direkter Vergleich der Proliferationsleistung zwischen den mit unterschiedlichen Konzentrationen eisenmarkierten fhNPZ zu definierten Zeitpunkten nach der Markierung. (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; 0 h = unmittelbar nach Eisenmarkierung; 1,5 mM = mit 1,5 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; 3,0 mM = mit 3,0 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; 6,0 mM = mit 6,0 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; h = Stunde nach Eisenmarkierung; Kon = unmarkierte Zellen

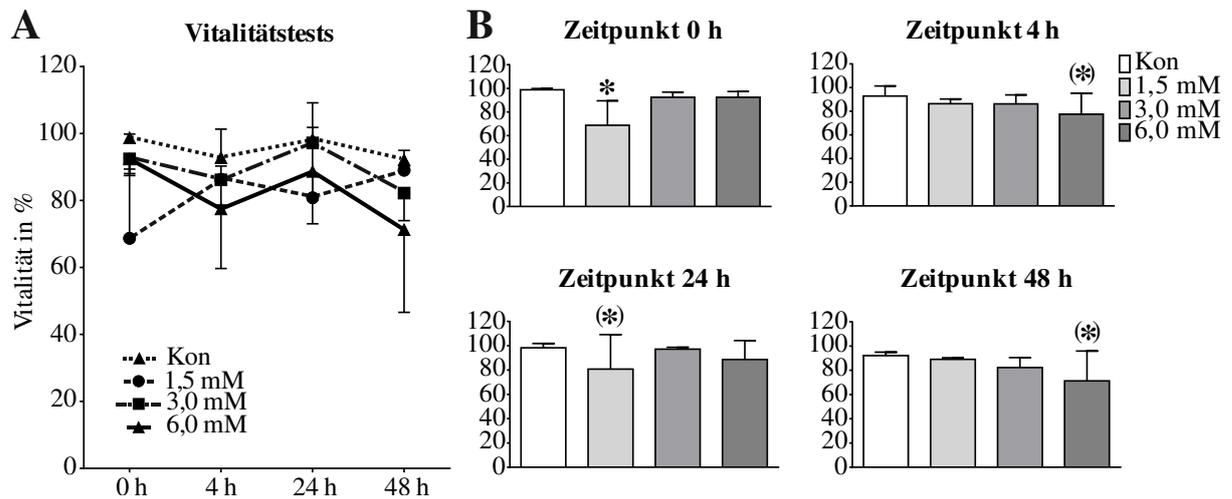
Die Auswertung der Vitalitätstests ergab zum Zeitpunkt 0 h eine signifikant niedrigere Vitalität der mit 1,5 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierten Zellen (1,5 mM) im Vergleich zur Kon ( $p < 0,05$ ) (vgl. Tabelle 12 und Abbildung 20). 24 h nach der Markierung zeigte die 1,5 mM eine tendenziell niedrigere Vitalität im Vergleich zur Kon ( $0,05 \geq p < 0,1$ ). Die 6,0 mM zeigte zu den Zeitpunkten 4 h und 48 h eine tendenziell niedrigere Vitalität im Vergleich zur Kon ( $0,05 \geq p < 0,1$ ). Die mit 3,0 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierten Zellen unterschieden sich in ihrer Vitalität zu keinem Zeitpunkt von der Kon.

Diese Ergebnisse führten dazu, dass sowohl für die *In-vitro*-Versuche mit Gelphantomen, als auch für die *In-vivo*-Transplantationsversuche am Schaf fhNPZ mit einer Eisenkonzentration von 3,0 mM verwendet wurden.

**Tabelle 12: Auswertung der Vitalitätstests zu verschiedenen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung**

Gruppe (n = 6)	0 h (%)	4 h (%)	24 h (%)	48 h (%)
<b>Kon</b>	98,7 ± 1,1 (n = 3)	92,8 ± 8,5	98,3 ± 3,5	92,1 ± 2,8
<b>1,5 mM</b>	68,7 ± 20,7 * (n = 3)	86,3 ± 4,0 (n = 5)	80,1 ± 28,4 (*)	89,1 ± 1,3
<b>3,0 mM</b>	92,4 ± 4,4 (n = 3)	86,2 ± 7,7	97,2 ± 1,5	82,2 ± 8,2
<b>6,0 mM</b>	92,4 ± 5,0 (n = 3)	77,5 ± 17,8 (*)	88,7 ± 15,6	71,3 ± 24,7 (*)

\* =  $p < 0,05$  zur Kon; (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; 0/4/24/48 h = Zeitpunkt der Proliferationstests nach Eisenmarkierung; 1,5/3,0/6,0 mM = fhNPZ markiert mit 1,5/3,0/6,0 mM VSOP-Stammlösung; h = Stunde; Kon = unmarkierte Zellen; mM = Millimolar; ms = Millisekunde; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 20: Vitalitätstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung**

**A:** Lineare Darstellung der Zellvitalität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung der fhNPZ mit verschiedenen VSOP-Konzentrationen (1,5 mM, 3,0 mM und 6,0 mM). **B:** Direkter Vergleich der Vitalität zwischen den mit unterschiedlichen Konzentrationen eisenmarkierten fhNPZ zu definierten Zeitpunkten nach der Markierung. \* =  $p < 0,05$  zur Kon; (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; 0 h = unmittelbar nach Eisenmarkierung; 1,5 mM = mit 1,5 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; 3,0 mM = mit 3,0 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; 6,0 mM = mit 6,0 mM VSOP-Stammlösung eisenmarkierte Zellen; h = Stunde nach Eisenmarkierung; Kon = unmarkierte Zellen

#### 4.1.2 Können markierte fhNPZ durch eine T2-gewichtete MRT-Sequenz dargestellt werden?

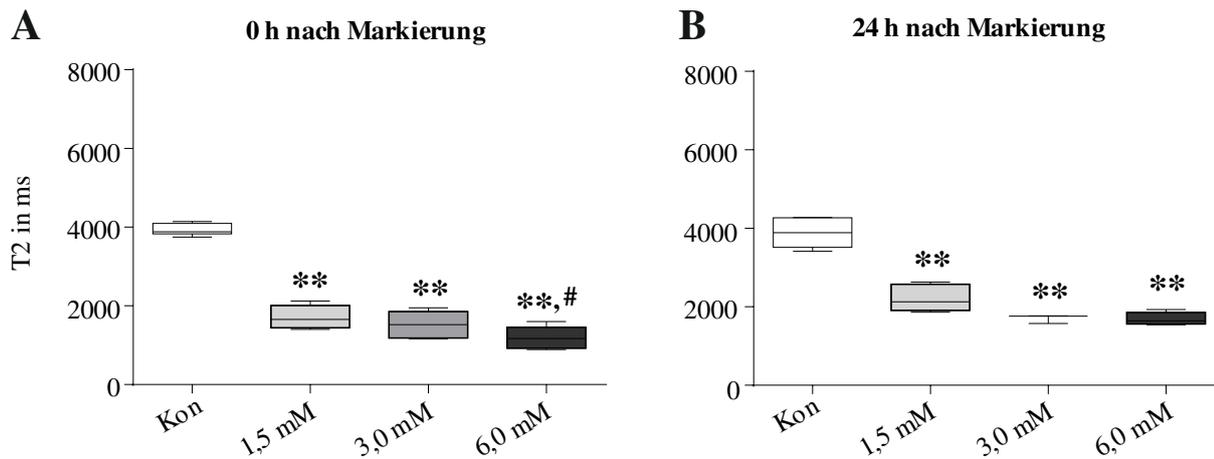
Um die fhNPZ *in vivo* im Verlauf des Langzeitversuchs nach Transplantation im Schafhirn nachweisen zu können, musste zunächst die Darstellbarkeit der markierten Zellen im Vergleich zu unmarkierten Zellen (Kon) im MRT mittels einer T2-gewichteten Sequenz gewährleistet werden.

Die Auswertung der Untersuchung im NMR-Relaxometer ergab eine hochsignifikante Verkürzung der T2-Relaxationszeit der 1,5 mM, 3,0 mM und der 6,0 mM gegenüber der Kon zu beiden gemessenen Zeitpunkten (0 h und 24 h nach Eisenmarkierung) mit  $p < 0,01$ . Die T2-Relaxationszeit der 1,5 mM war zum Zeitpunkt 0 h nach der Eisenmarkierung signifikant länger als die der 6,0 mM ( $p < 0,05$ ) (s. Tabelle 13 und Abbildung 21). Diese unterschiedlichen Relaxationszeiten ermöglichen eine differenzierte Darstellung von eisenmarkierten fhNPZ im Vergleich zu normalem Hirngewebe durch eine T2-gewichtete SWI-Sequenz.

**Tabelle 13: Auswertung der T2-Relaxationszeit 0 h und 24 h nach Eisenmarkierung**

Gruppe (n = 6)	0 h nach Markierung (ms)	24 h nach Markierung (ms)
<b>Kon</b>	3934,0 ± 147,8	3882,0 ± 393,0
<b>1,5 mM</b>	1711,0 ± 306,1 **	2208,0 ± 342,4 **
<b>3,0 mM</b>	1529,0 ± 355,3 **	1704,0 ± 108,9 ** (n = 3)
<b>6,0 mM</b>	1194,0 ± 309,0 **,#	1688,0 ± 166,7 ** (n = 4)

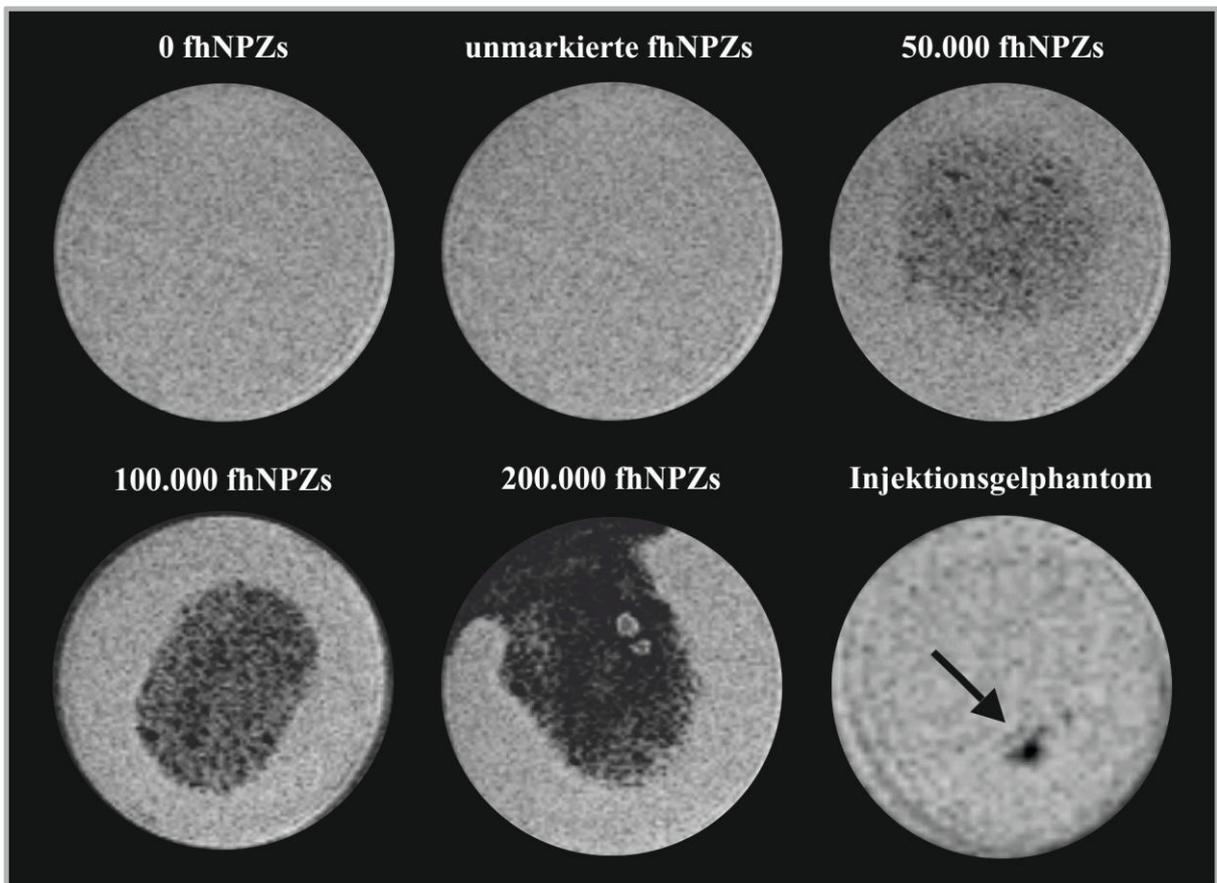
\*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; # =  $p < 0,05$  zur 1,5 mM; 1,5/3,0/6,0 mM = fhNPZ markiert mit 1,5/3,0/6,0 mM VSOP-Stammlösung; h = Stunde; Kon = unmarkierte Zellen; mM = Millimolar; ms = Millisekunde; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Abbildung 21: Darstellung der T2-Zeitkonstante 0 h und 24 h nach Eisenmarkierung**

Die T2-Relaxationszeit entspricht der Zeit, zu der die transversale Magnetisierung auf 37% ihres Wertes nach Anregung abgefallen ist. **A:** Die T2-Relaxationszeit der mit unterschiedlichen Konzentrationen (1,5/3,0/6,0 mM) eisenmarkierten fhNPZ direkt nach der Markierung. **B:** Die T2-Relaxationszeit der mit unterschiedlichen Konzentrationen (1,5/3,0/6,0 mM) eisenmarkierten fhNPZ 24 h nach der Markierung. \*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; # =  $p < 0,05$  zur 1,5 mM; 1,5/3,0/6,0 mM = fhNPZ markiert mit 1,5/3,0/6,0 mM VSOP-Stammlösung; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; h = Stunde; Kon = unmarkierte Zellen; mM = Millimolar; ms = Millisekunde

#### 4.1.3 Wo liegt das Detektionslimit markierter fhNPZ in einer T2-gewichteten MRT-Sequenz?

Die Transplantation von markierten Stammzellen im Tierversuch erfordert zur Evaluierung des Transplantationserfolges nicht nur eine medizinisch, sondern auch eine technisch begründete Menge der zu transplantierenden fhNPZ. Hierbei spielt vor allem das Detektionslimit der transplantierten Zellen in MRT-Aufnahmen eine entscheidende Rolle. Bei den Schichtgelphantomen war eine Zellmenge eisenmarkierter fhNPZ ab 50.000 fhNPZ pro Schicht mittels einer SWI-Sequenz im MRT sicher mit dem Auge erkennbar (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22: Darstellung der eisenmarkierten fhNPZ mittels 3,0 T MRT in Schichtgelphantomen**

Die eisenmarkierten fhNPZ sind über ein schwarzes Signal in der SWI-Sequenz detektierbar. Die Signalstärke nimmt mit steigender Zellzahl zu. Im Vergleich zu den Schichtgelphantomen ist rechts die Darstellung von eisenmarkierten fhNPZ in Injektionsgelphantomen gezeigt (s. Pfeil). 0 fhNPZ = keine fhNPZ in dem Gelphantom; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; SWI = suszeptibilitätsgewichtete Sequenz

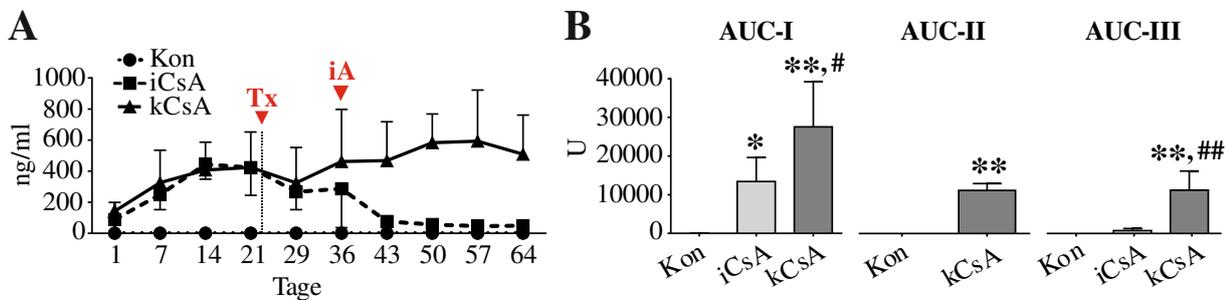
## 4.2 Der Einfluss des Immunsuppressivums CsA auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im Schafhirn

Die Evaluierung der Langzeitapplikation von dem Immunsuppressivum CsA und dessen Auswirkungen auf das Überleben der transplantierten fhNPZ erforderte zunächst die Überwachung der Wirkspiegel in den jeweiligen Gruppen (Kon, iCsA und kCsA). So konnten die Untersuchungen zum Verhalten der transplantierten fhNPZ *in vivo* mittels MRT-Aufnahmen und *ex vivo* durch die histologische Auswertung im Gruppenvergleich betrachtet werden.

### 4.2.1 Gibt es gruppenspezifische Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen?

Die Langzeitgabe von CsA in unterschiedlichen Applikationsregimen ergab signifikante Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen zwischen den Gruppen. Diese unterschiedlichen CsA-Konzentrationen der drei verschiedenen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum von 64 Tagen sind in Abbildung 23, A aufgeführt. In dieser Abbildung sind die absoluten Werte in ng/ml

angegeben. Für die statistische Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet und verglichen. Diese Werte sind in Tabelle 14 als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zu beachten ist hierbei, dass in AUC-II, sprich dem Versuchszeitraum Tag 1 - 36, die iCsA mit der kCsA aufgrund des bis dahin identischen Medikamentenregimes als kCsA zusammengefasst ausgewertet wurde.



**Abbildung 23: Darstellung der gruppenspezifischen CsA-Konzentrationen im Blut**

**A:** CsA-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der CsA-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; \* =  $p < 0,05$  zur Kon; ### =  $p < 0,01$  zur iCsA; # =  $p < 0,05$  zur iCsA; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

Bei der Quantifizierung der CsA-Blutkonzentration konnten folgende Unterschiede festgestellt werden: Über den gesamten Versuchszeitraum von 64 Tagen (AUC-I) konnte ein hochsignifikant niedrigerer CsA-Blutspiegel der Kontrollgruppe (Kon) im Vergleich zur kontinuierlichen Gruppe (kCsA) aufgezeigt werden ( $p < 0,01$ ). Die intermittierende Gruppe (iCsA) wies gegenüber der kCsA signifikant niedrigere CsA-Blutspiegel auf ( $p < 0,05$ ). Die Kon besaß im Vergleich zur iCsA ebenfalls signifikant niedrigere CsA-Blutkonzentrationen ( $p < 0,05$ ) (s. Tabelle 14 und Abbildung 23, B). Innerhalb des Zeitraumes Tag 1 - 36 (AUC-II) zeigten die Blutwerte eine hochsignifikant erniedrigte CsA-Konzentration der Kon, verglichen mit der kCsA ( $p < 0,01$ ).

Im Erhebungsbereich Tag 37 - 64 (AUC-III) lagen die CsA-Spiegel bei den Tieren der kCsA hochsignifikant höher als bei der Kon und iCsA ( $p < 0,01$ ). Zwischen der Kon und der iCsA konnte in diesem Zeitraum kein Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere Blutkonzentration (MBK) über den gesamten Zeitraum lag bei der kCsA bei  $424,0 \pm 135,0$  ng CsA/ml, während die maximal erreichte Blutkonzentration in dieser Gruppe bei  $593,0$  ng CsA/ml lag. Die iCsA hingegen zeigte eine deutlich niedrigere MBK (s. Tabelle 14).

**Tabelle 14: Auswertung der CsA-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

Gruppe (n = 5)	MBK gesamt (ng/ml)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	0,0 ± 0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
iCsA	198,5 ± 155,9	13421 ± 6210 *		743 ± 546
kCsA	424,0 ± 135,0 (max. 593,0)	27551 ± 11680 **.#	11221 ± 5573 ** (n = 10)	11229 ± 4982 **.#
MBK CsA in den verschiedenen Gruppen (n = 5)				
Tag	Kon (ng/ml)	iCsA (ng/ml)	kCsA (ng/ml)	
1	0,0 ± 0,0 (n = 4)	88,3 ± 89,5	141,9 ± 56,8	
7	0,0 ± 0,0	249,5 ± 97,2 *	326,0 ± 208,5 **	
14	0,0 ± 0,0	443,8 ± 95,6 ** (n = 4)	407,6 ± 179,0 **	
21	0,0 ± 0,0	423,0 ± 178,5 **	424,6 ± 232,3 **	
29	0,0 ± 0,0	267,4 ± 115,5 *	324,5 ± 228,3 ** (n = 4)	
36	0,0 ± 0,0	286,6 ± 250,3 *	462,0 ± 336,0 ** (n = 4)	
43	0,0 ± 0,0	75,7 ± 27,1 (n = 3)	467,8 ± 250,7 **.#	
50	0,0 ± 0,0	56,0 ± 52,0 (n = 3)	583,5 ± 184,7 **.# (n = 4)	
57	0,0 ± 0,0	46,2 ± 31,4 (n = 4)	593,0 ± 329,9 **.#	
64	0,0 ± 0,0	49,0 ± 17,4 (n = 3)	509,2 ± 251,7 **.#	

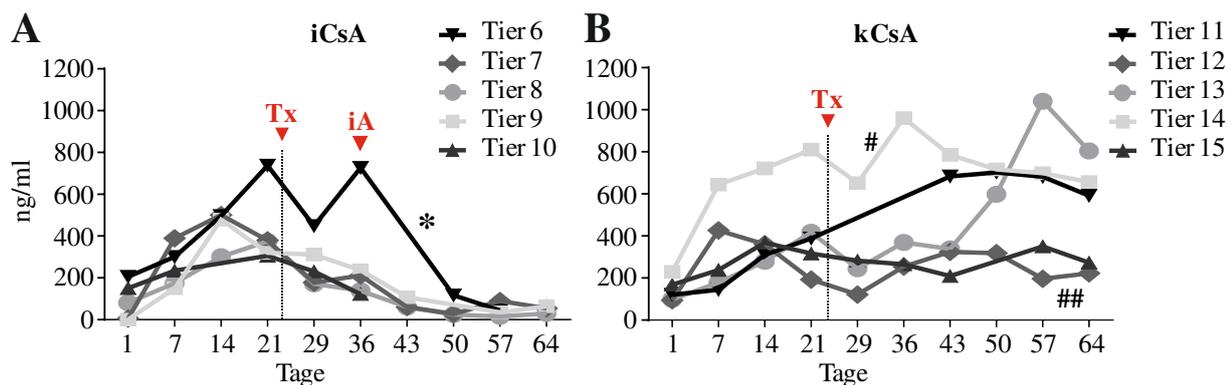
\*\* = p < 0,01 zur Kon; \* = p < 0,05 zur Kon; ## = p < 0,01 zur iCsA; # = p < 0,05 zur iCsA; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; max. = maximal erreichte Blutkonzentration; MBK CsA = die mittlere CsA-Blutkonzentration als Mittelwert und dessen Standardabweichung in der jeweiligen Gruppe; MBK gesamt = die mittlere CsA-Blutkonzentration berechnet aus allen Werten von Tag 1 - 64 als Mittelwert und dessen Standardabweichung in der jeweiligen Gruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

Bei der Betrachtung der individuellen CsA-Blutkonzentrationen innerhalb der iCsA und der kCsA konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren einer Gruppe festgestellt werden. In der iCsA war die durchschnittliche CsA-Blutkonzentration von Tier 6 signifikant höher als von Tier 8. Während in der kCsA der durchschnittliche CsA-Wirkspiegel von Tier 12 hochsignifikant niedriger und der von Tier 15 signifikant niedriger war als von Tier 14 (s. Tabelle 15 und Abbildung 24).

**Tabelle 15: Individuelle Unterschiede der CsA-Konzentration innerhalb der Gruppen**

Tier-Nr.	MBK gesamt der iCsA (ng/ml)	Tier-Nr.	MBK gesamt der kCsA (ng/ml)
6	384,0 ± 263,1 *	11	452,4 ± 244,1
7	189,4 ± 175,6	12	250,8 ± 106,0 ##
8	136,8 ± 121,9	13	436,5 ± 295,0
9	189,0 ± 158,6	14	687,0 ± 187,2
10	208,2 ± 73,02	15	274,3 ± 64,5 #

\* =  $p < 0,05$  zu Tier 8; ## =  $p < 0,01$  zu Tier 14; # =  $p < 0,05$  zu Tier 14; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; MBK gesamt = die mittlere CsA-Blutkonzentration berechnet aus allen Werten von Tag 1 - 64 als Mittelwert + Standardabweichung des jeweiligen Tieres

**Abbildung 24: Darstellung der individuellen Unterschiede der CsA-Blutkonzentration**

**A:** Darstellung der individuellen CsA-Blutkonzentrationen in der iCsA. **B:** Darstellung der individuellen CsA-Blutkonzentrationen in der kCsA; die statistische Auswertung bezieht sich auf die MBK berechnet aus allen Werten von Tag 1 - 64 als Mittelwert und Standardabweichung des jeweiligen Tieres. \* =  $p < 0,05$  zu Tier 8; ## =  $p < 0,01$  zu Tier 14; # =  $p < 0,05$  zu Tier 14; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; MBK = mittlere CsA-Blutkonzentration

#### 4.2.2 Besitzt die Transplantation fhNPZ einen neurologischen Einfluss auf die Sensorik und Motorik?

Für die statistische Untersuchung wurden die Ergebnisse der neurologischen Untersuchungsgänge mittels des in Kap 3.4.2.2 beschriebenen Bewertungsschlüssel (Score) bewertet.

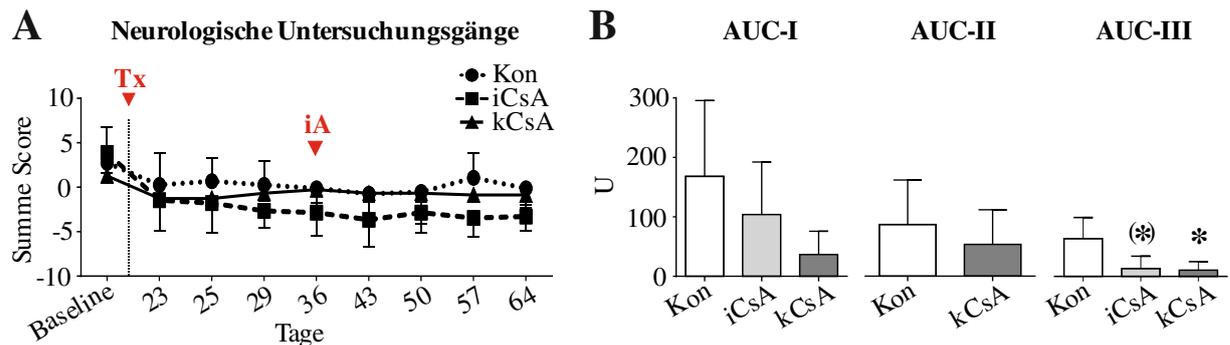
Die Auswertung der neurologischen Untersuchungsgänge im Gruppenvergleich ergab im Erhebungsraum AUC-III signifikant weniger neurologische Ausfälle der kCsA im Vergleich zur Kon ( $p < 0,05$ ) (vgl. Tabelle 16 und Abbildung 25 B). Die iCsA zeigte tendenziell geringere neurologische Ausfälle in dem erwähnten Zeitraum AUC-III ( $0,05 \geq p < 0,1$ ) im Vergleich zur Kon.

In den Zeiträumen AUC-I und AUC-II konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es konnten keine erhöhten Scores nach der Stammzelltransplantation im Vergleich zur Baseline (Mittelwert der Summe der Scores von der Freigabe bis zum Tag 21) eruiert werden (s. Abbildung 25 A).

**Tabelle 16: Auswertung der neurologischen Untersuchungsgänge**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	168,1 ± 127,6	86,7 ± 74,6	63,7 ± 35,4
iCsA	103,8 ± 88,5		13,3 ± 20,8 (*)
kCsA	36,7 ± 39,1	53,5 ± 57,9 (n = 10)	10,5 ± 14,4 *

\* =  $p < 0,05$  zur Kon; (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 25: Darstellung der Ergebnisse der neurologischen Untersuchungsgänge**

**A:** Auswertung der neurologischen Untersuchungsgänge über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich über die Summe der Bewertungsschlüssel (Score). Als Baseline wurde der Mittelwert der Summe der Scores von den Tagen vor der Transplantation (Freigabe und Tag 1 - 21) berechnet. **B:** Darstellung der Summe der Bewertungsschlüssel im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \* =  $p < 0,05$  zur Kon; (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe

### 4.2.3 Was geschieht mit den transplantierten fhNPZ im Zeitverlauf und Gruppenvergleich?

Die durch Eisenoxidnanopartikel verursachte Signalauslöschung der transplantierten fhNPZ konnte via 3,0 T MRT-Aufnahmen dargestellt und ausgemessen werden (vgl. Abbildung 13). Die Ausmessung ergab signifikant höhere Volumina in der kCsA gegenüber der iCsA an den Messtagen 1, 14 und 42 nach Transplantation ( $p < 0,05$ ) (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 26 A). Bei der Betrachtung der absoluten Volumenabnahme innerhalb der Gruppen konnte festgestellt werden, dass bei der Kon die Volumina an Tag 42 nach Transplantation tendenziell kleiner waren als an Tag 1 nach Transplantation ( $0,05 \geq p < 0,1$ ). Bei der iCsA waren die Volumina an Tag 42 nach Transplantation signifikant kleiner als an Tag 14 nach Transplantation ( $p < 0,05$ ). An Tag 14 nach Transplantation waren die Volumina der iCsA im Vergleich zu Tag 41 nach Transplantation tendenziell kleiner ( $0,05 \geq p < 0,1$ ). In der kCsA waren die Volumina sowohl an Tag 14, als auch an Tag 42 nach Transplantation signifikant kleiner als an Tag 1 nach Transplantation ( $p < 0,05$ ). Eine hochsignifikante Volumenabnahme konnte bei der kCsA zwischen Tag 14 und 42 nach Transplantation festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). Die Betrachtung der relativen Volumenabnahme im Zeitverlauf ergab keinen

signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (s. Tabelle 18 und Abbildung 26 B).

**Tabelle 17: Volumina eisenmarkierter Stammzellkumulate im Schafhirn im Gruppenvergleich**

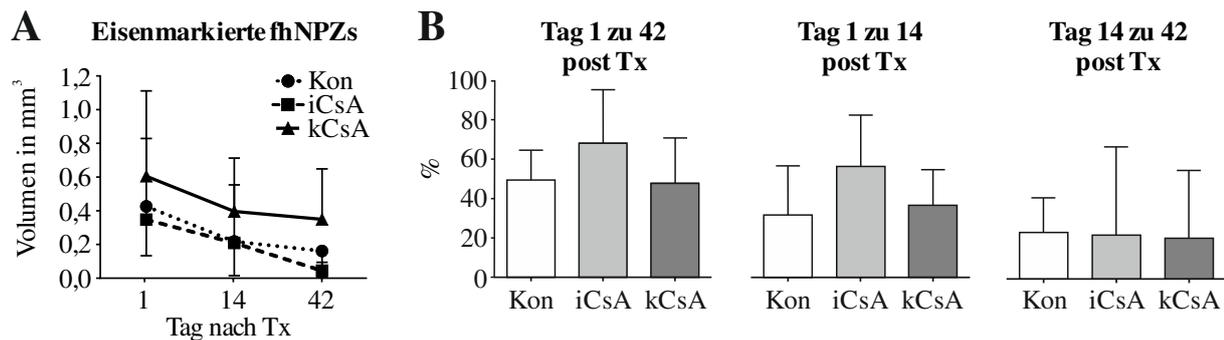
Gruppe	Tag 1 post Tx (mm <sup>3</sup> )	Tag 14 post Tx (mm <sup>3</sup> )	Tag 42 post Tx (mm <sup>3</sup> )
Kon (n = 5)	0,43 ± 0,30	0,30 ± 0,23	0,22 ± 0,19
iCsA (n = 8)	0,13 ± 0,08	0,06 ± 0,06	0,05 ± 0,05
kCsA (n = 10)	0,61 ± 0,51 <sup>#</sup>	0,40 ± 0,32 <sup>#</sup>	0,36 ± 0,30 <sup>#</sup>

<sup>#</sup> = p < 0,05 zur iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der ausgemessenen eisenmarkierten Stammzellkumulate pro Gruppe; Tx = Transplantation

**Tabelle 18: Die relative Volumenabnahme im Zeitverlauf und Gruppenvergleich**

Gruppe	Tag 1 zu 42 post Tx (%)	Tag 1 zu 14 post Tx (%)	Tag 14 zu 42 post Tx (%)
Kon (n = 5)	49,0 ± 15,3	31,4 ± 24,5	23,0 ± 17,6
iCsA (n = 8)	67,7 ± 27,0	55,8 ± 26,0	21,7 ± 44,9
kCsA (n = 10)	47,5 ± 22,9	36,4 ± 17,8	20,5 ± 33,8

iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der ausgemessenen eisenmarkierten Stammzellkumulate pro Gruppe; Tx = Transplantation



**Abbildung 26: Volumina eisenmarkierter Stammzellkumulate im Schafhirn**

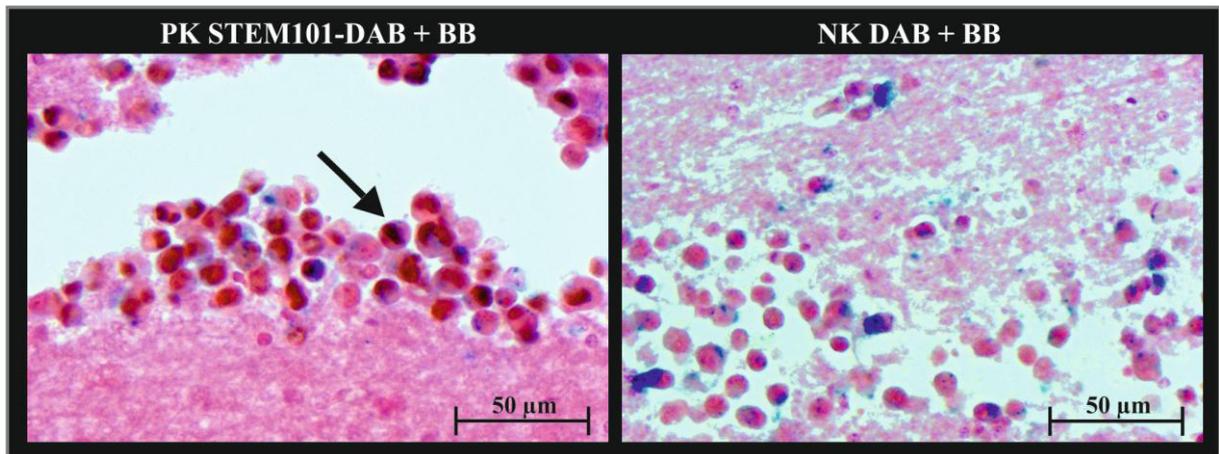
**A:** Darstellung der absoluten Volumina der eisenmarkierten Stammzellkumulate im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der relativen Volumenabnahme im Gruppenvergleich. fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

#### 4.2.4 Können vitale fhNPZ 42 Tage nach Transplantation im Schafhirn nachgewiesen werden?

Die Untersuchung der verschiedenen gefärbten histologischen Schnitte ergab, dass unabhängig von der Versuchsgruppe keine vitalen fhNPZ in den Schafhirnen 42 Tage nach der Transplantation aufgefunden werden konnten.

Zusätzlich wurden die Hirne von 3 Tieren auf vitale fhNPZ hin untersucht, die an Tag 1 nach Transplantation aufgrund von Narkosezwischenfällen verstorben waren und somit vom Versuch ausgeschlossen wurden. Bei diesen Tieren konnten an Tag 1 nach Transplantation ebenfalls keine vitalen Zellen im Hirn nachgewiesen werden. Zur Kontrolle beim Auffinden vitaler fhNPZ diente eine Probe von post mortem ins Schafhirn gespritzten eisenmarkierten fhNPZ, welche anschließend sofort

histologisch aufgearbeitet worden war. Die Positivkontrolle wurde STEM101-DAB und BB gefärbt, während die Färbung der Negativkontrolle nur mit DAB und BB erfolgte (s. Kap. 3.5.8, 3.5.9 und Abbildung 27).

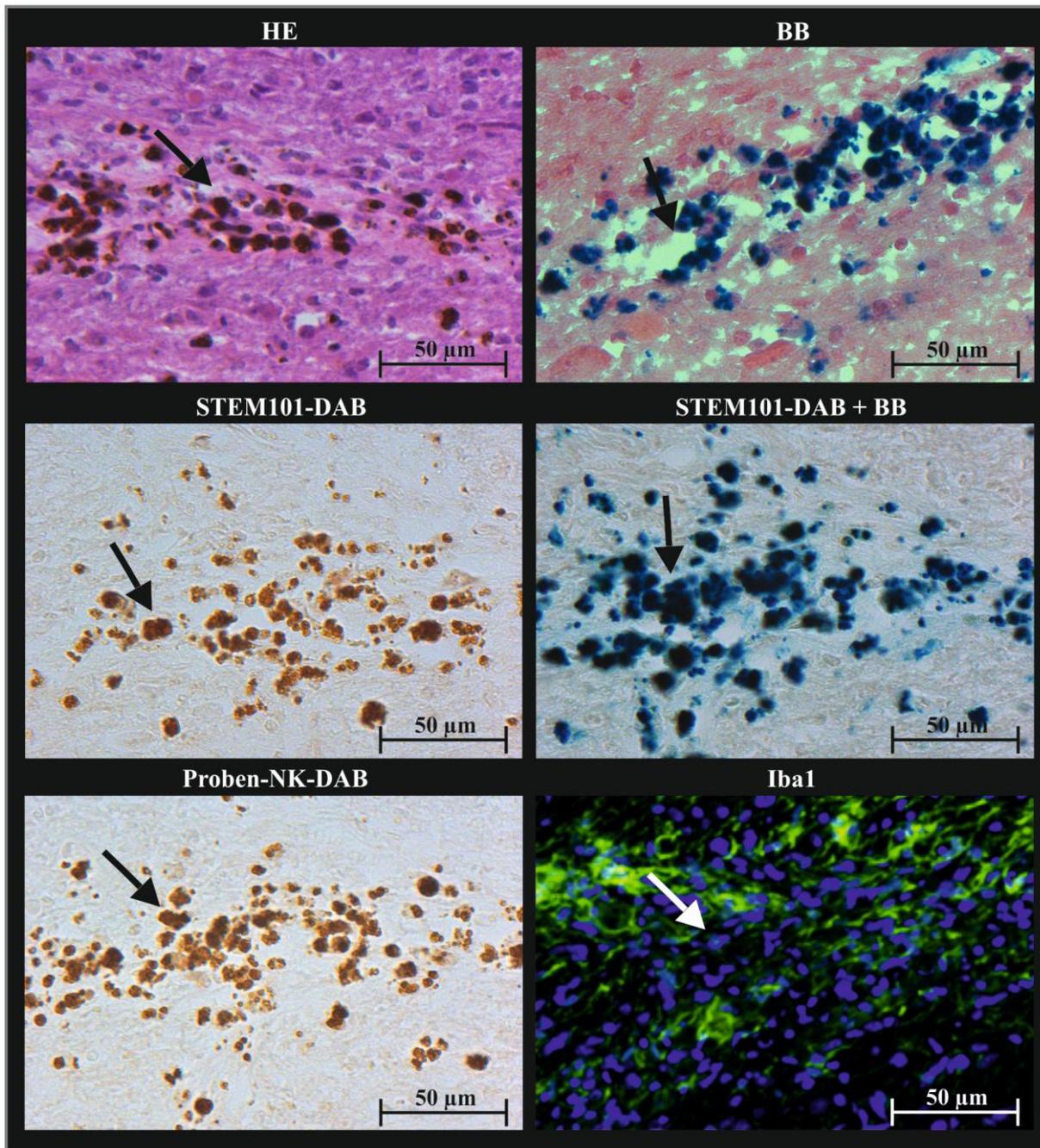


**Abbildung 27: Darstellung vitaler eisenmarkierter fhNPZ im Schafhirn**

**PK STEM101-DAB + BB:** Positivkontrolle von post mortem ins Schafhirn gespritzten eisenmarkierten fhNPZ. Die vitalen humanen Zellkerne sind braun angefärbt (schwarzer Pfeil), die Eisenoxidnanopartikel sind blau gefärbt. **NK DAB + BB:** Negativkontrolle von post mortem ins Schafhirn gespritzten eisenmarkierten fhNPZ. Die Zellen wurden nur mit DAB und BB gefärbt, es sind keine braunen Zellkerne sichtbar. Die Eisenoxidnanopartikel sind blau angefärbt. BB = Berliner Blau; DAB = 3,3'-Diaminobenzidine; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; NK = Negativkontrolle; PK = Positivkontrolle; STEM101 = monoklonaler Mäuseantikörper, der spezifisch an den humanen Ku80-Zellkernmarker bindet

In der Positivkontrolle (PK STEM101-DAB + BB) sind deutlich die braun angefärbten humanen Zellnuklei der vitalen fhNPZ sichtbar, während die Eisenoxidnanopartikel separat blau angefärbt sind. Dahingegen ist in der Negativkontrolle (NK DAB + BB) keine braune Zellkern-Färbung zu erkennen, während sich die Eisenoxidnanopartikel blau darstellen.

Bei der Betrachtung der den Versuchstieren entnommenen Proben kann man erkennen, dass keine braun angefärbten, vitalen Zellkerne der fhNPZ mittels der STEM101-DAB- oder der STEM101-DAB + BB dargestellt werden können. Sowohl in der STEM101-DAB, als auch in der Proben-NK-DAB sind allerdings deutlich braun angefärbte Zellfragmente an der Transplantationsposition sichtbar. Die BB und STEM101-DAB + BB zeigen deutlich, dass diese Zellfragmente eisenpositiv sind. Sie konnten in der Transplantationsregion häufig gefäßassoziiert aufgefunden werden (s. Abbildung 28 STEM101-DAB + BB) und waren von einer erhöhten Anzahl von aktivierten Mikrogliazellen umgeben (s. Abbildung 28 Iba1).



**Abbildung 28: Darstellung eisenmarkierter fhNPZ im Schafhirn nach Versuchsende**

**HE:** Die Eisenoxidnanopartikel sind braun angefärbt (s. Pfeil). **BB:** Die Eisenoxidnanopartikel sind blau angefärbt (s. Pfeil). **STEM101-DAB:** Die Zellfragmente sind braun angefärbt (s. Pfeil). **STEM101-DAB + BB:** Die Eisenoxidnanopartikel sind blau angefärbt und überlagern möglicherweise die braune Färbung der Zellfragmente (s. Pfeil). **Proben-NK-DAB:** Diese Negativkontrolle wurde nur mit DAB gefärbt. Die Zellfragmente sind braun angefärbt (s. Pfeil). **Iba1:** Aktivierte Mikrogliazellen (blau, s. Pfeil) sind im Bereich des Transplantats sichtbar, sowie die Bildung einer Gliazellnarbe (grün dargestellt mittels GFAP-Antikörper). BB = Berliner Blau; DAB = 3,3'-Diaminobenzidine; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; GFAP = *glial fibrillary acidic protein*; HE = Hämatoxylin-Eosin; Iba1 = ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1; NK = Negativkontrolle; STEM101 = monoklonaler Mäuseantikörper, der spezifisch an den humanen Ku80-Zellkernmarker bindet

### 4.3 Klinische und pathologische Nebenwirkungen von CsA im Schaf

Für die Frage, ob die Langzeitgabe von CsA in unterschiedlichen Applikationsregimen Nebenwirkungen im Schaf verursacht, wurden klinische Parameter im Verlauf des Versuchs untersucht. Ebenso wurde *ex vivo* eine pathologische Untersuchung zu toxischen Einflüssen von CsA durchgeführt.

#### 4.3.1 Beeinflusst die CsA-Applikation *in vivo* klinische Parameter oder Blutwerte beim Schaf?

Die Auswertung der klinischen Parameter hinsichtlich einer Beeinflussung durch die Langzeitapplikation von CsA beinhaltete die regelmäßige Untersuchung von Körpertemperatur, arteriellem Blutdruck und Körpergewicht im Verlauf des Versuchs. Ebenso erfolgte eine Untersuchung von Blutparametern. Die im Versuch quantifizierten Blutparameter, die sich zwischen den drei Versuchsgruppen unterschieden, sind in diesem Kapitel aufgeführt.

Die Analyseergebnisse weiterer untersuchter, jedoch unauffälliger Blutparameter befinden sich im Anhang (s. Tabelle 47 bis Tabelle 51).

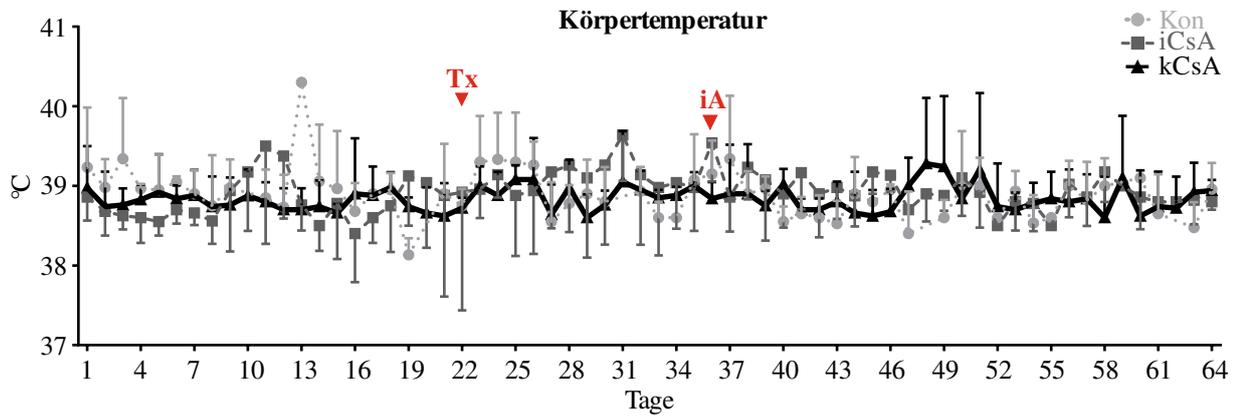
##### 4.3.1.1 Auswertung der Körpertemperaturverläufe

Bei der Betrachtung der Körpertemperaturverläufe konnte weder über den gesamten Versuchszeitraum AUC-I, noch in den Zeiträumen AUC-II und AUC-III ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (s. Tabelle 19 und Abbildung 29).

**Tabelle 19: Auswertung der Körpertemperaturverläufe**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
<b>Kon</b>	2422,0 ± 34,8	1343,0 ± 47,2	1048,0 ± 4,1
<b>iCsA</b>	2452,0 ± 16,0		1051,0 ± 5,1
<b>kCsA</b>	2438,0 ± 23,1	1356,0 ± 16,0 (n = 10)	1048,0 ± 7,4

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 29: Darstellung der Körpertemperaturverläufe**

iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

#### 4.3.1.2 Auswertung der Körpergewichtsverläufe

Die Körpergewichte (KGW) differierten weder über den gesamten Versuchszeitraum (AUC-I), noch im Bereich AUC-II bzw. AUC-III zwischen den Versuchsgruppen (s. Tabelle 20). Auch die Auswertung über die relative Veränderung der absoluten Körpergewichte zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns (die Messung der KGW variierte zwischen den Versuchstagen -2 und 3) im Vergleich zum Versuchsende (die Messung der KGW variierte zwischen den Versuchstagen 61 und 64) zeigte keinen signifikanten oder tendenziellen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (s. Tabelle 21 und Abbildung 30).

**Tabelle 20: Auswertung der Körpergewichtverläufe**

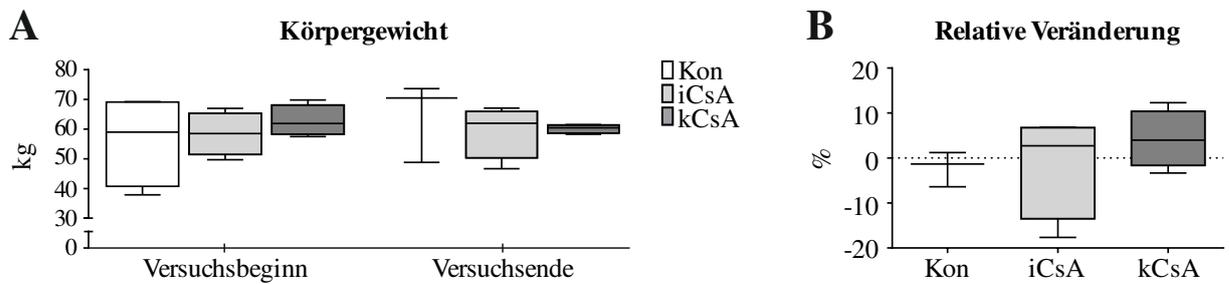
Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
<b>Kon</b>	2866,0 ± 1147,0	2054,0 ± 590,8	1354,0 ± 275,0 (n = 3)
<b>iCsA</b>	3418,0 ± 581,1 (n = 4)		939,1 ± 401,3 (n = 4)
<b>kCsA</b>	2966,0 ± 495,5	2298,0 ± 533,3 (n = 9)	726,4 ± 553,1

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Tabelle 21: Auswertung der Veränderungen der Körpergewichte im Versuchsverlauf**

Gruppe (n = 4)	KGW Versuchsbeginn (kg)	KGW Versuchsende (kg)	Relative Veränderung KGW (%)
<b>Kon</b>	56,3 ± 15,4	64,0 ± 13,4 (n = 3)	-2,2 ± 3,9 (n = 3)
<b>iCsA</b>	58,4 ± 7,2	59,1 ± 8,8	-1,3 ± 11,5
<b>kCsA</b>	62,8 ± 5,2	59,9 ± 1,5	+4,2 ± 6,4

iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; KGW = Körpergewicht; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 30: Darstellung der Körpergewichte**

**A:** Darstellung der Körpergewichte zum Versuchsbeginn und Versuchsende im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der relativen Veränderung der Körpergewichte am Versuchsende im Vergleich zum Versuchsbeginn. iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe

#### 4.3.1.3 Auswertung hämodynamischer Parameter

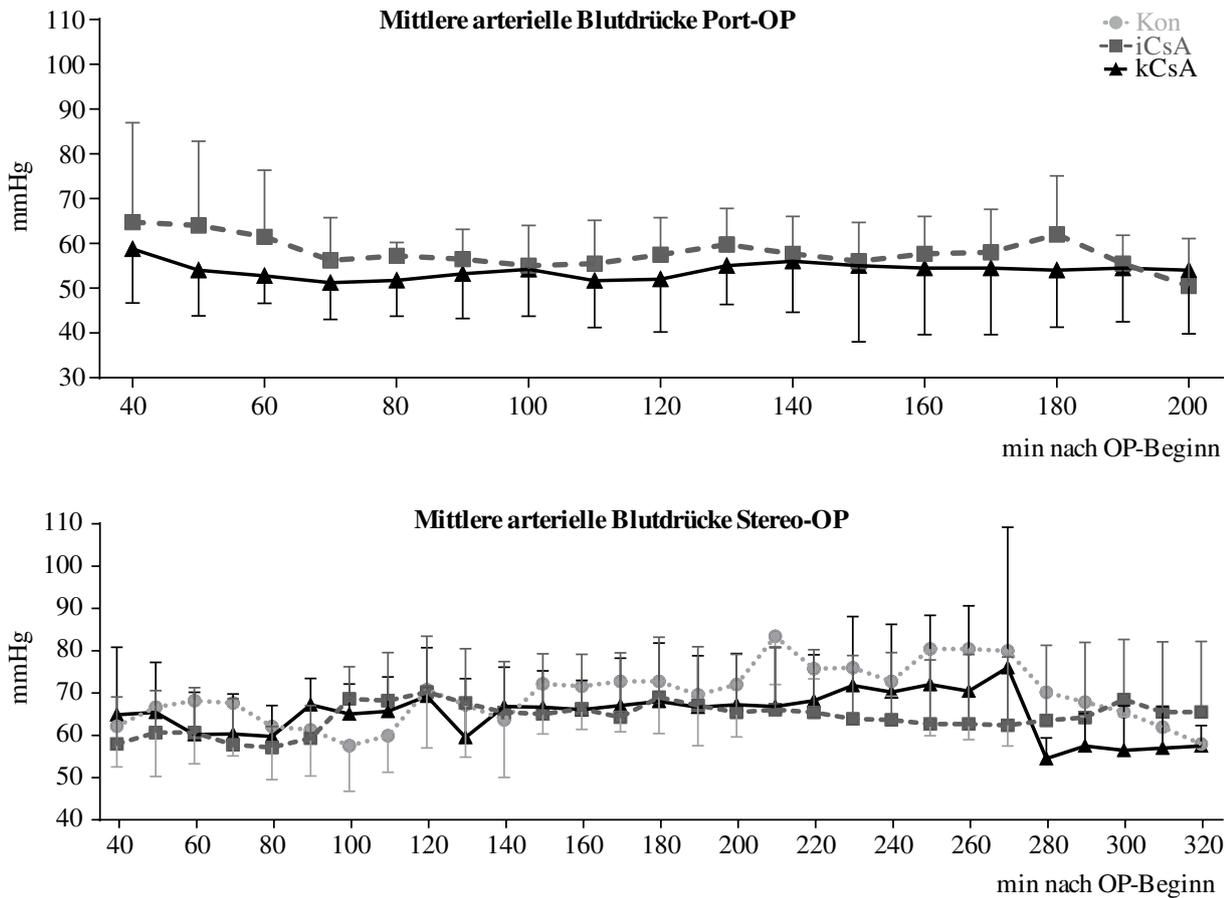
Die Erhebung der mittleren arteriellen Blutdrücke am stehenden, nicht narkotisierten Tier erwies sich als äußerst unzuverlässig, da die Methode nur unzureichend funktionierte. Eine statistische Auswertung dieser Daten war deshalb nicht möglich.

Während der Operationen (Port- und Stereo-OP) wurden jedoch zusätzlich die mittleren arteriellen Blutdrücke bei jedem narkotisiertem Tier erfasst. Diese Methode funktionierte zuverlässig reproduzierbar. Die statistische Auswertung dieser Daten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (vgl. Tabelle 22 und Abbildung 31).

**Tabelle 22: Auswertung der mittleren arteriellen Blutdrücke in Narkose**

Gruppe (n = 5)	Port-OP (mmHg)	Stereo-OP (mmHg)
Kon	-	69,5 ± 7,0
iCsA	58,0 ± 3,5	64,4 ± 3,5
kCsA	54,0 ± 1,8	65,1 ± 5,4

iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe; OP = Operation



**Abbildung 31: Darstellung der mittleren arteriellen Blutdrücke in Narkose**

**Oben:** Ergebnisse der nicht-invasiven Blutdruckmessung während der Port-OP im Gruppenvergleich, bei der Kon wurde keine Port-OP durchgeführt. **Unten:** Ergebnisse der nicht-invasiven Blutdruckmessung während der Stereo-OP im Gruppenvergleich. iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; OP = Operation

#### 4.3.1.4 Auswertung hämatologischer Blutparameter

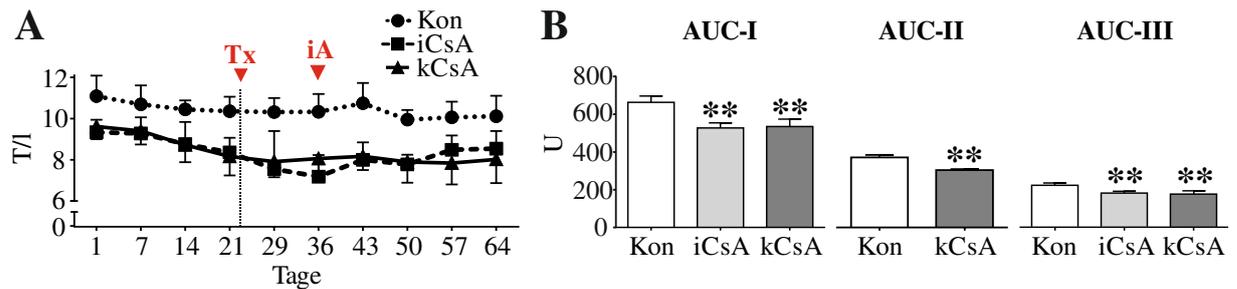
Wie in Tabelle 23 dargestellt, konnte ein hochsignifikanter Unterschied in der Erythrozyten-Konzentration während des gesamten Versuchszeitraumes (AUC-I) zwischen Kon zur iCsA ( $p < 0,01$ ) und zwischen Kon zur kCsA ( $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden.

Innerhalb des Zeitraumes AUC-II zeigte sich außerdem eine hochsignifikant niedrigere Erythrozyten-Konzentration der kCsA im Vergleich zur Kon ( $p < 0,01$ ). Auch in dem Erhebungsbereich AUC-III konnte sowohl zwischen Kon und iCsA als auch zwischen Kon und kCsA ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). Zwischen iCsA und kCsA konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden (s. Abbildung 32).

**Tabelle 23: Auswertung der Erythrozyten-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	653,9 ± 42,3	367,1 ± 22,5	213,1 ± 14,8
iCsA	519,6 ± 33,9 **		172,2 ± 10,5 **
kCsA	523,7 ± 49,17 **	297,1 ± 24,7 ** (n = 10)	166,9 ± 19,3 **

\*\* = p < 0,01 zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 32: Auswertung der Erythrozyten-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

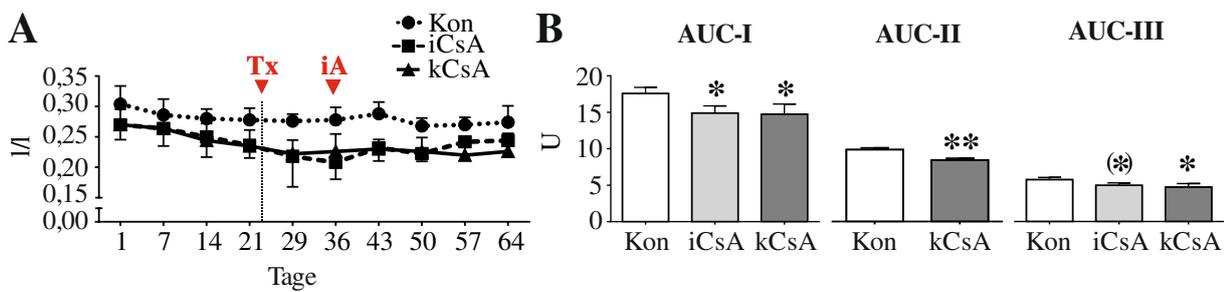
**A:** Erythrozyten-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Erythrozyten-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \*\* = p < 0,01 zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

Bei der Messung des Hämatokrits konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der Erythrozyten-Konzentration beobachtet werden (s. Tabelle 24). Im Vergleich zur Kon konnte bei der iCsA und auch bei der kCsA über den gesamten Versuchszeitraum (AUC-I) ein signifikant geringerer Hämatokrit eruiert werden (p < 0,05) (s. Abbildung 33) Weiterhin waren im Zeitraum AUC-II die Werte der kCsA hochsignifikant niedriger als die der Kon (p < 0,01). Zudem konnte im Erhebungsbereich AUC-III ein signifikant niedrigerer Hämatokrit bei der kCsA im Vergleich zur Kon dargestellt werden (p < 0,05). Einen tendenziell niedrigeren Hämatokrit zeigte die iCsA im Zeitraum AUC-III zur Kon (0,05 ≥ p < 0,1). Zwischen der iCsA und der kCsA war keine Differenz zu beobachten.

**Tabelle 24: Auswertung des Hämatokrit im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	17,6 ± 0,8	9,9 ± 0,5	5,7 ± 0,3
iCsA	14,9 ± 1,0 *		5,0 ± 0,3 (* <sup>*)</sup>
kCsA	14,7 ± 1,4 *	8,4 ± 0,8 ** (n = 10)	4,7 ± 0,5 *

\*\* = p < 0,01 zur Kon; \* = p < 0,05 zur Kon; (\*<sup>\*)</sup> = 0,05 ≥ p < 0,1 zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 33: Auswertung des Hämatokrit im Gruppenvergleich**

**A:** Hämatokrit über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung des Hämatokrits im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; \* =  $p < 0,05$  zur Kon; (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

In Übereinstimmung zu den bereits beschriebenen Veränderungen bei der Erythrozyten-Konzentration und dem Hämatokrit konnten auch bei den gemessenen Hämoglobin-Konzentrationen signifikante Unterschiede eruiert werden. In allen betrachteten Zeiträumen waren die Werte der Kon signifikant bis hochsignifikant höher als die der iCsA oder der kCsA (s. Tabelle 25 und Abbildung 34).

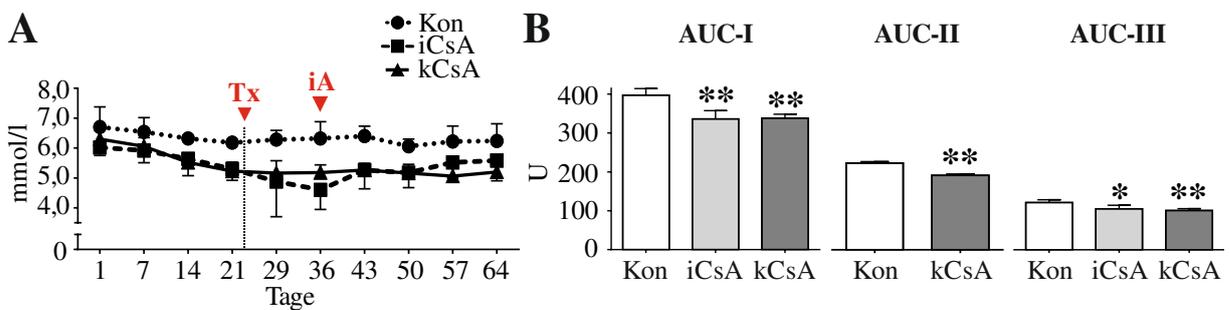
Im Zeitraum AUC-I konnte ein hochsignifikanter Unterschied von iCsA und kCsA im Vergleich zur Kon dargestellt werden ( $p < 0,01$ ). Ebenso konnte im Erhebungsbereich AUC-II ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Kon und kCsA eruiert werden ( $p < 0,01$ ).

Für den Zeitraum AUC-III zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen iCsA ( $p < 0,05$ ) und Kon, ebenso wie ein hochsignifikanter Unterschied zwischen kCsA ( $p < 0,01$ ) und Kon. Im Vergleich zwischen iCsA und kCsA konnte hier, wie zuvor auch schon bei der Erythrozyten-Konzentration und dem Hämatokrit, kein Unterschied dargestellt werden.

**Tabelle 25: Auswertung der Hämoglobin-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	397,1 ± 17,0	222,4 ± 7,7	130,2 ± 7,6
iCsA	335,9 ± 21,3 **		112,9 ± 9,8 *
kCsA	338,0 ± 10,2 **	190,9 ± 10,1 ** (n = 10)	108,2 ± 5,2 **

\*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; \* =  $p < 0,05$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 34: Auswertung der Hämoglobin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** Hämoglobin-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Hämoglobin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \*\* =  $p < 0,01$  zur Kon; \* =  $p < 0,05$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

### 4.3.1.5 Auswertung leberspezifischer Blutparameter

#### ASAT-Aktivität

Die ASAT-Aktivität im Blut war im Erhebungsbereich AUC-I in der iCsA tendenziell niedriger als bei der Kon ( $0,05 \geq p < 0,1$ ). In den Zeiträumen AUC-II und AUC-III konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Allerdings waren im Erhebungsbereich AUC-III die ASAT- Aktivität sowohl der iCsA, als auch der kCsA niedriger als die der Kon, wenn auch nicht signifikant (s. Tabelle 26 und Abbildung 35 B).

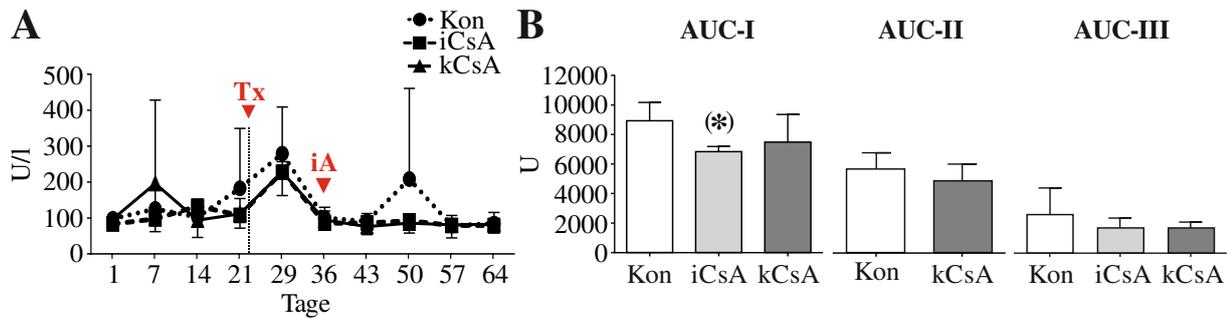
An Tag 7 zeigte Tier 12 aus der kCsA eine gesteigerte ASAT-Aktivität in Kombination mit einer erhöhten GLDH- und CK-Aktivität (ASAT: 613,6 U/l; GLDH: 119,1 U/l; CK: 1092 U/l). Es konnte zudem an Versuchstag 29 bei allen Gruppen eine erhöhte ASAT-Aktivität im Blut eruiert werden (s. Abbildung 35 A). Aus der Kon zeigten an Tag 21 Tier 2 und an Tag 50 Tier 5 eine deutlich erhöhte ASAT-Aktivität (Tier 2: 433,9 U/l; Tier 5: 588,5 U/l).

Die entsprechenden Referenzwerte (ASAT: 40 - 80 U/l) sind im Anhang in Tabelle 46 aufgeführt.

**Tabelle 26: Auswertung der ASAT-Aktivität im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon (n = 4)	8918,0 ± 1245,0	5633,0 ± 1090,0	2620,0 ± 1801,0
iCsA	6826,0 ± 356,7 (*)		1713,0 ± 670,1
kCsA	7475,0 ± 1869,0	4841,0 ± 1119,0 (n = 10)	1713,0 ± 398,8

(\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 35: Auswertung der ASAT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** ASAT-Aktivität im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der ASAT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

### GLDH-Aktivität

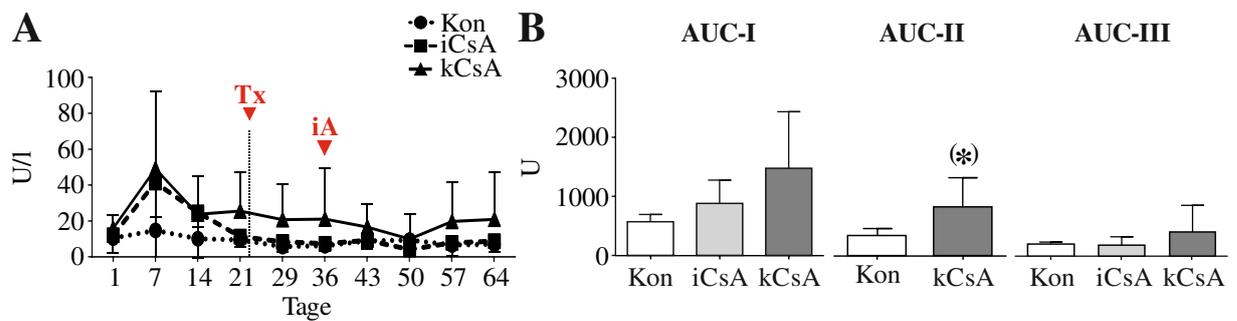
Die Auswertung der GLDH-Aktivität im Blut der Versuchstiere ergab eine tendenziell höhere Aktivität der kCsA im Erhebungsbereich AUC-II im Vergleich zur Kon (vgl. Tabelle 27 und Abbildung 36 B).

Generell konnte eine höhere GLDH-Aktivität in der iCsA und der kCsA im Vergleich zur Kon gezeigt werden, wobei die Aktivität der kCsA höher war als die der iCsA (s. Abbildung 36 B). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In der kCsA zeigten 3 von 5 Tieren im Zeitverlauf über 64 Tage gesteigerte GLDH-Aktivitäten im Blut im Vergleich zu den angegebenen Referenzwerten von  $< 20$  U/l (s. Tabelle 46). An Tag 7 betraf dies auch 2 von 5 Tieren aus der iCsA.

**Tabelle 27: Auswertung der GLDH-Aktivität im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon (n = 4)	569,1 ± 123,1	342,2 ± 118,0	172,5 ± 28,7
iCsA	879,2 ± 395,7		156,7 ± 119,7
kCsA	1475,0 ± 958,1	828,8 ± 493,0 (*) (n = 10)	344,3 ± 378,8

(\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 36: Auswertung der GLDH-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** GLDH-Aktivität im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der GLDH-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. (\*) = 0,05 ≥ p < 0,1 zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

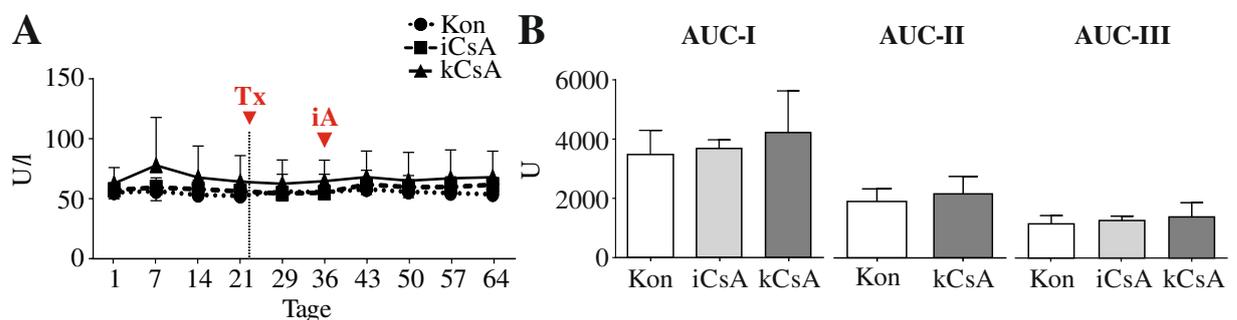
**GGT-Aktivität**

Die Auswertung der GGT ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Tabelle 28 und Abbildung 37). In der kCsA lagen die Werte der GGT-Aktivität bei Tier 12 über den gesamten Versuchszeitraum über der oberen Referenzgrenze von 60 U/l (s. Tabelle 46).

**Tabelle 28: Auswertung der GGT-Aktivität im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon (n = 4)	3470,0 ± 813,9	1910,0 ± 429,0	1164,0 ± 278,8
iCsA	3670,0 ± 294,5		1276,0 ± 147,5
kCsA	4211,0 ± 1405,0	2165,0 ± 595,9 (n = 10)	1401,0 ± 214,0

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 37: Auswertung der GGT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** GGT-Aktivität im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der GGT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

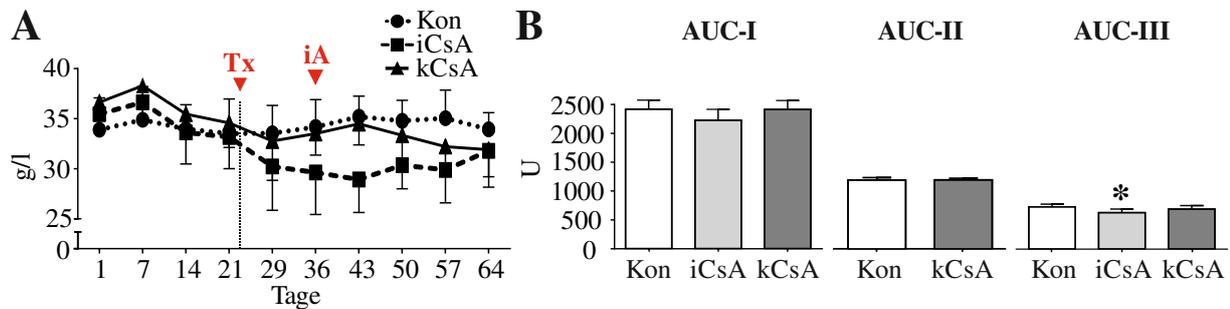
### Albumin-Konzentration

Die Albumin-Konzentration im Blut zeigte im Messzeitraum AUC-III signifikant geringere Werte bei der iCsA ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kon (s. Tabelle 29 und Abbildung 38). Sowohl bei der iCsA als auch bei der kCsA waren die Albumin-Konzentrationen im Blut an Tag 64 signifikant niedriger als an Tag 1 ( $p < 0,05$ , s. Tabelle 30).

**Tabelle 29: Auswertung der Albumin-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon (n = 4)	2161,0 ± 139,7	1188,0 ± 86,3	730,5 ± 45,6
iCsA	1989,0 ± 169,8		627,3 ± 62,5 *
kCsA	2157,0 ± 137,2	1192,0 ± 84,5 (n = 10)	691,0 ± 58,9

\* =  $p < 0,05$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 38: Auswertung der Albumin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** Albumin-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Albumin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \* =  $p < 0,05$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

**Tabelle 30: Vergleich der Albumin-Konzentration im Blut an Tag 1 und 64**

Gruppe (n = 5)	Tag 1 (g/l)	Tag 64 (g/l)
Kon (n = 4)	33,9 ± 3,2	33,9 ± 1,7
iCsA	35,4 ± 1,3	31,8 ± 2,6 *
kCsA	36,6 ± 1,7	31,9 ± 3,7 *

\* =  $p < 0,05$  zu Tag 1; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**4.3.1.6 Auswertung nierenspezifischer Blutparameter**

**Harnstoff**

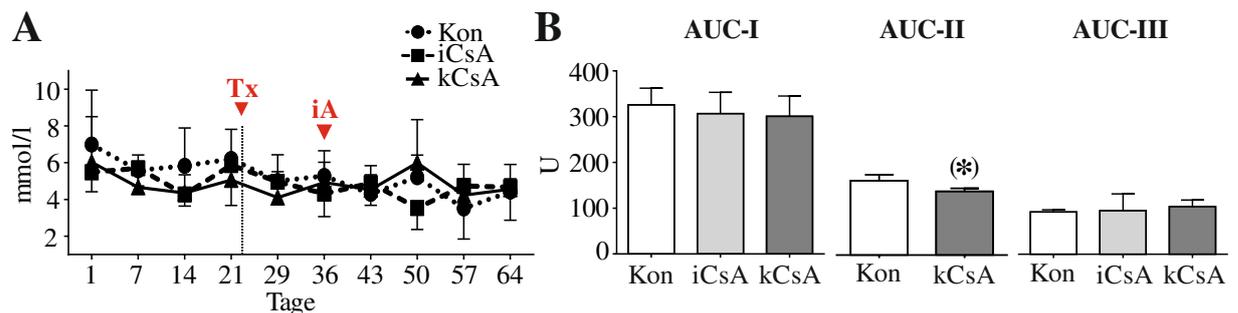
Die Harnstoff-Konzentration im Blut zeigte über den gesamten Versuchszeitraum und auch innerhalb der definierten Zeiträume keine statistisch signifikante Veränderung zwischen den Gruppen (s. Tabelle 31 und Abbildung 39).

Im Zeitraum AUC-II konnte bei der kCsA im Vergleich zur Kon eine tendenziell geringere Harnstoff-Konzentration im Blut nachgewiesen werden ( $0,05 \geq p < 0,1$ ).

**Tabelle 31: Auswertung der Harnstoff-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	325,8 ± 36,3	200,6 ± 36,0	91,6 ± 4,6
iCsA	306,6 ± 46,5		94,7 ± 36,2
kCsA	300,7 ± 44,2	172,0 ± 25,8 <sup>(*)</sup> (n = 10)	103,4 ± 14,2

(\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 39: Auswertung der Harnstoff-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** Harnstoff-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Harnstoff-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. (\*) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur Kon; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

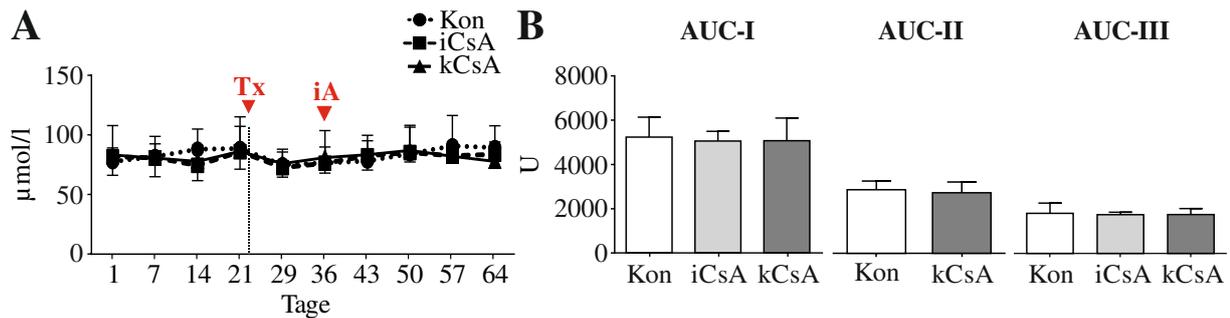
**Kreatinin**

Die Auswertung der Kreatinin-Konzentration ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 32 und Abbildung 40). Die Werte aller drei Gruppen befanden sich zu jedem gemessenen Zeitpunkt innerhalb der Referenzbereiche von 53 - 125 µmol/l (vgl. Tabelle 46).

**Tabelle 32: Auswertung der Kreatinin-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	5228,0 ± 903,1	2875,0 ± 391,8	1812,0 ± 459,6
iCsA	5054,0 ± 436,7		1751,0 ± 111,5
kCsA	5066,0 ± 1023,0	2739,0 ± 484,4 (n = 10)	1759,0 ± 269,5

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Abbildung 40: Auswertung der Kreatinin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** Kreatinin-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Kreatinin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

#### 4.3.1.7 Auswertung sonstiger Blutparameter

Im folgenden Kapitel werden die Blutparameter aufgeführt, die signifikante Gruppenunterschiede und Auffälligkeiten aufwiesen. Weitere untersuchte, jedoch unauffällige Parameter sind im Anhang in Tabelle 47 bis Tabelle 51 aufgeführt.

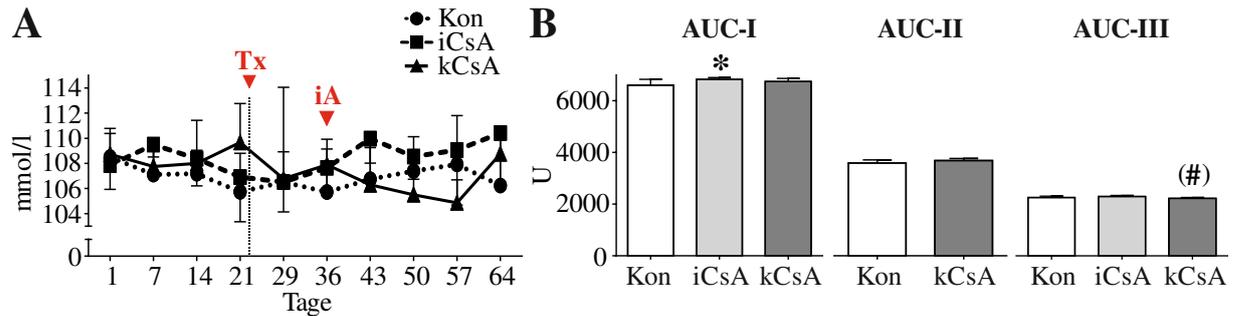
#### Chlorid

Die Chlorid-Konzentration im Blut wies bei der Kon über den gesamten Versuchszeitraum AUC-I eine signifikant niedrigeren Wert als bei der iCsA ( $p < 0,05$ ) auf (s. Tabelle 33 und Abbildung 41). Im Bereich AUC-III konnte eine tendenziell niedrigere Chlorid-Konzentration bei den Tieren der kCsA im Vergleich zu den Tieren der iCsA nachgewiesen werden ( $0,05 \geq p < 0,1$ ).

**Tabelle 33: Auswertung der Chlorid-Konzentration im Blut**

Gruppe (n = 5)	AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kon	6600,0 ± 232,2	3603,0 ± 268,9	2253,0 ± 55,4
iCsA	6828,0 ± 73,5 *		2296,0 ± 39,7
kCsA	6747,0 ± 116,6	3697,0 ± 250,5	2225,0 ± 33,7 (#)

\* =  $p < 0,05$  zur Kon; (#) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur iCsA; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe



**Abbildung 41: Auswertung der Chlorid-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich**

**A:** Chlorid-Konzentration im Blut über den Versuchszeitraum von 64 Tagen im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der Chlorid-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich durch die Berechnung von AUCs. \* =  $p < 0,05$  zur Kon; (#) =  $0,05 \geq p < 0,1$  zur iCsA; AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iA = Beginn der intermittierenden Applikation von CsA in der iCsA; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; Tx = Transplantation

### 4.3.2 Können *ex vivo* toxische Einflüsse von CsA auf das Schaf nachgewiesen werden?

Die *Ex-vivo*-Analyse erfolgte zunächst in der makroskopischen Beurteilung der entnommenen Organe. Anschließend wurde eine histologische Untersuchung von Nieren und Leber hinsichtlich des toxikologischen Einflusses einer CsA-Langzeitapplikation durchgeführt.

#### 4.3.2.1 Makroskopische Auswertung der Sektionsbefunde

Die Betrachtung der Organgewichte ergab keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich (s. Tabelle 34).

Die makroskopische Untersuchung der Tiere nach der Euthanasie ergab die folgenden in der Tabelle 35 aufgeführten Befunde. Dabei wies Tier 15 aus der kCsA deutlich veränderte Nieren mit multifokal ockerfarbenen, in die Tiefe ziehenden Stellen von derber Struktur auf (s. Abbildung 43). Ansonsten konnten bei der makroskopischen Betrachtung von Leber und Nieren keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (s. Abbildung 42 und Abbildung 43).

**Tabelle 34: Organgewichte im Gruppenvergleich**

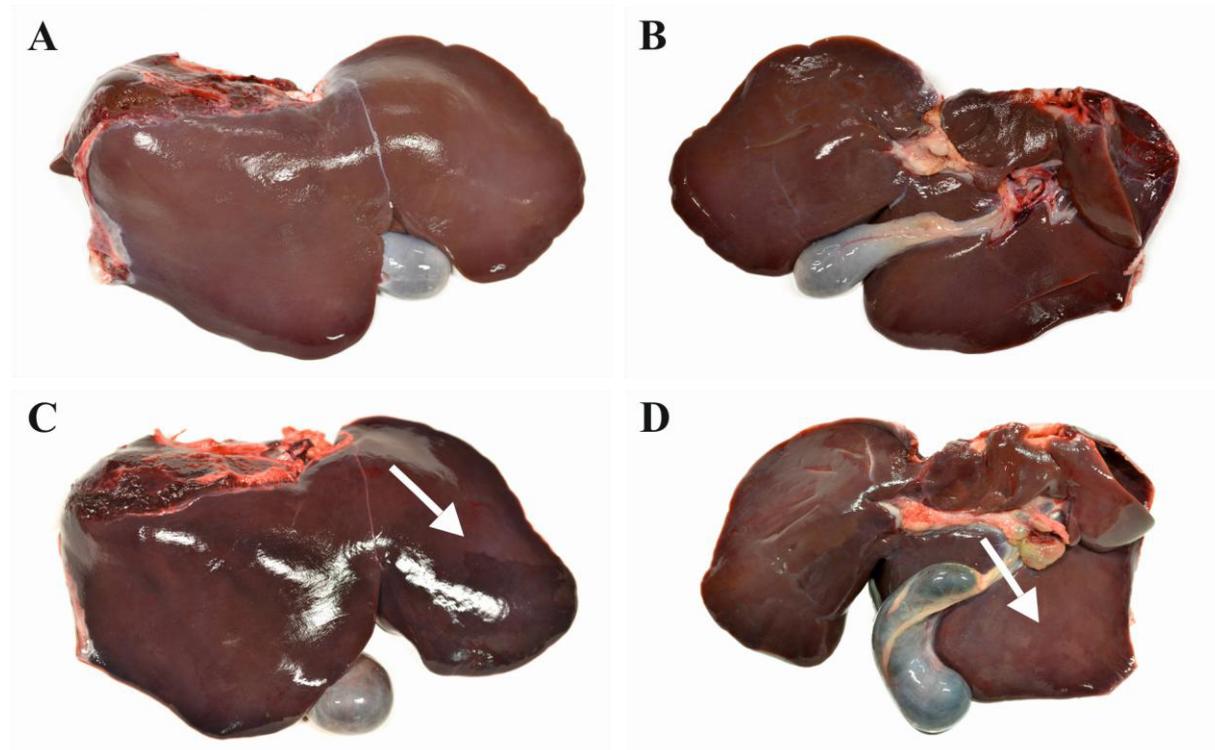
Gruppe (n = 4)	Leber (kg)	Nieren (kg)	Milz (kg)	Lunge (kg)	Herz (kg)
<b>Kon</b>	0,77 ± 0,25	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,10	1,06 ± 0,37	0,30 ± 0,10
<b>iCsA</b>	0,88 ± 0,20	0,09 ± 0,04	0,13 ± 0,05	1,19 ± 0,18	0,30 ± 0,16
<b>kCsA</b>	1,04 ± 0,49	0,09 ± 0,04	0,34 ± 0,22	1,63 ± 1,09	0,48 ± 0,30

iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; kg = Kilogramm; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der gewogenen Organe pro Gruppe

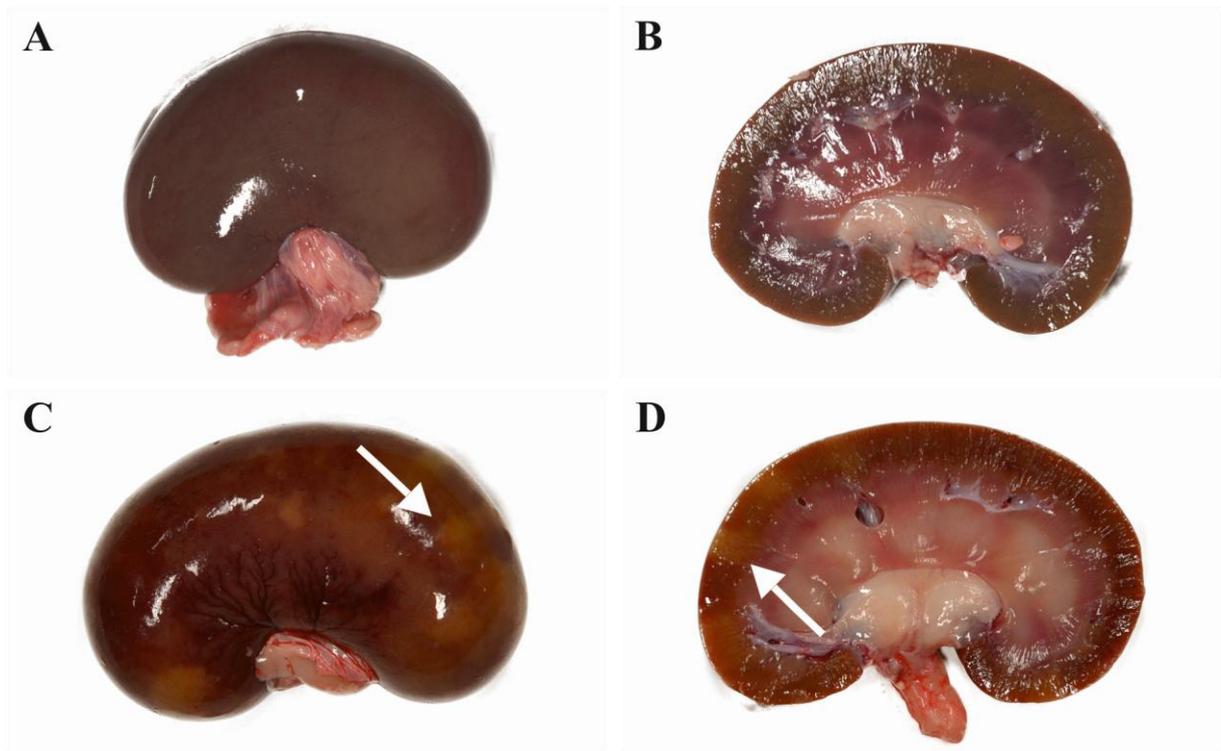
**Tabelle 35: Übersicht der Sektionsbefunde für Leber und Niere**

Gruppe	Tier-Nr.	Leber	Nieren
<b>Kon</b>	4	Nebenbefund: multifokal ggr. weiße Flächen auf Oberfläche	links: diffuse ggr. rotbraune Marmorierung rechts: diffuse ggr. rote Marmorierung, diffuse mgr. gelbe Färbung
	5	Nebenbefund: fokal ggr. Hyperämie	
<b>kCsA</b>	11		links: fokal ggr. Verklebung mit Kapsel rechts: multifokal ggr. Stecknadelkopf große bis erbsengroße weiße, in die Tiefe ziehende Stellen
	14		links: fokal Stecknadelkopf großes Loch
	15		rechts: multifokal mgr. ockerfarbene, in die Tiefe ziehende Stellen, von derber Struktur

ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; mgr. = mittelgradig; Nr. = Nummer

**Abbildung 42: Makroskopische Darstellung Leber**

**A und B:** Leber obB in kranialer und kaudaler Ansicht. **C:** fokal ggr. Hyperämie als Nebenbefund in der Kon, Tier 5 (s. Pfeil). **D:** multifokal ggr. weiße Flächen auf Oberfläche als Nebenbefund in der Kon (s. Pfeil). ggr. = geringgradig; Kon = Kontrollgruppe, obB = ohne besonderen Befund



**Abbildung 43: Makroskopische Darstellung Niere**

**A und B:** Niere obB. **C und D:** multifokal mgr. ockerfarbene, in die Tiefe ziehende Stellen, von derber Struktur in der kCsA, Tier 15 (s. Pfeile). mgr. = mittelgradig; obB = ohne besonderen Befund

**4.3.2.2 Histologische Auswertung Leber und Nieren**

Die histologische Untersuchung von Leber und Nieren in Hinblick auf degenerative Prozesse, entstanden durch toxische Einflüsse aufgrund der Langzeitapplikation von CsA, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 36 und Abbildung 45 A).

**Tabelle 36: Übersicht der histologischen Auswertung von Leber und Nieren**

Gruppe (n = 5)	Leber (Summe Score)	Niere (Summe Score)
Kon	1,7 ± 2,0	4,8 ± 2,1
iCsA	2,9 ± 1,9	3,1 ± 0,9
kCsA	2,2 ± 1,8	4,1 ± 2,2

iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

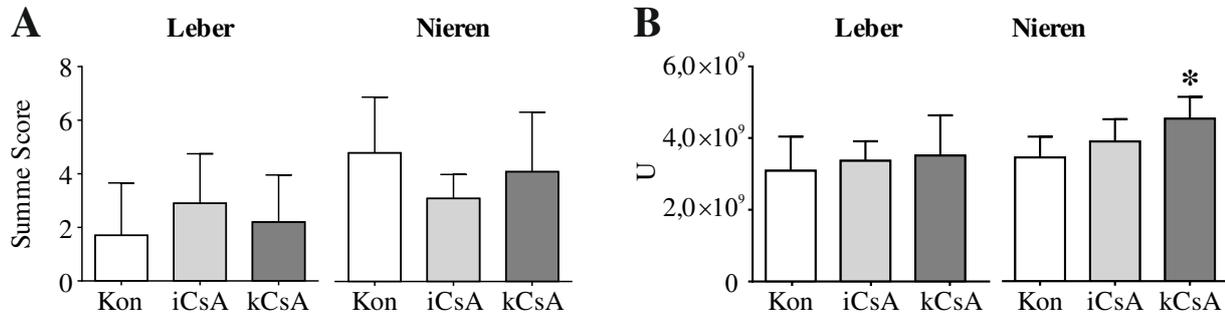
Bei der quantitativen Auswertung der Berliner Blau-Färbung mittels Histogramm konnte ein signifikant höheres Vorkommen blauer Pigmente (Hämosiderin) in den Nieren der kCsA im Vergleich zur Kon gemessen werden (s. Tabelle 37, Abbildung 44 B und Abbildung 45). Die iCsA zeigte ebenfalls höhere Werte als die Kon. Diese waren jedoch nicht signifikant.

Bei der Betrachtung der Fouchét-gefärbten histologischen Schnitte konnte in keiner Versuchsgruppe eine Cholestase festgestellt werden (s. Abbildung 45). Daraufhin wurde auf eine quantitative Auswertung der Schnitte verzichtet.

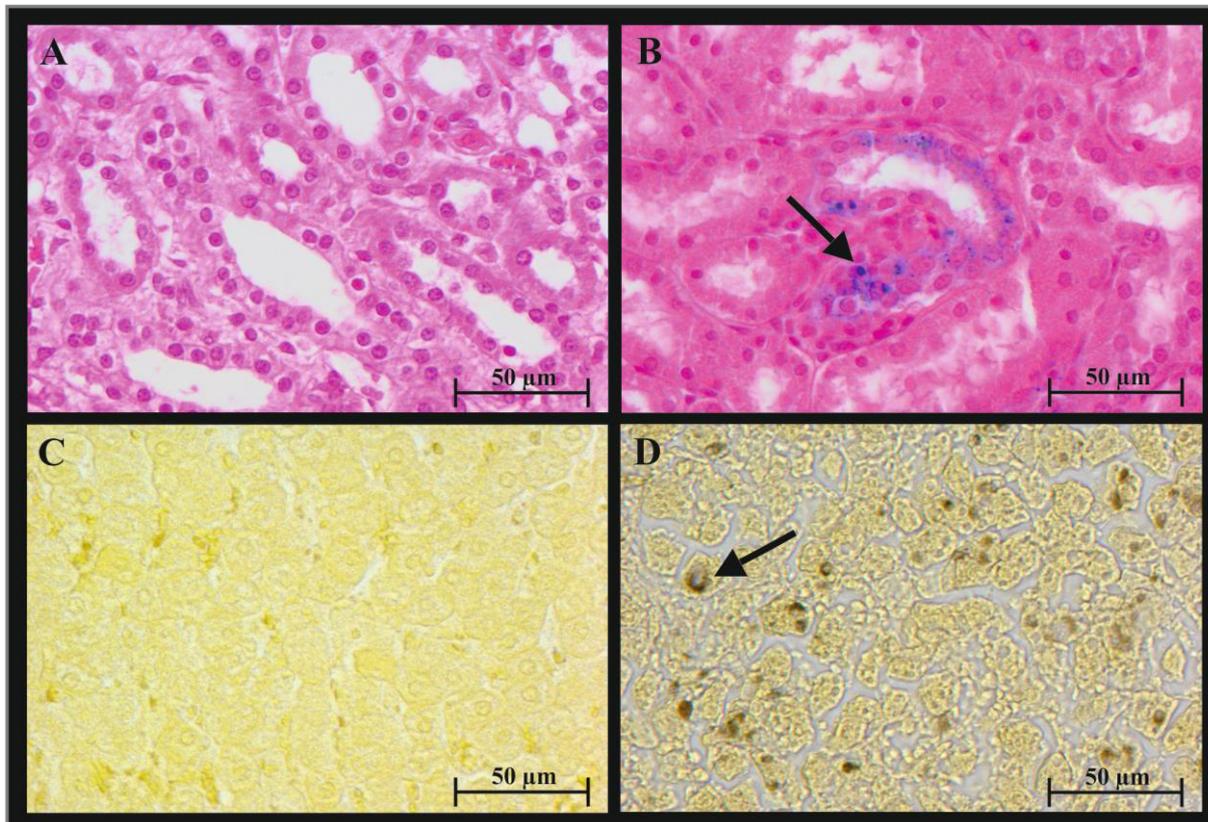
**Tabelle 37: Übersicht der Auswertung der Berliner Blau-Färbung von Leber und Nieren**

Gruppe (n = 5)	Leber (Summe AUCs [U] × 10 <sup>9</sup> )	Niere (Summe AUCs [U] × 10 <sup>9</sup> )
Kon	3,1 ± 1,0	3,4 ± 0,6
iCsA	3,4 ± 0,5	3,9 ± 0,6
kCsA	3,5 ± 0,1	4,5 ± 0,6 *

\* = p < 0,05 zur Kon; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

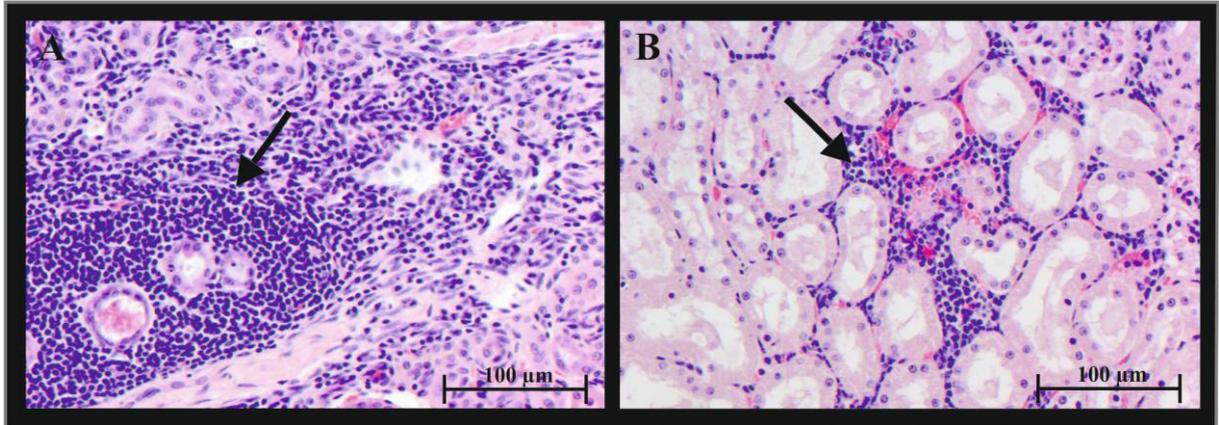
**Abbildung 44: Darstellung der histologischen Auswertung von Leber und Nieren**

**A:** Summe der Bewertungsschlüssel (Score) für Leber (links) und Nieren (rechts) im Gruppenvergleich. **B:** Darstellung der quantitativen Ergebnisse der Auswertung via Histogramm durch die Summe der AUCs im Gruppenvergleich. \* = p < 0,05 zur Kon; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe

**Abbildung 45: Darstellung der Berliner Blau- und Fouchét-Färbung**

**A:** Nierentubulusepithelzellen BB-gefärbt, Hämosiderin negativ. **B:** Nierentubulusepithelzellen BB-gefärbt, Hämosiderin positiv (blaue Pigmente s. Pfeil). **C:** Hepatozyten Fouchét gefärbt, Bilirubin negativ. **D:** Hepatozyten Fouchét gefärbt, Bilirubin positiv (grüne Pigmente s. Pfeil). BB = Berliner Blau-Färbung

Als Nebenbefund konnte in allen 3 Gruppen fokal oder multifokal eine geringgradige bis hochgradige interstitielle, nicht-eitrige Nephritis mit lymphozytärer Infiltration festgestellt werden (s. Abbildung 46). In der Kon waren davon 4 von 5 Tieren betroffen, während in der iCsA und kCsA jeweils nur 1 Tier diesen Befund aufwies.



**Abbildung 46: Nebenbefund einer interstitiellen nicht-eitrigen Nephritis**

**A:** fokale hgr. interstitielle nicht-eitrige Nephritis mit lymphozytärer Infiltration in der Kon. **B:** fokale ggr. bis mgr. interstitielle nicht-eitrige Nephritis mit lymphozytärer Infiltration in der kCsA. ggr. = geringgradig; hgr. = hochgradig; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; mgr. = mittelgradig

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Hintergrund der Arbeit und Versuchsziele**

Schlaganfälle repräsentieren eine der häufigsten Todesursachen der westlichen Welt (LOPEZ et al. 2006) und trotz intensiver Forschung existieren bis heute nur wenige erfolgreiche Therapieoptionen (HACKE et al. 2008). Ein wichtiger Schritt zur Etablierung wirksamer neuer Therapieansätze bildet die Grundlagenforschung mit der Stammzelltransplantation nach Schlaganfall zur Unterstützung der Gewebsregeneration. Bei der Translation funktionierender Therapieansätze vom Kleintiermodell auf den Menschen müssen wichtige Zwischenschritte wie die Etablierung der Stammzelltransplantation nach Schlaganfall im Großtiermodell erfolgen, um langfristig einen guten Therapieerfolg zu sichern. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Transplantationsmodell mit fhNPZ in das gesunde Schafhirn unter Immunsuppression mittels CsA zu etablieren, um in Folgeprojekten dieses Modell nach Schlaganfall anwenden und damit die Eignung für den Einsatz in der humanen Regenerationsmedizin untersuchen zu können. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit bildete die Erfassung von durch CsA ausgelösten Langzeitnebenwirkungen beim Schaf. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass das Tiermodell Schaf aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Haltung ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Forschungsvorhaben sein wird. Somit werden Informationen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Immunsuppressiva beim Schaf in Zukunft unerlässlich sein.

### **5.2 Bewertung des Studiendesigns und der Versuchsdurchführung**

#### **5.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Die für den vorliegenden Versuch verwendeten Tiere stammten von dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Für den Tierversuch wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da das Großtierschlaganfallmodell, welches in einem Folgeprojekt der vorliegenden Arbeit angewandt werden sollte, an männlichen Tieren etabliert wurde. Für den Versuch wurden erwachsene Tiere mit einem Alter von 12 - 24 Monaten eingesetzt. Da die Inzidenz für Schlaganfälle mit zunehmendem Alter steigt (MOZAFFARIAN et al. 2015), ist es besonders wichtig, das adulte Gehirn in seinem Verhalten nach Stammzelltransplantation zu untersuchen. Die Tiere wurden während des Versuchs in den Außenstallungen der Chirurgischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig gehalten. Die Tierhaltung erfolgte aus tierschutzrelevanten Gründen in kleinen Gruppen aus bis zu 5 Tieren. Die Schafe erhielten vor und während des Versuchs regelmäßigen Weidegang. Dadurch konnte das Wohlbefinden der Schafe im Vergleich zu konventionellen Tierversuchshaltungen mit einem „Indoor“-System enorm gesteigert werden. Trotzdem konnte keine gesteigerte Infektionsrate bei den immunsupprimierten Tieren in der Außenstallhaltung festgestellt werden. Die Haltungsform bot weiterhin den Vorteil, dass die Schafe in dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz bereits auf der Weide gehalten wurden und sie somit keinem weiteren Stressfaktor in Bezug auf die Umgewöhnung in die reine Boxenhaltung

ausgesetzt werden mussten. Einen Nachteil der Außenstallhaltung mit integriertem Weidegang bilden die jahreszeitlichen Schwankungen von Temperatur, Lichteinfall und Luftfeuchtigkeit, die generell einen Variabilitätsfaktor darstellen.

### **5.2.2 Studiendesign und das Schaf als Tiermodell**

Das Studiendesign des vorliegenden Versuchs sah einen Langzeitversuch über 64 Tage am Schaf mit einer Immunsuppression mittels CsA nach intrazerebraler Transplantation von fhNPZ vor. Eine erfolgreiche Transplantation der fhNPZ wurde zuvor an einem Nagermodell über 4 Wochen durchgeführt (KELLY et al. 2004). Hierbei konnte bei Ratten nach Schlaganfall eine zielgerichtete Migration der fhNPZ von 1,0 mm in Richtung der Läsion beobachtet werden, während bei Tieren ohne Schlaganfall eine ungerichtete Migration von 0,2 mm gemessen werden konnte. Zudem entwickelten die transplantierten fhNPZ einen neuronalen Phenotyp. Diese vielversprechenden Ergebnisse führen zu der Notwendigkeit einer Langzeitstudie, die im Sinne der translationalen Forschung an einem Großtiermodell durchgeführt werden sollte (FISHER et al. 2009, SAVITZ et al. 2011). Das Tiermodell Schaf wurde ausgewählt, da diese Tiere wie der Mensch ein gyrencephales Gehirn besitzen, im Gegensatz zu dem lissenzephalen Gehirn von Ratten und Mäusen (FERRER et al. 1986a, FERRER et al. 1986b). Die Folgen nach einem ischämischen Schlaganfall ähneln zudem denen beim Menschen auftretenden Schäden (BOLTZE et al. 2011). Eine Alternative zu dem Schlaganfallmodell im Schaf bilden bereits gut etablierte Großtiermodelle am Hund oder Schwein (CANAZZA et al. 2014). Der Grund von dem Einsatz eines Schafmodells lag zum einen in der deutlich kostengünstigeren Anschaffung und Haltung, sowie dem problemlosen Umgang mit den Tieren. Zudem wurde dieses Schafmodell im Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig entwickelt. Dadurch konnte eine Routine in dem Operationsverfahren vorausgesetzt werden. Es konnte folglich eine hohe Qualität und geringe Fehlerquote bei den chirurgischen Prozessen in der Folgestudie gewährleistet werden.

In der therapeutischen Anwendung von Stammzellen werden verschiedene Applikationsrouten angewendet, die häufigsten bestehen hierbei in der intrazerebralen oder intravasalen Injektion, welche individuelle bestimmte Risiken beinhalten. So können beispielsweise intravasale Zellapplikationen zu Mikroembolien führen, während das Gehirn sehr empfindlich auf chirurgische Manipulation infolge intraparenchymaler Zelltransplantationen reagiert und ein erhöhtes Risiko von fokalen Blutungen besteht (BOLTZE et al. 2015). Vorangegangene Studien von DREYER (2012) konnten nach intravenöser Applikation von ovinen MSZ nach einer zerebralen fokalen Ischämie keine Stammzellen in der Nähe der Läsion nachweisen. Mit der stereotaktischen Zellimplantation ist hingegen eine exakte Positionierung einer definierten Anzahl von Zellen an der erforderlichen Stelle möglich. In der vorliegenden Studie konnte durch die gewählte Applikationsroute das Überleben und Verhalten der transplantierten fhNPZ im Schafhirn genau eruiert werden. Durch die Transplantation einer konstanten Zellzahl an eine definierte Position konnten Unsicherheitsfaktoren vermieden werden und direkt das Vermögen zum Überleben und das Verhalten der transplantierten Zellen im Hirnparenchym untersucht

werden. Zur *In-vivo*-Überwachung der transplantierten fhNPZ wurden an den Versuchstagen 23, 36 und 64 unter einer Vollnarkose MRT-Aufnahmen angefertigt. Dadurch konnte das Verhalten der eisenmarkierten fhNPZ im Zeitverlauf verfolgt werden. Die Anzahl von 3 MRT-Terminen stellt hierbei ein Minimum bei der Untersuchung zum Verhalten der Stammzellen im Zeitverlauf dar. Dennoch konnten aus den erhobenen Daten konsistente Schlüsse zum Verhalten der transplantierten fhNPZ *in vivo* gezogen werden (vgl. Kap. 5.3.2.3). Eine größere Anzahl an MRT-Untersuchungen war unter den gegebenen Umständen, dass diese Untersuchung stets unter Vollnarkose durchgeführt werden musste und daher einen erheblichen Stress für die Versuchstiere bedeutete, nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung der fhNPZ eine xenogene Transplantation durchgeführt. Hierbei orientierte sich die Wahl der CsA-Monotherapie zur Immunsuppression nach Xenotransplantation aus Gründen der Vergleichbarkeit an den vorherigen Protokollen aus den bereits durchgeführten Rattenstudien (BLISS et al. 2006, KELLY et al. 2004). Die Dosierung richtete sich hierbei nach bereits erfolgreich durchgeführten Transplantationsstudien am Schaf (ROSE et al. 2001). Ein wichtiger Bestandteil der Untersuchungen zu Wirkung und Toxizität von CsA am Schaf bestand in der Anwendung unterschiedlicher Behandlungsregime. So wurde der kCsA kontinuierlich 2x tägl. über 64 Tage CsA verabreicht, während die iCsA ab dem Versuchstag 36 nur noch jeden 3. Tag 1x tägl. CsA erhielt. Ziel dieser unterschiedlichen Behandlungsregime bestand in der Erörterung einer möglichen Dosisreduktion von CsA, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass das Gehirn zu den immunprivilegierten Organen gehört, welche nach Transplantation nur eine verzögerte oder gar keine Abstoßungsreaktion von fremdem Gewebe induzieren (JANEWAY 2002). Die Applikationsdauer von 21 Tagen vor der Zelltransplantation lehnte sich mit Einplanung eines Sicherheitszeitraums an vorangegangene pharmakokinetische Untersuchungen von CsA beim Schaf an, bei denen ein Gleichgewichtszustand der CsA-Blutkonzentration nach 17 Tagen erreicht wurde (ROSE et al. 2001). Dadurch konnte eine Langzeitstudie zu Toxizität von CsA im Schaf über 64 Tage durchgeführt werden. Dies ist besonders im Hinblick auf die Notwendigkeit etablierter Langzeittherapien nach einer Transplantation notwendig.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse

### 5.3.1 Ein Nachweis eisenmarkierter fhNPZ *in vitro* via MRT-Aufnahmen ist möglich

Ziel der *in vitro* durchgeführten Untersuchungen bestand in der Sicherstellung der Visualisierung der fhNPZ für die nachfolgenden *In-vivo*-Studien am Schaf. Als wichtige Voraussetzung hierfür galt eine nicht invasive Methode zur Überwachung der transplantierten Zellen im Schaf über einen Zeitraum von 42 Tagen. Eine standardisierte und bereits bei ovinen MSZ im Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig etablierte Methode stellt hierbei die Markierung der Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln dar (DREYER 2012). Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, das Verhalten der eisenmarkierten Stammzellen via MRT-Aufnahmen am narkotisierten Tier darzustellen und zu verfolgen. Diese Markierungsmethode

wurde zuvor in verschiedenen neurologischen Krankheitsmodellen, wie z.B. Morbus Parkinson und der zerebralen Ischämie sowohl an humanen als auch murinen Stammzellpopulationen eingesetzt (STROH 2006, STROH et al. 2006a). Ein wichtiger Fokus war hierbei die Minimierung des durch die Zellmarkierung ausgelösten oxidativen Stresses in den Stammzellen. Somit sollte eine gute Zellvitalität und Zellproliferation gewährleistet werden. Um diese Voraussetzungen umsetzen zu können, müssen die optimal verträglichen Eisenkonzentrationen in der jeweilig angewendeten Stammzellpopulation vor Versuchsbeginn zunächst eruiert und etabliert werden (STROH et al. 2009).

#### **5.3.1.1 Eine Eisenkonzentration von 3,0 mM ist für die Markierung der fhNPZ am geeignetsten**

Bei der Zellmarkierung mit Eisenoxidnanopartikeln konnte gezeigt werden, dass initial nach der Zellmarkierung bei Makrophagen von Ratten ein erhöhtes oxidatives Stresslevel besteht, welches aber nur einen transienten Charakter aufweist. Direkt nach der Eisenmarkierung wiesen Ratten-Makrophagen ein signifikant erhöhtes oxidatives Stresslevel auf, welches sich bereits einen Tag nach Markierung wieder auf dem Level der Kontroll-Zellen (unmarkiert) befand (STROH et al. 2004). In dieser Studie wurde die langfristige Zellvitalität und Zellproliferation hierbei nicht nachteilig beeinflusst. Diese Erkenntnisse sind besonders wichtig im Hinblick auf zwei Zellpopulationen: Zum einen muss ein optimales Überleben der transplantierten Stammzellen zur Eruiierung ihres therapeutischen Potentials gewährleistet werden. Zum anderen bilden Makrophagen die Zellpopulation, die die Eisenpartikel bei Abbauprozessen im Rahmen ihrer immunologischen Bedeutung nach Zelltransplantationen als letzte Instanz inkorporieren. Hierbei muss eine negative Wirkung freigesetzter Eisenoxidnanopartikel nach Zelllyse auf die umgebenden Zellen des Transplantat-Empfängers, ausgeschlossen werden (FRIEDMAN und GALAZKA-FRIEDMAN 2001, STROH et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die 1,5 mM Konzentration große Schwankungen in den Zellzahlen und in der Vitalität innerhalb des gemessenen Zeitraums von 48 h (vgl. Kap. 4.1.1). Da auch eine signifikant geringere Vitalität 24 h nach der Eisenmarkierung gezeigt werden konnte, spricht dies entgegen den Literaturangaben von STROH et al. (2004) für eine langfristige negative Beeinflussung des Zellorganismus. Dies konnte auch in der 6,0 mM Konzentration beobachtet werden, während die 3,0 mM Konzentration eine deutlich bessere Vitalität von konstant > 80% aufwies (die Kon erreichte > 90% Vitalität). Ursachen für diese Schwankungen können dabei in dem für die sensiblen fhNPZ sehr stressigen Vorgang des Markierens liegen, sprich in den Waschvorgängen und Medienwechseln. Dagegen spricht, dass die Kon ebenfalls diesem Stress ausgesetzt wurde. Eine weitere wichtige Komponente besteht hier in der personellen Betreuung, wobei der Erfahrungsschatz und Ausbildungsstand der durchführenden Person einen wichtigen Einfluss auf die Zellkultur besitzt (MOZDZIAK et al. 2004). Die geringe Vitalität der 6,0 mM liegt zudem sehr wahrscheinlich in einem toxischen Einfluss der Eisenoxidnanopartikel begründet. Hierbei spielt vor allem die Inkubation mit freien Eisenoxidpartikeln eine Rolle, da diese zu einem erhöhten intrazellulären oxidativen Stress führt

(STROH et al. 2004). Dieses Phänomen führte in der erwähnten Studie allerdings nur vorübergehend zu einem erhöhten oxidativen Stresslevel, welches sich bereits eine Tag nach der Eisenmarkierung wieder auf dem Level unmarkierter Kontrollzellen befand. Dementsprechend muss eine nach 48 h nach Markierung immer noch erniedrigte Vitalität andere Ursachen besitzen. Beispielsweise vermindern hohe intrazelluläre Konzentrationen von Eisenoxidnanopartikeln nachweislich die Proliferationskapazität von Zellen in Zellkulturen. Ursächlich hierfür sind unter anderem zytoskeletale Veränderungen (SOENEN et al. 2009). Zudem zerfällt ein gewisser Teil der Nanopartikel und beeinflusst so die Zellfunktionalität und Homöostase (SOENEN et al. 2011). Grundsätzlich müssen auch die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Zellpopulationen beachtet werden. Die Toxizitätsstudien zu der Anwendung von Eisenoxidnanopartikel wurden zuvor an Ratten-Makrophagen getestet (STROH et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die These von STROH et al. (2009) und SOENEN et al. (2011), dass aus diesen Gründen vor jedem Versuch individuell die jeweilige Zellpopulation auf ihre Verträglichkeit in Bezug auf Eisenoxidnanopartikel hin untersucht werden sollte. Die mit einer Eisenkonzentration von 3,0 mM markierten fhNPZ wiesen die konstantesten Parameter und eine gute Vitalität von > 80% auf. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Eisenkonzentration von 3,0 mM eine optimale Markierung der fhNPZ in Hinblick auf die Verträglichkeit darstellt. Unterstützt wird diese These durch die Arbeit von Frau Dr. med. vet. Antje Dreyer, die zu ähnlichen Ergebnissen in ihren *In-vitro*-Studien an ovinen MSZ gelangte (DREYER 2012). Aufgrund dessen wurde diese Eisenkonzentration von 3,0 mM bei den *In-vivo*-Transplantationsstudien der vorliegenden Arbeit verwendet.

### **5.3.1.2 Markierte fhNPZ können durch eine T2-gewichtete Sequenz dargestellt werden**

Nachfolgend an die Überprüfung des toxischen Einflusses der Eisenoxidnanopartikel auf die Stammzellen wurde die Möglichkeit zur Visualisierung der markierten fhNPZ mittels MRT-Aufnahmen überprüft. Hierbei stellt die T2-Relaxationszeit (ms) einen wichtigen physikalischen Parameter zur visuellen Unterscheidung verschiedener Gewebe und Zellen dar (STROH 2006). Durch eine hochsignifikant geringere Relaxationszeit der markierten Zellen (1,5/3,0/6,0 mM) zu den Zeitpunkten 0 und 24 h nach Markierung gegenüber den unmarkierten fhNPZ konnte eine visuelle Unterscheidung zwischen den transplantierten eisenmarkierten fhNPZ und normalem Hirngewebe in T2-gewichteten MRT-Sequenzen gewährleistet werden (s. Kap. 4.1.2).

Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse zur Verträglichkeit der verschiedenen Eisenkonzentrationen und die Messung der T2-Relaxationszeiten einen deutlichen Vorteil der mit einer Konzentration von 3,0 mM markierten fhNPZ gegenüber der mit 1,5 und 6,0 mM markierten Stammzellen. Diese Ergebnisse stützen sich ebenfalls auf die Daten von DREYER (2012). Daher wurde diese Eisenkonzentration sowohl bei den nachfolgenden *In-vitro*-Studien zum Detektionslimit der eisenmarkierten fhNPZ, als auch bei den *in vivo* durchgeführten Transplantationsversuchen am Schaf zur Markierung der fhNPZ verwendet.

### **5.3.1.3 Das Detektionslimit markierter fhNPZ liegt in einer T2-gewichteten MRT-Sequenz bei 50.000 Zellen**

Nachfolgend an die Etablierung der Stammzellmarkierung erfolgte die Validierung des Detektionslimits transplantierte eisenmarkierter fhNPZ. Dafür wurde das Transplantationsszenario zunächst *in vitro* mittels Gelphantomen simuliert. Der Vorteil einer *In-vitro*-Studie zum Detektionslimit liegt vor allem darin, dass hierfür keine Versuche am Tier notwendig sind. Zum anderen werden individuelle Stör- und Unsicherheitsfaktoren wie beispielsweise Bewegungen des Tieres oder Blutungen in den Transplantationsbereich und damit eine Verfälschung der Signalauslöschung durch Eisen vermieden. Einen Nachteil stellen Lufteinschlüsse im Rahmen des Herstellungsprozesses der Gelphantome dar, da diese zu einer falsch positiven, eisenähnlichen Signalauslöschung führen. Wie bereits von DREYER (2012) beschrieben, wurde deshalb bei der Herstellung der Gelphantome ein Ultraschallbad zur Minimierung der Lufteinschlüsse eingesetzt.

In der vorliegenden Studie konnte ein Detektionslimit von 50.000 eisenmarkierten fhNPZ (3,0 mM) im 3,0 T MRT eruiert werden. Mit steigender Zellzahl nahm die Signalauslöschung zu, so dass bei einer Zellzahl von 200.000 fhNPZ ein sehr guter Bildkontrast zu dem Agarosegel hergestellt werden konnte. Diese Zellzahlen unterscheiden sich erheblich von dem Detektionslimit eisenmarkierter oviner MSZ, das bei gleicher Eisenkonzentration (3,0 mM) und gleicher Feldstärke (3,0 T) bei 5.000 Zellen lag (DREYER 2012). HEYMER et al. (2008) gelangte zu einem Detektionslimit von 50.000 humanen MSZ bei einer Feldstärke von 11,7 T. Diese Unterschiede im Detektionslimit beweisen die individuellen Eigenschaften von Stammzellpopulationen und die Notwendigkeit für eine *In-vitro*-Etablierung der Stammzellmarkierung vor Versuchsbeginn.

### **5.3.2 Die Langzeitgabe des Immunsuppressivums CsA besitzt keinen Einfluss auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im immunprivilegierten Gehirn**

#### **5.3.2.1 Es gibt gruppenspezifische Unterschiede in den CsA-Blutkonzentrationen**

Die Anwendung von CsA zur Immunsuppression beim Schaf wurde bereits im Jahre 2001 von ROSE et al. in einem Hauttransplantationsmodell etabliert. Hierbei wurden 2 - 3 mg CsA/kg 2x tägl. in Kombination mit dem Cytochrom-Inhibitor Ketoconazol (10 mg/kg 2x tägl.) angewendet und Konzentrationen von 1500 - 2500 ng CsA/ml im Blut erreicht. Bei der Transplantation solider Organe beim Schaf (Uterusallotransplantation) wurde erfolgreich eine Kombinationstherapie von 8 mg CsA/kg p.o. tägl. zusammen mit 5 mg Prednisolon/kg/d (Applikationsdauer: 2 Tage vor der Transplantation bis zur 2. postoperativen Woche) verabreicht (RAMIREZ et al. 2011). Über die erreichten Wirkspiegel wurde in dieser Studie nicht berichtet. Die pharmakologische Wirkung von CsA ist abhängig vom erreichten Wirkspiegel im Blut, wobei das Maß der Calcineurin-Inhibition positiv mit der CsA-Konzentration im Blut korreliert (HALLORAN et al. 1999).

Die während des vorliegenden Versuchs gemessenen CsA-Blutspiegel zeigten signifikante

Unterschiede zwischen den Gruppen. Generell zeigte die kCsA signifikant höhere Wirkspiegel als die iCsA und die Kon. Es konnten in der kCsA mit der verwendeten Dosierung von 3 mg CsA/kg 2x tägl. Blutkonzentrationen von  $424,0 \pm 135,0$  ng CsA/ml erreicht werden. Dies entspricht den in der Literatur empfohlenen wirksamen CsA-Blutkonzentrationen nach Transplantation beim Menschen von 200 - 400 ng CsA/ml (MACDONALD 2001). In der iCsA hingegen konnten bei einer durchschnittlichen Blutkonzentration von  $198,5 \pm 155,9$  ng CsA/ml die empfohlene Wirkkonzentration nicht erreicht werden. Demzufolge ist ein Applikationsregime von 3 mg CsA/kg jeden 3. Tag nach 36 Tagen kontinuierlicher CsA-Gabe nicht suffizient.

Eine wichtige Erkenntnis waren zudem die großen individuellen Schwankungen der CsA-Blutkonzentration innerhalb der kCsA und der iCsA. Intra- und interindividuelle Schwankungen wurden bereits häufig in der Literatur beschrieben. So konnten bei Menschen, die die gleiche Dosis von CsA erhielten, große interindividuelle Unterschiede im Ausmaß der Calcineurin-Inhibition beobachtet werden (DELANEY et al. 2000, DUNCAN und CRADDOCK 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus des Cytochrom P450 3A4 (CYP) einen wichtigen Einfluss auf die individuelle Pharmakokinetik von CsA beim Menschen besitzt. Dementsprechend benötigen Individuen, die eine CYP 3A5\*3 Allele besitzen, eine niedrigere CsA-Dosis, um einen festgelegten Wirkspiegel zu erreichen, als diejenigen, die eine CYP 3A5\*1 Variante besitzen (HU et al. 2006). Bei Schafen konnte ein rassebedingter Unterschied der CYP-Aktivität festgestellt werden. Mufflons besitzen die höchste CYP-Aktivität unter den verschiedenen Schafsrassen (MACHALA et al. 2003). Die Pharmakokinetik von CsA wird zudem maßgeblich vom Typ des Transplantationsgewebes, dem Alter des Empfängers und der gleichzeitigen Gabe anderer Medikamente beeinflusst. So besitzen Kinder eine höhere metabolische Clearance als Erwachsene während sowohl konkurrierende Medikamente als auch eine beeinträchtigte Leberfunktion zu einer herabgesetzten Metabolisierungsrate führen können (PTACHCINSKI et al. 1986). KAHAN (2004) berichtete zudem von erheblichen interindividuellen und intraindividuellen Schwankungen bei der oralen Bioverfügbarkeit von CsA; die Ursache hierfür ist allerdings unklar. Durch eine intravenöse Applikation von CsA konnte in der vorliegenden Studie dieser Unsicherheitsfaktor der oralen Bioverfügbarkeit umgangen werden.

An Tag 29 konnte zudem eine geringere CsA-Konzentration sowohl in der kCsA als auch in der iCsA gezeigt werden. Die Ursache hierfür kann möglicherweise in der Aktivierung der Leberenzyme (unter anderem des CYP) durch die durchgeführten Narkosen an den Tagen 22 (Tag der Transplantation) und 23 (3,0 T MRT) liegen. Eine Langzeitexposition mit Isofluran scheint bei Ratten zu einer erhöhten CYP-Aktivität zu führen, während bei einer Kurzzeitnarkose mittels Isofluran über 75 s dieser Effekt nicht beobachtet werden konnte (PLATE et al. 2005). Auch das Fasten vor den Eingriffen kann die CYP-Aktivität möglicherweise erhöht haben. Eine Studie an Ratten konnte nach 24 stündigem Fasten eine erhöhte Genexpression von CYP nachweisen (HONG et al. 1987). Eine erhöhte CYP-Aktivität führt zu einer erhöhten Metabolisierungsrate und damit zu einem schnelleren Abbau von CsA im Blut (PICHARD et al. 1990a). Infolge dessen waren die CsA-Blutspiegel der Schafe an Tag 29 niedriger

als an den Tagen zuvor. Ab Tag 36 waren die Blutspiegel in der kCsA wieder deutlich höher.

In der Literatur wird für das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes der CsA-Blutkonzentration beim Schaf ein Zeitraum von 17 Tagen beschrieben (ROSE et al. 2001). Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht sicher bestätigt werden, da die großen individuellen Unterschiede der CsA-Blutkonzentration zu dem Erreichen eines Steady State zwischen den Tagen 7 und 21 lagen. Bei Tier 13 der kCsA stellte sich kein Steady State ein, hier wurde eine maximale CsA-Blutkonzentration von 1040,0 ng CsA/ml erst an Versuchstag 57 erreicht (s. Abbildung 24 B).

Die Erkenntnisse der durchgeführten Studie führen zu der Schlussfolgerung, dass eine festgelegte Dosierungsanwendung von 3 mg CsA/kg kein idealer Ansatz ist. Zielführend wäre eine individuelle Dosierungsanpassung entsprechend des aktuellen Wirkspiegels im Blut. Dafür muss eine engmaschige Überprüfung der CsA-Konzentration im Blut durchgeführt werden. Eine standardisierte und sehr häufig angewendete Methode stellt hierbei die Messung der Talwerte von CsA im Blut dar (KAHAN 1989). Neuere Erkenntnisse führen allerdings zu dem Schluss, dass eine exaktere Bestimmung des CsA-Wirkspiegels durch die Berechnung der AUC 2 h nach Applikation ( $AUC_{2h}$ ) möglich ist (DUNCAN und CRADDOCK 2006). Demnach sollten sich in weiteren Studien unter der Verwendung von CsA die Dosierungen nach den erreichten Wirkspiegeln im Blut richten, die durch eine engmaschige Messung der  $AUC_{2h}$  überprüft werden sollten.

Ebenso lässt sich nach den Erkenntnissen der vorliegenden Studie ein Steady State der CsA-Blutkonzentration nicht allgemein bestimmen und sollte ebenfalls bei jedem Tier individuell überprüft werden. Um eine Dosisreduktion von CsA und damit eine Minimierung von Nebenwirkungen zu erreichen, können Inhibitoren des CYP wie beispielsweise Ketoconazol eingesetzt werden (ROSE et al. 2001). Bei dem Einsatz von CYP-Inhibitoren müssen jedoch deren pharmakologischen Eigenschaften in Bezug auf die Zielstellung des jeweiligen Forschungsvorhabens mit in Betracht gezogen werden.

### **5.3.2.2 Die Transplantation von fhNPZ besitzt keinen bedeutenden Einfluss auf die Sensorik und Motorik**

Die Überprüfung einer neurologischen Integrität durch die Durchführung objektiver neurologischer Verhaltenstests ist seit Jahren ein Standard in der neuroexperimentellen Forschung (SAVITZ et al. 2011). Sie dienen vor allem der Bewertung des motorischen und sensorischen Leistungsvermögens nach Stammzelltherapien und bilden damit einen wichtigen Parameter zur Beurteilung eines Therapieerfolges in Tiermodellen (SCHAAR et al. 2010). Die Beurteilung eines Therapieerfolges durch neurologische Untersuchungen beherbergt allerdings auch einige Unsicherheitsfaktoren. So spielen unabhängig von der Transplantatfunktion chirurgische und physiologische Einflüsse während und nach einer Stammzelltransplantation eine wichtige Rolle (DUNNETT 2013). Besonders die stereotaktische Zelltransplantation und die damit verbundene chirurgische Manipulation können das Gehirn und damit neurologische Prozesse beeinflussen (BOLTZE et al. 2015). Auch besitzen bestimmte Medikamente wie z.B. CsA eine neuroprotektive Wirkung, die sich auf eine neurologische

Studie auswirken können (HUNT et al. 2010). CsA führte hierbei *in vitro* und *in vivo* zu einem erhöhten Zellüberleben von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen adulter Mäuse.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine erhöhten Scores nach der Stammzelltransplantation im Vergleich zur Baseline (Mittelwert der Summe der Scores von der Freigabe bis zum Tag 21) eruiert werden (vgl. Kap. 4.2.2). Dies spricht dafür, dass die chirurgische Manipulation im Verlauf des Transplantationsprozesses wahrscheinlich keinen bedeutenden Einfluss auf die neuronale Integrität besitzt. Betrachtet man allerdings die Scores im Gruppenvergleich, so fällt auf, dass die kCsA signifikant besser abschneidet als die Kon, obwohl in keiner der drei Versuchsgruppen 42 Tage nach der Transplantation vitale fhNPZ gefunden werden konnten (s. Kap. 4.2.4). Als wahrscheinliche Ursache kommt hierbei die Wirkung von CsA in Frage (HUNT et al. 2010), welche nach einem geringgradigen, aber nicht signifikant messbaren, neurologischen Einfluss durch den Transplantationsprozess einen neuroprotektiven Effekt besitzen kann.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass bei der Betrachtung der neurologischen Verhaltenstests keine bedeutende Beeinflussung der neuronalen Integrität durch den Transplantationsprozess gezeigt werden konnte.

### **5.3.2.3 Die transplantierten fhNPZ zeigen Veränderungen in Zeitverlauf und Gruppenvergleich**

Die Volumetrie der transplantierten fhNPZ ergab in allen Gruppen eine Volumenabnahme über den Zeitraum von 42 Tagen nach der Transplantation. Diese war in der Kon tendenziell und sowohl in der iCsA als auch in der kCsA signifikant. Dies ist durch verschiedene Mechanismen zu erklären.

Zum einen kann es durch mögliche Zellteilung zu einem sogenannten Verdünnungseffekt der Eisenoxidnanopartikel kommen, indem die Partikel auf Tochterzellen aufgeteilt werden (DREYER 2012, MODO et al. 2002). Dies ist allerdings in Anbetracht der Tatsache, dass keine vitalen Zellen 42 Tage nach der Transplantation gefunden werden konnten (vgl. Kap. 4.2.4), sehr unwahrscheinlich. Zum anderen können die eisenmarkierten fhNPZ von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems abgebaut worden sein, beispielsweise durch aktivierte Mikrogliazellen (JANEWAY 2002). Geht man von dem sehr viel wahrscheinlicheren Szenario aus, dass die xenogenen Stammzellen trotz Immunsuppression abgebaut wurden, erklärt dies den Volumenabfall in allen Gruppen gleichermaßen. Eine Einleitung der Zellresorption durch Zellen des adaptiven Immunsystems (insbesondere durch T-Lymphozyten), welches hauptsächlich für eine Abstoßungsreaktion nach Transplantation verantwortlich ist (JANEWAY 2002), könnte einen Signalverlust in der Kon erklären, da diese Gruppe keine Immunsuppression erhielt.

Allerdings können auch Mechanismen des angeborenen Immunsystems in den Abbau der eisenmarkierten fhNPZ involviert gewesen sein. Dieser Teil der Immunantwort wurde durch den spezifisch die T-Zellproliferation hemmenden Wirkstoff CsA nicht beeinflusst und besitzt ebenso einen Einfluss auf die Immunantwort nach Transplantationen. Bei Herztransplantationen konnten beispielsweise bei antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. dendritischen Zellen und Makrophagen

verschiedene Rezeptoren wie z.B. die *toll-like receptors* nachgewiesen werden, die nach Aktivierung von durch Ischämie und Reperfusion freigegebenen endogenen Liganden zu einer Abstoßungsreaktion führen (MILLINGTON und MADSEN 2009). Insgesamt zeigte die kCsA zu jedem Zeitpunkt signifikant größere Volumina als die iCsA und größere Volumina als die Kon, diese waren jedoch nicht signifikant. Die Ursache dieser unterschiedlichen Volumina kann zum einen in einer erfolgreichen Immunsuppression und damit in einem geringeren Abbau der transplantierten Stammzellen liegen als in der iCsA. Dies erklärt jedoch nicht, warum die Volumina der Eisensignale nicht auch (signifikant) größer als die der Kon waren. Differentialdiagnostisch muss hierbei eine möglicherweise durch den Transplantationsprozess ausgelöste Blutung in Betracht gezogen werden. Diese kann in allen Gruppen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit aufgetreten sein. Die hohen Standardabweichungen sowohl der Kon als auch der kCsA im Gegensatz zur iCsA lassen die Vermutung zu, dass es hier möglicherweise zu Blutungen während der Transplantation der fhNPZ gekommen ist. Histologisch konnte jedoch bei keinem der 15 Versuchstiere eine Blutung im Hirn nachgewiesen werden. Aufgrund der schwierigen Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Blutungsarealen und Stammzelltransplantaten können diese MRT-Aufnahmen nur unterstützend zu einer histologischen Auswertung bezüglich des Zellüberlebens 42 Tage nach Transplantation ausgewertet werden. Zudem wird die volumetrische Auswertung durch den sogenannten „*blooming effect*“ (Überstrahlungsartefakt) verfälscht. Hierbei besitzt die Dephasierung des angeregten Protons eine räumliche Wirkung, die um bis zu das 50fache über das des benachbarten Protons hinaus geht (DREYER 2012, DREYER et al. 2012). Dadurch kommt es zu einer deutlich vergrößerten Signalauslöschung, welches bei der Bildauswertung zu einer Überschätzung des eigentlichen Volumens der eisenmarkierten fhNPZ führt (DODD et al. 1999).

#### **5.3.2.4 Es können keine vitalen fhNPZ 42 Tage nach Transplantation im Schafhirn nachgewiesen werden**

In der tierexperimentellen Forschung zur zelltherapeutischen Behandlung neurovaskulärer Erkrankungen wurden zahlreiche Versuche durchgeführt und eine Vielzahl von zellspezifischen Mechanismen zur Gewebsregeneration und Gewebsrehabilitation, sowie deren negative Effekte entdeckt (DUNNETT 2013). So kann beispielsweise die chirurgische Prozedur der Stammzelltransplantation ins Gehirn traumatische Effekte auf das das Transplantat umgebende Gewebe besitzen und z.B. durch Gefäßverletzungen zu einer subduralen oder intraparenchymatösen Hämorrhagie führen (HAUSER et al. 2002). Ebenso kann es zu Tumorbildung nach Transplantation fetaler Stammzellen kommen (MAMELAK et al. 1998).

Positive Wirkungen werden durch die Fähigkeit der transplantierten Stammzellen zur Sekretion neuroendokriner wirksamer Substanzen erreicht. So wurden beispielsweise GDNF-produzierende Zellen zur Therapie der Parkinsonschen Erkrankung bei Ratten transplantiert (LINDNER et al. 1995). Diese Möglichkeit der Stammzellen zur Sekretion neuroprotektiver oder neurotropher Substanzen, die zu einer Verlangsamung von Krankheitsbildern oder zu einer plastischen Gewebereorganisation führen,

bieten eine Vielzahl an therapeutischen Ansatzpunkten (DUNNETT 2013). Das Langzeitüberleben transplantierter Stammzellen und deren vollständige Integration in das Empfängerhirn kann zu einem verbesserten klinischen Erscheinungsbild auf motorischer und kognitiver Ebene nach einem zerebrovaskulären Schaden führen (DUNNETT 1999).

Die histologische Untersuchung der Schafhirne in Bezug auf vitale fhNPZ 42 Tage nach Transplantation ergab, dass in keiner der Gruppen lebende Zellen gefunden werden konnten. Es konnten lediglich Zellfragmente aufgefunden werden, die Eisenoxidnanopartikel enthielten und in den meisten Fällen sowohl gefäßassoziiert auftraten, als auch von aktivierten Mikrogliazellen umsäumt waren.

Die Etablierung der Nachweismethode von vitalen fhNPZ erfolgte in der vorliegenden Arbeit in der Anfertigung einer Positivkontrolle von post mortem ins gesunde Schafhirn injizierten fhNPZ auf Grundlage von in Nagermodellen validierten immunhistochemischen Methoden (GUZMAN et al. 2007, TAMAKI et al. 2009) (vgl. Kap. 2.2.4.2). Diese Probe wurde histologisch sofort aufgearbeitet und zeigt vitale eisenmarkierte fhNPZ im Schafhirn (s. Abbildung 27 PK STEM101-DAB + BB). Eindeutig können in dieser Abbildung morphologisch intakte Zellen mit einem braun gefärbten Zellkern und blau markierten Eisenoxidnanopartikel im Zytoplasma identifiziert werden. In der Negativkontrolle, s. hierzu Abbildung 27 NK DAB + BB, wurden die humanen Zellkerne nicht wie zuvor mit dem STEM101-Antikörper markiert. Folglich sind keine braunen Farbniederschläge in den humanen Zellkernen zu erkennen, wenngleich die blauen Eisenoxidnanopartikel deutlich sichtbar in den Zellen vorliegen. Betrachtet man hingegen die *ex vivo* angefertigten Präparate 42 Tage nach Transplantation so sind vor allem morphologisch keine vitalen humanen Zellkerne erkennbar (s. Abbildung 28 STEM101-DAB). Ein Phänomen sind Proben-Negativkontrollen (Beispiel s. Abbildung 28 Proben-NK-DAB), da diese ebenfalls einen DAB-positiven Befund in Form von großen dunkelbraunen Farbniederschlägen aufwiesen. Da hier morphologisch keine Zellkerne darstellbar sind, sondern nur Zellfragmente, muss ein Abbauprozess im Rahmen einer Zelllyse zu einer Freisetzung von Enzymen und Proteinen mit peroxidatischer Aktivität geführt haben, die unspezifisch das Chromogen DAB zu einem dunkelbraunen Farbniederschlag umsetzten (BAUMGÄRTNER und GRUBER 2015, FAHIMI 1979). Bestätigt wird dies durch das erhöhte Vorhandensein aktivierter Mikrogliazellen in der Transplantatumgebung (s. Abbildung 28 Iba1), die einen wichtigen Teil des mononukleären Phagozytosesystem des Gehirns bilden (KIERDORF et al. 2013). In Studien mit einem langfristigen Zellüberleben im murinen Gehirn konnte hingegen keine erhöhte Anzahl aktivierter Mikrogliazellen in der Transplantatumgebung nachgewiesen werden (TAMAKI et al. 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transplantation xenogenen fhNPZ trotz Immunsuppression zu einem aktiven immunologischen Prozess in Form einer Abstoßungsreaktion im Schafhirn führte. Eine Studie an Ratten nach Schlaganfall zeigte hingegen ein solides Zellüberleben der fhNPZ 4 Wochen nach Transplantation unter Immunsuppression mit CsA (10 mg/kg) (BLISS et al. 2006). Ein Unterschied zwischen den Studien bestand in der Anzahl der transplantierten Stammzellen. Während

in der Studie von BLISS et al. (2006) den Ratten 3.000.000 fhNPZ in das Gehirn transplantiert wurden, wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 400.000 fhNPZ pro Schaf, verteilt auf 2 kontralaterale Lokalisationen, verwendet. Diese Unterschiede können einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Zellüberlebens besitzen. Bei der Untersuchung von 3 Versuchstieren, die an Tag 1 nach Transplantation verstarben, konnten ebenfalls nur noch Zellfragmente der fhNPZ aufgefunden werden. Dafür kommen zwei Gründe in Frage: Zum einen kann eine Abstoßungsreaktion der xenogenen Stammzellen durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems zeitnah nach der Transplantation eingesetzt haben (vgl. Kap. 5.3.2.3). Zum anderen können die Zellen infolge des Transplantationsprozesses (Aufziehen durch dünne Hamilton-Spritze, Spritzen ins Gehirn mit entsprechendem Gewebedruck) beschädigt worden sein. Die zweite Möglichkeit ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da für die Positivkontrolle zum Nachweis vitaler fhNPZ im Schafhirn post mortem die Zellen mit einer Hamilton-Spritze in das Gehirn injiziert wurden und diese Zellen keine negative Beeinflussung zeigten (s. Abbildung 27 PK STEM101-DAB + BB). Demzufolge muss dem Abbau der transplantierten fhNPZ eine Abstoßungsreaktion aufgrund einer unzureichenden Immunsuppression zugrunde liegen (s. Kap. 5.3.2.3). Eine alternative Erklärung wären durch den operativen Eingriff bedingte inflammatorische Reaktionen am Transplantationsort (DUNNETT 2013). Im vorliegenden Versuch können die transplantierten fhNPZ jedoch sekretorisch neuroendokrine Substanzen nach der Transplantation ausgeschüttet haben. Deren möglicherweise positiven Effekte lassen sich jedoch erst in einem Schlaganfallmodell mit motorischen Ausfällen darstellen.

#### **5.3.2.5 Schlussfolgerung zur Immunsuppression mittels CsA nach Stammzelltransplantation ins Schafhirn**

Die Immunsuppression mit CsA in der angewendeten Konzentration (6 mg CsA/kg/d) besitzt keinen Einfluss auf das Zellüberleben nach Transplantation beim Schaf. Die beschriebene Immunprivilegierung des Gehirns (BECHMANN 2001) konnte in diesem xenogenen Transplantationsversuch durch das Vorhandensein von aktivierten Mikrogliazellen in unmittelbarer Nähe zu den eisenmarkierten Zellfragmenten nicht belegt werden. Aus diesem Grund wird in der Literatur häufig die Anwendung einer Kombinationstherapie zur Immunsuppression unter Mitverwendung von Glukokortikoiden beschrieben (ARCHER et al. 2014). RAMIREZ et al. (2011) konnte mit seiner angewendeten Kombinationstherapie erfolgreich eine Langzeit-Uterusallotransplantation beim Schaf inklusive einer erfolgreichen Trächtigkeit durchführen. Hierbei wurde eine Dosierung von 8 mg CsA/kg/d oral verabreicht. Zusätzlich wurden 5 mg Prednisolon/kg/d ab 2 Tagen vor der Transplantation bis zur 2. postoperativen Woche i.m. injiziert. Da der Transplantationserfolg von fhNPZ bei Ratten mit einer Dosierung von 10 mg CsA/kg bereits beschrieben wurde (BLISS et al. 2006), ist auch ein weiterer Therapieversuch mit CsA in größeren Dosierungen (Wirkspiegel > 1500 ng CsA/ml) unter Einsatz eines CYP-Inhibitors, wie z.B. Ketoconazol denkbar (PICHARD et al. 1990a, PICHARD et al. 1990b, ROSE et al. 2001).

Neuere immunmodulatorische Ansätze unter dem Einsatz von Antikörpern konnten ebenfalls bei einer

Langzeit-Uterusallotransplantation beim Schaf erfolgreich eine Immunantwort und damit eine Abstoßungsreaktion unterdrücken (WEI et al. 2013). Hierbei wurde die immunsuppressive Therapie 2 Tage vor der Transplantation mit der oralen Applikation von 0,02 - 0,15 mg Tacrolimus (Tcr)/kg/d und 1,5 g Mycophenolat-Mofetil/d begonnen, die bis zum Ende des Versuchs fortgeführt wurde. Die einzustellende Zielkonzentration im Blut betrug 3000 - 6000 ng Tcr/ml. Während der Transplantation wurde den Schafen 50 mg Antithymozytenglobulin als intravenöse Dauerinfusion und 500 mg Methylprednisolon (MP) verabreicht. Nach der Transplantation erhielten die Schafe 40 mg MP/d für 15 Tage mit anschließendem Ausschleichen auf 16 mg MP/d. Dementsprechend sollte eine weitere Evaluierung des optimalen Immunsuppressionsprotokolls nach Stammzelltransplantation ins Schafhirn erfolgen. Dies sollte unter Verwendung einer Kombinationstherapie und einer dem Wirkspiegel im Blut angepassten Dosierung von CsA oder neueren immunmodulatorischen Ansätzen geschehen (DIEHL et al. 2016).

Der *In-vivo*-Nachweis der eisenmarkierten fhNPZ stellte sich als unzureichend heraus, da zum einen das Eisensignal nicht von einer Blutung unterschieden werden konnte und zum anderen auch die verbliebenen Zellfragmente zu einem positiven Eisensignal führten. Dies besaß aber keine Aussagekraft in Bezug auf das Zellüberleben.

### **5.3.3 Die Langzeitgabe von CsA verursacht Anzeichen für pathologische Veränderungen und klinische Symptome beim Schaf**

Die Anwendung von Immunsuppressiva in einem für eine Organ- oder Stammzelltransplantation benötigten Maß geht immer mit Nebenwirkungen einher (DIEHL et al. 2016). Diese sind dabei oft eng mit der verabreichten Dosis assoziiert.

#### **5.3.3.1 Die Langzeitgabe von CsA beeinflusst klinische Parameter beim Schaf**

Die Körpertemperatur ist häufig aufgrund von Infektionen oder Stresssituationen für das Tier erhöht. Eine erhöhte Infektionsrate während einer Gabe von 5 mg CsA/kg/d kann beim Menschen (BACIGALUPO et al. 1991) und selten beim Hund (STEFFAN et al. 2006) auftreten. Beim Schwein konnten Infektionen wie Pneumonien und septische Arthritiden ab einer Dosierung von 40 mg CsA/kg/d ausgelöst werden (USTÜNER et al. 1998). Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit konnten beim Schaf keine erhöhte Infektionsanfälligkeit nach CsA-Gabe bei einer Dosierung von 6 mg CsA/kg/d zeigen, da die Messung der Körpertemperatur über den gesamten Versuchszeitraum von 64 Tagen keine auffälligen Veränderungen ergab.

Die Gabe von CsA führte bei Hunden zu einem verminderten Appetit bis hin zur Anorexie (STEFFAN et al. 2006). Bei den Schafen im vorliegenden Versuch konnten keine Anzeichen dafür, wie beispielsweise ein abnehmendes Körpergewicht, im Verlauf des Versuchs beobachtet werden.

### **5.3.3.2 Die Langzeitgabe von CsA zeigt wahrscheinlich keine hämodynamische Wirkung**

Des Weiteren wird berichtet, dass CsA die Hämodynamik beeinflussen kann. Dies bedeutet Bluthochdruck (Hypertension), Tachykardie, ein Abfall des Herzindex sowie einen erhöhten peripheren Widerstand (GREENBERG et al. 1985). WHITWORTH et al. (1987) konnten dies in ihrem Akutversuch (12 mg CsA/kg/d) am Schaf belegen. Die Herzfrequenz erhöhte sich von 58 auf 75 Schlägen/min und das Herzminutenvolumen sank von 86 auf 68 ml/Herzschlag. Zusätzlich stieg der Blutdruck von 73 auf 90 mmHg und der periphere Widerstand von 16 auf 21 mmHg. Eine Veränderung in der Nierenfunktion wurde hierbei nicht detektiert. Studien am Menschen gelangten zu ähnlichen Ergebnissen (SCOTT et al. 2003). Demgegenüber berichten andere Autoren vom umgekehrten Effekt im Rattenmodell. MURRAY et al. (1985) konnten in ihren Studien an Ratten einen Blutdruckabfall bei einer Dosierung von 20 mg CsA/kg (intravenös oder intraperitoneale Applikation) feststellen. Allerdings wurde auch hier keine Veränderung im Herzminutenvolumen eruiert. In der gleichen Studie konnten bei einer Dosis von 10 mg CsA/kg keine Veränderungen im Blutdruck diagnostiziert werden. Ein erhöhter Blutdruck entsteht durch einen gesteigerten peripheren Widerstand bei unverändertem Herzminutenvolumen (GREENBERG et al. 1985, SHAPIRO et al. 1990). Die Frage nach der Ursache des peripheren Widerstandanstiegs lassen WHITWORTH et al. (1987) die These aufstellen, dass CsA einen aktivierenden Einfluss auf den Sympathikus haben könnte. Grund für ihre Annahme war unter anderem, dass die Nierenfunktion in ihrem Schafmodell keine Veränderungen und damit Hinweise auf ein Zusammenspiel mit dem Anstieg des Blutdrucks zeigte. Zudem stützt sich diese These auf frühere Forschungen, in denen von einem Einfluss auf den Blutdruck durch das Renin-Angiotensin-System abgesehen wird, da 5 von 7 hypertensiven Patienten, die nach einer Nierenallotransplantation mit CsA behandelt wurden, keine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems zeigten (ADU et al. 1983, STANEK et al. 1985).

Toxizitätsstudien am Schafsmodell konnten den negativen Einfluss von CsA auf die Nieren nicht bestätigen. Zwar sank die Kalium- und Natriumsekretion, der effektive Plasmafluss stieg jedoch an. Zudem wurde keine Veränderung in der glomerulären Filtrationsrate oder in der Aldosteron-Konzentration gemessen. Das führt zu der These, dass CsA eine direkte Wirkung auf das Tubulussystem der Niere und seine Epithelien haben könnte (WHITWORTH et al. 1987). Da in der vorliegenden Studie bei einer Dosierung von 6 mg CsA/kg/d keine Blutdruckveränderungen zu erkennen waren, kann man davon ausgehen, dass CsA beim Schaf erst in höheren Dosierungen einen Einfluss auf den Blutdruck besitzt. Diese These muss allerdings kritisch vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass in dieser Studie die mittleren arteriellen Blutdrücke nur in Narkose erhoben werden konnten.

### **5.3.3.3 Die Gabe von CsA zeigt Anzeichen für eine hämatologische Wirkung beim Schaf**

Die Werte der Erythrozyten- und Hämoglobin-Konzentration sowie des Hämatokrits sind sowohl der iCsA als auch der kCsA im Vergleich zur Kon hochsignifikant niedriger zu bewerten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass die Applikation von CsA in 100 - 150 ml

isotonischer Kochsalzlösung erfolgte, während die Kon keine Vehikelinfusion erhielt. Allerdings sollte eine normale Nierenfunktion diese Flüssigkeitszufuhr regulatorisch ausgleichen. Da keine gravierenden Nierenschädigungen eruiert werden konnten (s. Kap. 4.3), ist diese Erklärung sehr unwahrscheinlich. Zudem wurden die Blutproben für die Analyse der Blutparameter aus der Portkammer entnommen, um die Venen für die Entnahme der CsA-Blutproben zu schonen. Die Portkammer wurde hierfür zunächst gespült und anschließend wurden vor der eigentlichen Blutprobenentnahme mindestens 10 ml Blut verworfen. Auch dies kann möglicherweise zu einem Verdünnungseffekt geführt haben.

Eine weitere sehr viel wahrscheinlichere Ursache kann darin liegen, dass die Einnahme von CsA eine Anämie durch Eryptose auslösen kann (NIEMOELLER et al. 2006). Von diesem Phänomen wurde in den vorangegangenen Studien am Schaf aber nicht berichtet (ROSE et al. 2001, WHITWORTH et al. 1987). Eine deutliche Anämie lässt sich in diesem Versuch nicht diagnostizieren, da die Werte der iCsA und der kCsA im unteren oder leicht unterhalb des Referenzbereichs liegen (Referenzbereich s. Tabelle 46). Daher ist die Art der Blutprobenentnahme die wahrscheinlichste Erklärung für die hochsignifikant niedrigeren Blutparameter.

Eine weitere Erklärung für die hochsignifikant niedrigere Erythrozyten- und Hämoglobin-Konzentration im Blut, sowie den hochsignifikant niedrigeren Hämatokrit der iCsA und kCsA im Vergleich zur Kon kann das Vorhandensein eines chronischen Krankheitsprozesses in der Leber sein (BAUER et al. 2014). Ursächlich hierfür kann die Langzeitgabe von CsA in Frage kommen (s. Kap. 5.3.3.4).

#### **5.3.3.4 Die Gabe von CsA zeigt eine hepatotoxische Wirkung beim Schaf**

CsA besitzt eine hepatotoxische Wirkung beim Menschen (BACIGALUPO et al. 1991). Die Gabe von CsA führte bei Mäusen zu Leberzellnekrosen, Zelltod und Ansammlungen von Lipidtröpfchen im Zytoplasma (Leberverfettung) (KIENHUIS et al. 2013). Ursächlich hierfür ist die Induktion von Zellstress bei den Hepatozyten durch CsA, welcher zu einer Schwellung der Mitochondrien und einem veränderten Transport von Aminosäuren vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat führt (VAN SUMMEREN et al. 2013). Zudem kann die Applikation von CsA sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen zu einer Cholestase führen (KIENHUIS et al. 2013, SCOTT et al. 2003). CsA hemmt Gallensäuren-Export-Proteine (TRAUNER und BOYER 2003) und führt dadurch zu einer Ansammlung von Gallensäuren, Cholesterol und Bilirubin in den Hepatozyten, wodurch eine Cholestase entsteht (ALREFAI und GILL 2007). ROSE et al. (2001) beschreiben in ihrem Langzeittransplantationsmodell (Hauttransplantation) am Schaf einen reversiblen Anstieg der Serum-Bilirubin-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf  $29 \pm 11 \mu\text{M}$  nach 9 Wochen Behandlung mit CsA (2 - 3 mg/kg 2x tägl., 10 mg Ketoconazol/kg 2x tägl.). Zwei Wochen nach Behandlungsende sank die Serum-Bilirubin-Konzentration auf  $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . Zusätzlich erfolgte eine Reduktion von Albumin von 32 g/l auf 22 g/l im Laufe des Experiments, was insgesamt eine hepatische Affektion vermuten lässt. Auch in einer Mäusestudie konnte eine verminderte Expression von Albumin in den Hepatozyten nach CsA-

Gabe gezeigt werden (VAN SUMMEREN et al. 2013).

Zur Beurteilung der Lebergesundheit gibt es verschiedene tierartsspezifische Leberparameter. Beim Schaf können vor allem die AST und die GDLH diagnostisch eingesetzt werden (BAUER et al. 2014). Über diese beiden Parameter kann eine Aussage über die Leberzellintegrität und vorhandene Leberzellnekrosen getroffen werden. Bei leichten Leberzellschäden werden zunächst zytosolische Leberenzyme wie die ASAT freigesetzt. Bei schwereren Schädigungen der Hepatozyten gelangt zusätzlich GLDH aus den intrazellulären Organellen in die Blutbahn (BAUER et al. 2014). Ein alleiniger Anstieg der ASAT-Aktivität im Blut ist allerdings sehr unspezifisch, da diese auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. Myopathien, Lebertumoren oder -abszessen erhöht sein kann. In Kombination mit der Betrachtung der CK, können Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Myopathien getroffen werden.

Die Referenzwerte, auf die in der vorliegenden Arbeit verwiesen werden, setzen sich zum einen aus den empfohlenen Referenzen nach BAUER et al. (2014), sowie aus den empfohlenen Werten des untersuchenden Labors der Medizinischen Tierklinik, der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig (SCHUSSER 2015) zusammen. Vor allem bei der Bestimmung der Enzymaktivität verweisen BAUER et al. (2014) auf die Angaben des jeweiligen untersuchenden Labors. Im Anhang befinden sich in Tabelle 46 die bei der Beurteilung verwendeten Referenzwerte.

In der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang bei einem Schaf (Tier 4) aus der Kon ein wahrscheinliches Vorliegen einer idiopathischen Myopathie diagnostiziert werden, welche bereits zu Versuchsbeginn durch eine gleichzeitig gesteigerte ASAT-, GLDH- und CK-Aktivität (ASAT: 391,5 U/l; GLDH: 355,5 U/l; CK: 1092 U/l) im Blut vorlag. Im weiteren Versuchsverlauf waren die ASAT- und die GLDH-Aktivitäten dieses Tieres erhöht, weshalb dieses Tier bei der Betrachtung von leberspezifischen Parametern von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurde.

An Tag 7 nach Versuchsbeginn zeigte Tier 12 in der kCsA deutlich erhöhte ASAT- und GLDH-Werte (ASAT: 613,6 U/l; GLDH: 119,1 U/l), welche auf Leberzellnekrosen hindeuten. An den folgenden Untersuchungstagen konnte dieser Befund jedoch nicht weiter erhärtet werden. Auch die Ergebnisse der pathologischen und histopathologischen Untersuchung zeigten bei Tier 12 aus der kCsA keine besonderen Auffälligkeiten. Daher wird hier von einem einmaligen Ereignis ausgegangen, welches die Lebergesundheit beeinflusst, jedoch nicht in der Weise chronisch schädigte, wie bei den hepatotoxischen Einflüssen von CsA berichtet wird.

Besonders auffällig war die Untersuchung an Tag 29, da die Tiere in allen 3 Versuchsgruppen deutlich erhöhte ASAT-Aktivitäten aufwiesen (mehr als dreifach erhöht gegenüber dem angegebenen Referenzwert, s. Tabelle 46). Die Aktivität der GLDH hingegen war zu diesem Untersuchungszeitpunkt unauffällig. Diese Veränderung steht somit höchstwahrscheinlich in engem Zusammenhang mit der Langzeitinhalationsnarkose mittels Isofluran (Stammzelltransplantation an Tag 22) und der ersten 3,0 T MRT-Untersuchung an Tag 23 (s. Abbildung 35 A). Bei Hunden konnte 2 - 7 Tage nach einer Isofluran-Narkose eine erhöhte ASAT-Aktivität im Blut gemessen werden (TOPAL et al. 2003). Bei Ziegen zeigte sich ebenfalls eine erhöhte ASAT-Aktivität im Blut nach einer

mit Isofluran durchgeführten Inhalationsnarkose (MCEWEN et al. 2000).

Generell ist die Aussagekraft für die Hepatozytenintegrität durch die Betrachtung der GLDH-Aktivität im Blut deutlich spezifischer als die der ASAT-Aktivität (BAUER et al. 2014). Hierbei war auffällig, dass sowohl die iCsA, als auch die kCsA gesteigerte GLDH-Aktivitäten im Blut gegenüber der Kon aufwiesen, welche allerdings nicht signifikant waren (s. Abbildung 36 B). In der kCsA wiesen 3 von 5 Tieren im Zeitverlauf gesteigerte GLDH-Aktivitäten auf, während dies an Tag 7 auch 2 von 5 Tieren aus der iCsA betraf (Referenzbereich s. Tabelle 46). Diese Ergebnisse könnten Rückschlüsse auf eventuelle subklinische Schäden der CsA-Applikation auf die Hepatozyten geben. In der pathologischen und histopathologischen Untersuchung konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigt werden, hier zeigten alle 3 Versuchsgruppen keine Unterschiede. Die makroskopische Untersuchung der Schafslebern war allgemein unauffällig.

Die Betrachtung der histologischen Präparate und deren statistische Auswertung konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf degenerative oder nekrotische Prozesse feststellen. Differentialdiagnostisch kommen beim Wiederkäuer auch Nierenschäden für eine veränderte Aktivität der GLDH im Blut in Frage (BAUER et al. 2014), s. dazu Kap. 5.3.3.5.

Zur Beurteilung einer vorhandenen Cholestase werden als spezifische enzymatische Cholestasemarker die Aktivität der ALP und der GGT gemessen, wobei vor allem die GGT auch diagnostisch beim Wiederkäuer eingesetzt wird, während die ALP als artspezifischer Cholestasemarker bei Hund, Katze und Pferd aussagekräftig ist (BAUER et al. 2014). Daher wurde bei der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Aktivität der GGT im Blut der Versuchstiere gelegt. Bei der Auswertung der Daten konnte nur bei einem Tier der kCsA (Tier 12) eine erhöhte GGT-Aktivität über den gesamten Verlauf des Versuchs gemessen werden. In Kombination mit den erhöhten ASAT- und GLDH-Werten an Tag 7 kann von einer regenerativen Leberzellschädigung mit Tendenz zur Cholestase ausgegangen werden. Pathologisch und histopathologisch waren jedoch keine Auffälligkeiten zu finden, die auf eine Cholestase hindeuten könnten. Die Bilirubin-Konzentration zeigte im vorliegenden Versuch im Gegensatz zu den Studien von ROSE et al. (2001) keine auffälligen Veränderungen. Dies passt zu dem Befund, dass histologisch keine Cholestase gefunden werden konnte.

Hepatopathien, wie beispielsweise eine toxische Leberzellschädigung, können unter anderem die Syntheseleistung der Hepatozyten herabsetzen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der Proteinstoffwechsel, vor allem die Bildung von dem Plasmaprotein Albumin (BAUER et al. 2014). In der vorliegenden Studie konnte eine signifikant niedrigere Albumin-Konzentration in der iCsA im Vergleich zur Kon im Erhebungsbereich AUC-III gemessen werden. Ebenso waren bei der iCsA und der kCsA die Albumin-Konzentrationen im Blut an Tag 64 signifikant kleiner als an Tag 1. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Befunden der Schafstudie von ROSE et al. (2001) und zeigen eine hepatische Affektion durch CsA.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Langzeitgabe von 6 mg CsA/kg/d beim Schaf zu keinen deutlichen Leberzellschäden in Form von degenerativen oder nekrotischen Prozessen führt; es sind

jedoch Anzeichen einer hepatischen Affektion im Blut nachweisbar. Klinisch konnte bei einem Tier der kCsA die Tendenz zu einer Cholestase durch erhöhte GGT-Aktivität im Blut nachgewiesen werden. Den weitaus größeren Einfluss auf die Leberfunktion besaß die Durchführung mehrerer Narkosen in kurzen Zeitabständen, insbesondere die Inhalationsnarkose mittels Isofluran.

#### **5.3.3.5 Die Gabe von CsA zeigt eine nephrotoxische Wirkung beim Schaf**

Eine weitere, sehr häufig beschriebene Nebenwirkung von CsA-Applikationen bei Mensch und Tier ist die Nephrotoxizität (BOBADILLA et al. 1998, KAWAGUCHI et al. 2001, SCOTT et al. 2003). Diese tritt vor allem in Abhängigkeit vom CsA-Blutspiegel auf, beispielsweise beim Menschen ab einer Dosierung von 5 mg CsA/kg/d p.o. (BACIGALUPO et al. 1984). Diese Nebenwirkungen treten nicht nur bei Nieren-, sondern auch bei anderen soliden Organtransplantationen auf (AHN et al. 2007) und führten in einigen Studien von einer Flüssigkeitsretention (JOSS et al. 1982) bis hin zur Anurie (CRAVEDI et al. 2005). In einem Rattenmodell (25 und 50 mg CsA/kg als Einzeldosis) wurde eine herabgesetzte Clearance von Inulin und eine geringere Filtrationsrate festgestellt (KAWAGUCHI et al. 2001). Toxizitätsstudien von WHITWORTH et al. (1987) am Schafsmodell konnten diesen negativen Einfluss von CsA auf den Urogenitaltrakt nicht bestätigen. Zwar sank die Kalium- und Natriumsekretion, der effektive Plasmafluss stieg jedoch an. Zudem wurde keine Veränderung in der glomerulären Filtrationsrate oder in der Aldosteron-Konzentration gemessen. Die Nierenfunktion in dem vorliegenden Versuch wurde mittels der Harnstoff- und der Kreatinin-Konzentration im Blut untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Harnstoff-Konzentration der kCsA im Erhebungsbereich AUC-II tendenziell niedriger war als die der Kon, während die Kreatinin-Konzentration unauffällig war. Beide nierenspezifischen Parameter bewegten sich im Verlauf des Versuchs innerhalb der angegebenen Referenzbereiche (s. Tabelle 46).

Die Nephrotoxizität wird bei CsA vor allem durch eine renale Vasokonstriktion ausgelöst. In der Niere führen ein Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen wie beispielsweise eine Erhöhung von Vasokonstriktoren (Endothelin und Angiotensin II), sowie eine verminderte Konzentration von Vasodilatoren (Prostacyclin und Stickstoffmonoxid) zu einer renalen Vasokonstriktion. Dies führt zu chronischen Entzündungen mit irreversiblen strukturellen Schäden (BOBADILLA et al. 1998). Histologisch manifestierten sich diese toxischen Einflüsse auf die humanen Nieren in einer obliterativen Arteriopathie mit Ansammlungen von proteinhaltigem Material in den Wänden nekrotischer Arteriolen, assoziiert mit tubulointerstitiellen Schäden. Einige wenige Glomeruli zeigten ischämischen Kollaps oder Sklerose, die restlichen Glomerula zeigten eine signifikante Expansion des Mesangiums (MYERS et al. 1988). Bei Ratten konnten glomeruläre Thombosen, vakuoläre Degeneration proximaler Tubulusepithelzellen und eine Fibrose der Arteriolen nach CsA-Applikation festgestellt werden (BOBADILLA et al. 1998). In dem Transplantationsmodell am Schaf von ROSE et al. (2001) zeigten sich chronische Tubulonekrosen nach einer CsA-Gabe von 21 Tagen.

In dem vorliegenden Versuch konnten makroskopisch keine Auffälligkeiten an den Nieren nach CsA-Gabe festgestellt werden. Einzig eine Niere aus der kCsA (Tier 15) zeigte makroskopisch sichtbare

Veränderungen (vgl. Abbildung 43). Histologisch konnten an den Nieren aller Versuchsgruppen degenerative Prozesse festgestellt werden (s. Abbildung 44), die sich aber statistisch nicht voneinander unterschieden. Wenn es durch Schäden der Nierentubulusepithelzellen, beispielsweise aufgrund toxischer Einflüsse, zu Blutungen in das umliegende Gewebe oder die Tubuluslumen kommt, führt dies zu einer erhöhten Ansammlung von dem Blutabbauprodukt Hämosiderin in den Tubulusepithelzellen. Hämosiderin kann durch seinen hohen Gehalt an dreiwertigem Eisen histologisch über die Berliner Blau-Färbung als blaues Pigment nachgewiesen werden (BAUMGÄRTNER und GRÖNE 2012). Dieses blaue Signal kann dementsprechend über Bildverarbeitungssysteme quantitativ ausgewertet und verglichen werden. In der spezifischeren Untersuchung chronischer toxikologischer Einwirkungen konnten in der kCsA signifikant mehr Einlagerungen von Hämosiderin in den Nierentubulusepithelzellen als in der Kon gezeigt werden, während sich die Werte der iCsA in der Mitte zwischen den Werten der Kon und der kCsA einordneten (s. Abbildung 44). Einen histologischen Nebenbefund stellte das Auffinden einer interstitiellen nicht-eitrigen Nephritis mit lymphozytärer Infiltration dar. Dabei waren von diesem Erscheinungsbild die Nieren der Tiere aller drei Versuchsgruppen betroffen. Auffällig war jedoch, dass 4 von 5 Tieren in der Kon und nur jeweils ein Tier in der iCsA und kCsA davon betroffen waren. Eine interstitielle nicht-eitrige Nephritis mit lymphozytärer Infiltration ist beim Schaf ätiologisch sehr wahrscheinlich mit parasitären Darminfektionen wie z.B. einer Kokzidieninfektion (Toxoplasmose) zurückzuführen (RHYAN und DUBEY 1984). Die Tiere wurden zwar vor Versuchsbeginn gegen Endoparasiten behandelt, allerdings kann eine Reinfektion nicht ausgeschlossen werden. Das vermehrte Auftreten der interstitiellen nicht-eitrigen Nephritis in der Kon führte sehr wahrscheinlich zu entzündlichen und degenerativen Prozessen in den Nieren und erklärt die hohe Summe der Bewertungsschlüssel (Score) in der Kon. Die deutlich geringere Ausprägung dieses Nebenbefundes in der iCsA und der kCsA lässt sich durch die Anwendung von CsA erklären. Demzufolge kommt es zu einer Inhibition der Lymphozytenproliferation, speziell der T-Lymphozyten (HALLORAN et al. 1999) und damit sehr wahrscheinlich zu einer verminderten lymphozytären Infiltration, sowie einer geringeren Entwicklung der entzündlichen Prozesse. Die Scores der Nieren waren in der Kon und der kCsA deutlich höher als bei den Lebern. In der Kon lässt sich dies sehr wahrscheinlich durch das Vorhandensein der interstitiellen nicht-eitrigen Nephritis bei 4 von 5 Tieren erklären, während in der kCsA sehr wahrscheinlich die ggr. Nephrotoxizität hierfür verantwortlich ist. Für die Auswertung möglicher Schäden von CsA auf die ovinen Nieren ist folglich nicht nur die reine Analyse degenerativer und entzündlicher Prozesse, sondern vor allem die spezifische Untersuchung chronischer Schäden, wie z.B. der Einlagerung von Hämosiderin in die Tubulusepithelzellen von großer Bedeutung.

Schlussfolgernd aus den vorliegenden Befunden kann man von einer dosisabhängigen Nephrotoxizität von CsA beim Schaf ausgehen. Die Auswirkungen waren dabei bei einer maximalen Dosierung von 6 mg CsA/kg/d über 64 Tage nur als geringgradig, anhand der vermehrten Hämosiderin-Einlagerungen, einzustufen und verliefen aufgrund der unveränderten nierenspezifischen Blutparameter subklinisch.

### **5.3.3.6 Die Langzeitgabe von CsA beeinflusst weitere unspezifische Blutparameter**

Eine Studie zeigte beim Schaf eine Abnahme der Kalium-Blutkonzentration von 4,3 zu 4,0 mmol/l bei einer Dosierung von 12 mg CsA/kg/d (WHITWORTH et al. 1987). Dies konnte im vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden. Allerdings konnte eine signifikant höhere Chlorid-Konzentration der iCsA im Vergleich zur Kon im Zeitraum AUC-I gemessen werden. In der Literatur ist aber bisher nichts dazu bekannt, was hier einen Zusammenhang mit der Gabe von CsA herstellen könnte.

### **5.3.3.7 Schlussfolgerungen zu Nebenwirkungen von CsA beim Schaf**

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Nebenwirkungen von CsA im Schaf zeigten keine gravierenden Veränderungen. CsA kann jedoch möglicherweise eine subklinische hämatologische Wirkung besitzen. Ebenso besitzt es beim Schaf höchstwahrscheinlich eine geringgradige Hepato- und Nephrotoxizität. Schwerwiegende Nebenwirkungen von CsA im Schaf können bei der angewendeten Dosierung (6 mg CsA/kg/d) und Dauer (64 Tage) sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

## **5.4 Allgemeine Schlussfolgerung**

Zusammenfassend können die zu Beginn dieser Dissertation aufgestellten Arbeitshypothesen (vgl. Kap. 2.4) folgendermaßen beantwortet werden:

### **1. Ein Nachweis eisenmarkierter fhNPZ *in vitro* via MRT-Aufnahmen ist möglich.**

Die optimale Eisenkonzentration zur Markierung fhNPZ liegt bei 3,0 mM. Hierbei sind die Stammzellen in MRT-Aufnahmen bereits ab 50.000 Zellen erkennbar; ein guter Bildkontrast kann mit 200.000 eisenmarkierten fhNPZ erreicht werden.

### **2. Die Langzeitgabe von dem Immunsuppressivum CsA besitzt keinen Einfluss auf das Überleben der transplantierten fhNPZ im immunprivilegierten Gehirn.**

In dem vorliegenden Versuch konnte mit den beiden angewendeten Immunsuppressionsprotokollen kein Transplantatüberleben erreicht werden. Demzufolge muss in weiteren Versuchen eine Optimierung der Immunsuppression zur Sicherung des Transplantatüberlebens eruiert werden. Als Alternative könnte man hierbei auf beim Schaf bereits erfolgreich angewendete Protokolle anderer Transplantationsarten zugreifen, wie beispielsweise nach Hauttransplantation (2 - 3 mg CsA/kg 2x tägl. in Kombination mit 10 mg Ketoconazol/kg 2x tägl., angewendet von ROSE et al. (2001)) oder nach Uterusallotransplantation (8 mg CsA/kg/d p.o. in Kombination mit 5 mg Prednisolon/kg/d i.m. an den postoperativen Tagen -2 bis 14, angewendet von RAMIREZ et al. (2011)).

Stammzellen sezernieren eine Vielzahl von teilweise noch unbekanntem Wachstumsfaktoren. Bereits durch die kurzzeitige Anwesenheit von Stammzellen können demzufolge Substanzen sezerniert und regenerative Prozesse eingeleitet werden (DUNNETT 2013). Hier sollte in einem Schlaganfallmodell die sekretorischen Eigenschaften der fhNPZ nach Transplantation, sowie deren Einflüsse auf das

klinische Erscheinungsbild nach Schlaganfall untersucht werden.

### **3. Die Langzeitgabe von CsA mit verschiedenen Applikationsregimen über 64 Tage verursacht pathologische Veränderungen und klinische Symptome beim Schaf.**

Es konnten beim Schaf geringgradige hepato- und nephrotoxische Eigenschaften durch die Langzeitapplikation von CsA festgestellt werden. Jedoch ist der Einsatz von CsA beim Schaf in der angewendeten Dosierung über einen längeren Zeitraum als gut verträglich einzustufen.

## **5.5 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zu Stammzelltransplantationen in das gesunde Schafhirn. Sie sollen als Grundlage für eine weitere Studie an dem ovinen Schlaganfallmodell dienen.

In dieser Studie soll die Wirksamkeit der fhNPZ in Bezug auf die Einleitung regenerativer Prozesse im Schafhirn, sowie die Verbesserung des klinischen Erscheinungsbildes nach Schlaganfall untersucht und für den Einsatz in der Humanmedizin geprüft werden. Dies ist vor allem aus dem Grund wichtig, da bereits gezeigt werden konnte, dass sich Stammzellen nach Transplantation in gesunde Rattenhirne zu Transplantationen in Rattenhirne nach Schlaganfall divergent verhielten (KELLY et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die fortschreitende Etablierung der CsA-Gabe beim Schaf zur Immunsuppression. Großtiermodelle werden in den folgenden Jahren aufgrund der notwendigen Zwischenschritte bei der Translation von Kleintiermodellen auf den Menschen deutlicher in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen rücken. Für zukünftige Transplantationsmodelle am Schaf werden Informationen zu immunsuppressiven Protokollen, sowie deren Nebenwirkungen ein wichtiger Bestandteil guter wissenschaftlicher Praxis sein.

Einen besonderen Aspekt bei der Durchführung von Tierversuchen bildet das Wohlbefinden der Tiere, welches auch seitens der Gesetzgebung fest in den Paragraphen §2 und §8 des Tierschutzgesetzes verankert wurde (ANON. 1972). Da die Schafe für den in dieser Dissertation durchgeführten Tierversuch täglich Zugang zu einer Weide erhielten, stellt die Datenerhebung einen neuen Standard in Tierversuchen mit einer natürlichen Tierhaltung dar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

**Rita Diehl**

### **Verträglichkeit und Effektivität Cyclosporin A-vermittelter Immunsuppression beim Schaf für die xenogene, intrazerebrale Transplantation**

Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2016

(100 Seiten, 46 Abbildungen, 59 Tabellen, 160 Literaturangaben, 32 Seiten Anhang)

*Schlüsselwörter: Stammzelltransplantation, Großtiermodell, Schaf, Immunsuppression, Cyclosporin A*

#### **Einleitung**

Der Einsatz von Stammzellen als Grundlage neuer therapeutischer Strategien wird bereits seit über 25 Jahren intensiv erforscht. Stammzellen sind in der Lage, in verschiedene funktionale Zelltypen auszudifferenzieren und verfügen über ein enormes Proliferationspotential (NAM et al. 2015). Ausgehend von den Fähigkeiten von Stammzellen sehen Forscher und Kliniker erstmals eine realistische Möglichkeit, kurative Therapieoptionen für Erkrankungen zu entwickeln, die bisher als schwer behandelbar oder sogar unheilbar angesehen wurden. Davon könnten insbesondere Patienten chronisch-degenerativer neurologischer und zerebrovaskulärer Erkrankungen, einschließlich der großen Anzahl an Schlaganfallopfern, profitieren. Schlaganfälle repräsentieren eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (LOPEZ et al. 2006). Ein Drittel der betroffenen Patienten verstirbt innerhalb eines Jahres, während etwa 40% von dauerhaften Behinderungen betroffen sind (MOZAFFARIAN et al. 2015). Trotz intensiver Forschung existieren neben der systemischen Thrombolyse, die auf einen engen Zeitraum von maximal 4,5 Stunden nach dem Akutereignis beschränkt ist, keine zugelassenen Therapieoptionen (HACKE et al. 2008, SAVER et al. 2009). Zelltherapeutische Strategien zur Behandlung des Schlaganfalls werden daher als besonders vielversprechend angesehen (ANDRES et al. 2011). Neben den bereits gesicherten Erkenntnissen zur stammzelltherapeutischen Sicherheit und Wirksamkeit aus Studien unter Einsatz gängiger Nagermodellen (BLISS et al. 2006, JOO et al. 2013) wird insbesondere die Überprüfung der Wirksamkeit an geeigneten Großtiermodellen gefordert, die die Situation des menschlichen Schlaganfallpatienten möglichst realistisch wiedergeben sollen (SAVITZ et al. 2011).

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Testung eines zelltherapeutischen Ansatzes in einem Großtiermodell mit fokaler zerebraler Ischämie besteht darin, ein langfristiges Überleben xenogener Zelltransplantate durch ein geeignetes Immunsuppressionsprotokoll zu erreichen. Die Notwendigkeit einer Immunsuppression besteht darin, dass sowohl allo- als auch xenogene Transplantate eine Immunantwort beim Empfänger auslösen und somit zu einer Abstoßungsreaktion führen können (JANEWAY 2002). Die Anwendung von immunsuppressiven Medikamenten geht dabei aber häufig mit Nebenwirkungen einher. Insbesondere beim Schaf existiert jedoch nur eine limitierte Datenlage zu immunsuppressiven Protokollen und deren Nebenwirkungen.

### **Ziele der Untersuchung**

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, eine xenogene Transplantation von fetalen humanen neuronalen Progenitorzellen (fhNPZ) in einem gesunden Schafmodell durchzuführen, um die Wirksamkeit in Hinblick auf das Transplantatüberleben und die Nebenwirkungen einer Immunsuppression mittels Cyclosporin A (CsA) zu untersuchen.

### **Materialien und Methoden**

Hierfür wurden je 5 Schafe in zwei Gruppen über einen Zeitraum von 64 Tagen immunsupprimiert (iCsA: 3 mg CsA/kg 2x tägl. bis einschließlich Tag 36, danach 3 mg CsA/kg 1x tägl. jeden 3. Tag; kCsA: kontinuierlich 3 mg CsA/kg 2x tägl.), während eine Kontrollgruppe (Kon) von ebenfalls 5 Tieren keine Immunsuppression erhielt. Am Versuchstag 22 wurde den Schafen eisenmarkierte fhNPZ (Eisenkonzentration: 3,0 mM, ca. 200.000 Zellen pro Transplantationsposition) stereotaktisch in das gesunde Gehirn transplantiert. Aufgrund der Eisenmarkierung der Stammzellen konnten diese an den Versuchstagen 23, 36 und 64 mittels 3,0 MRT-Aufnahmen *in vivo* überwacht und anschließend *ex vivo* das Überleben der fhNPZ im Schafhirn 42 Tage nach Transplantation histologisch untersucht werden. Für die Untersuchungen zu Wirkspiegeln und Nebenwirkungen von CsA im Schaf wurden den Versuchstieren innerhalb des Versuchszeitraums regelmäßig Blutproben entnommen und am Versuchsende eine pathologische und histologische Untersuchung von Leber und Nieren durchgeführt.

### **Ergebnisse**

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die CsA-Wirkspiegel im Blut bei der kCsA ( $424,0 \pm 135,0$  ng/ml) signifikant höher waren im Vergleich zur iCsA ( $198,5 \pm 155,9$  ng/ml). Diese Unterschiede besaßen jedoch keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben der transplantierten fhNPZ. In keiner der drei Versuchsgruppen konnten vitale Zellen 42 Tage nach der Transplantation aufgefunden werden. Die Untersuchung der Nebenwirkungen von CsA ergab, dass die Langzeitgabe von CsA Anzeichen für einen hämatologischen Einfluss zeigt. Ebenso konnte sowohl eine hepatotoxische, als auch eine nephrotoxische Wirkung von CsA beim Schaf nachgewiesen werden.

### **Schlussfolgerungen**

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass die Gabe von 3 mg CsA/kg 2x tägl. nicht suffizient einer Abstoßungsreaktion xenogener ins Schafhirn transplantiertter fhNPZ entgegenwirkt. Für das Ziel einer suffizienten zelltherapeutischen Anwendung im Schaf nach einem Schlaganfall sind somit weitere Untersuchungen zu einer wirksamen Immunsuppression beim Schaf und zu einem verbesserten Transplantatüberleben notwendig. Desweiteren konnten klinische und pathologische Nebenwirkungen beim Schaf durch die Langzeitgabe des Immunsuppressivums CsA festgestellt werden.

## 7 SUMMARY

**Rita Diehl**

### **Tolerance and effectiveness of Cyclosporine A mediated immunosuppression in sheep during xenogenic, intracerebral transplantation**

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in January 2016

(100 pages, 46 figures, 59 tables, 160 references, 32 pages appendices)

*Keywords: stem cell transplantation, large animal model, sheep, immunosuppression, cyclosporine A*

#### **Introduction**

The use of stem cells in novel therapeutic approaches has been intensely explored in the last 25 years. Stem cells are able to differentiate in various cell types and possess an enormous proliferation potential (NAM et al. 2015). Based on this capability, researchers and clinicians see the possibility of novel cell based therapeutic approaches for the treatment of difficult or incurable diseases. Many patients may benefit from these therapies, in particular patients with chronic degenerative neurological or cerebrovascular diseases, including a huge number of stroke patients. Stroke represents one of the leading causes of death in the Western world (LOPEZ et al. 2006). One third of the stroke patients die within one year while about 40% have to live with permanent disabilities (MOZAFFARIAN et al. 2015). Despite intensive experimental research, there are no further therapeutic options except a maximum 4.5 hour time window for systemic thrombolysis (HACKE et al. 2008, SAVER et al. 2009). Experimental research into cellular therapies after stroke may be promising option (ANDRES et al. 2011), with several rodents studies demonstrating the efficacy and safety of stem cell transplantation after stroke (BLISS et al. 2006, JOO et al. 2013). To aid the translation of potential stroke therapies from small animal models to the clinic, the STAIR (stroke therapy academic industry roundtable) criteria (FISHER et al. 2009) encourages the use of large animal models, which are thought to exhibit more physiological similarities to human patients than rodent models (SAVITZ et al. 2011). It is thought that the long-term survival of the transplanted stem cells is a critical requirement to the success of stem cell therapy in large animal stroke models (JANEWAY 2002). For any allogenic or xenogenic transplantation protocol, a suitable immunosuppression regime must be followed to prevent the recipient from graft rejection. The utilization of immunosuppressive agents often comes along with various side effects. In particular for the application of immunosuppressants in sheep the available data is limited.

#### **Objectives of the investigations**

The aim of the present study was to investigate the effectiveness and side effects of the immunosuppressant Cyclosporine A (CsA) with the xenogenic transplantation of fetal human neural progenitor cells (fhNPZ) into the healthy sheep brain.

**Materials and Methods**

Two groups of five sheep received an immunosuppression (iCsA: 3 mg CsA/kg twice a day until day 36, afterwards 3 mg CsA/kg once a day every three days; kCsA: continuous 3 mg CsA/kg twice a day) for 64 days, while a control group (Kon) of 5 sheep did not receive any immunosuppression. On day 22, all sheep were stereotaxically transplanted with iron labeled fhNPZ (iron concentration: 3.0 mM; approx. 200,000 cells per transplantation position) into the healthy brain. The iron labeled stem cells in the ovine brain were monitored via 3.0 T MRI on days 23, 36 and 64 *in vivo*. A histological examination of graft survival was performed 42 days after stem cell transplantation. For the investigation of CsA blood levels and side effects of immunosuppression, blood samples were collected throughout the 64 days of the study. After 64 days the sheep were euthanized and a pathological and histological examination of liver and kidney were conducted.

**Results**

The evaluation of the CsA blood levels indicates that the blood levels of the kCsA ( $424.0 \pm 135.0$  ng/ml) were significant elevated compared to the iCsA ( $198.5 \pm 155.9$  ng/ml). However, these differences did not influence the survival of the transplanted fhNPZ. At 42 days after transplantation, no viable stem cells were found within the brains of sheep in any of the three experimental groups. The examination of CsA side effects in the sheep suggested that the long-term application of CsA might result in hematological abnormalities. Further, hepatotoxic and nephrotoxic effects were found.

**Conclusion**

In conclusion, the application of 3 mg CsA/kg twice a day does not prevent a xenogenic graft reject in the ovine brain. To achieve the aim of sufficient cell therapeutic application after stroke in the ovine animal model, further investigations with respect to improved graft survival must be performed. In addition, investigators should be aware of the clinical and pathological adverse effects of CsA after long-term application in sheep.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham** RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3109–14.
- Adu** D, Turney J, Michael J, McMaster P. Hyperkalaemia in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Lancet.* 1983;2:370–2.
- Ahn** KO, Lim SW, Li C, Yang HJ, Ghee JY, Kim JY et al. Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation.* 2007;83:938–47.
- Allison** AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev.* 1993;136:5–28.
- Alomar** A, Berth-Jones J, Bos JD, Giannetti A, Reitamo S, Ruzicka T et al. The role of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2004;151 Suppl 70 Dec 2004:3–27.
- Alrefai** WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 2007;24:1803–23.
- Andres** RH, Horie N, Slikker W, Keren-Gill H, Zhan K, Sun G et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011;134:1777–89.
- Anjum** T, Azam A, Irum W. Production of Cyclosporine A by Submerged Fermentation from a Local Isolate of *Penicillium fellutanum*. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74:372–4.
- Anon.** Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 24.07.1972. Neugefasst am 18.05.2006, zuletzt geändert am 28.07.2014.
- Anon.** STEM101™ Mouse Monoclonal Antibody Specific for Human Cell Nucleus Marker; 2014 (zitiert vom 04.11.2015): <<http://www.stemcellsinc.com>>.
- Anon.** NIH Human Embryonic Stem Cell Registry Research Using These Lines is Eligible for NIH Funding; 2016 (zitiert vom 04.01.2016): <[http://grants.nih.gov/stem\\_cells/registry/current.htm](http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm)>.
- Archer** TM, Boothe DM, Langston VC, Fellman CL, Lunsford KV, Mackin AJ. Oral cyclosporine treatment in dogs: a review of the literature. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1–20.
- Bacigalupo** A, Di Giorgio F, Frassoni F, Van Lint MT, Raffo MR, Gogioso L et al. Cyclosporin A serum and blood levels in marrow graft recipients: correlation with administered dose, serum creatinine and graft-versus-host disease. *Acta Haematol.* 1984;72:155–62.
- Bacigalupo** A, Van Lint MT, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, Sogno G et al. Increased risk of leukemia relapse with high-dose cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia. *Blood.* 1991;77:1423–8.
- Bauer** N, Kraft W, Moritz A. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014.
- Baumgärtner** W, Gröne A. *Pathohistologie für die Tiermedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2012.
- Baumgärtner** W, Gruber AD. *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2015.
- Baxter** JD, Tomkins GM. Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:932–7.
- Bechmann** I. *Mechanismen des Immunprivilegs im Zentralen Nervensystem nach axonaler Läsion* [Habilschr. med.]. Berlin: Humboldt-Univ. Berlin; 2001.
- Begley** DJ, Squires LK, Zloković BV, Mitrović DM, Hughes CC, Revest PA et al. Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A. *J. Neurochem.* 1990;55:1222–30.

- Bertino JR.** Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J Clin Oncol.* 1993;11:5–14.
- Bliss TM, Kelly S, Shah AK, Foo WC, Kohli P, Stokes C et al.** Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res.* 2006;83:1004–14.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López-Zetina P et al.** Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol.* 1998;274:F791-8.
- Boltze J, Arnold A, Walczak P, Jolkkonen J, Cui L, Wagner D.** The Dark Side of the Force - Constraints and Complications of Cell Therapies for Stroke. *Front Neurol.* 2015;6:155.
- Boltze J, Förschler A, Nitzsche B, Waldmin D, Hoffmann A, Boltze CM et al.** Permanent middle cerebral artery occlusion in sheep: a novel large animal model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1951–64.
- Boltze J, Nitzsche B, Geiger KD, Schoon H.** Histopathological Investigation of Different MCAO Modalities and Impact of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Administration in an Ovine Stroke Model. *Transl Stroke Res.* 2011;2:279–93.
- Borlongan CV, Chopp M, Steinberg GK, Bliss TM, Li Y, Lu M et al.** Potential of stem/progenitor cells in treating stroke: the missing steps in translating cell therapy from laboratory to clinic. *Regen Med.* 2008;3:249–50.
- Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC et al.** Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet.* 1978;2:1323–7.
- Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S.** Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol.* 2014;5:19.
- Charles BG, Filippich LJ, Pass MA.** Pharmacokinetics and absolute bioavailability of cyclosporin following intravenous and abomasal administration to sheep. *J Pharm Pharmacol.* 1993;45:821–4.
- Chau MJ, Deveau TC, Song M, Gu X, Chen D, Wei L.** iPSC Transplantation increases regeneration and functional recovery after ischemic stroke in neonatal rats. *Stem Cells.* 2014;32:3075–87.
- Connors TA, Cox PJ, Farmer PB, Foster AB, Jarman M.** Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem Pharmacol.* 1974;23:115–29.
- Cravedi P, Codreanu I, Satta A, Turturro M, Sghirlanzoni M, Remuzzi G et al.** Cyclosporine prolongs delayed graft function in kidney transplantation: are rabbit anti-human thymocyte globulins the answer? *Nephron Clin Pract.* 2005;101:c65-71.
- Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J.** Autophagy and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:417590.
- Delaney MP, Smythe E, Higgins RM, Morris AG.** Constitutive and acquired resistance to calcineurin inhibitors in renal transplantation: role of P-glycoprotein-170. *Transpl Int.* 2000;13:276–84.
- DeNeve W, Valeriote F, Edelstein M, Everett C, Bischoff M.** In vivo DNA cross-linking by cyclophosphamide: comparison of human chronic lymphatic leukemia cells with mouse L1210 leukemia and normal bone marrow cells. *Cancer Res.* 1989;49:3452–6.
- Diehl R, Ferrara F, Müller C, Dreyer AY, McLeod DD, Fricke S et al.** Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell Mol Immunol.* 2016;13:1–34.
- Dodd SJ, Williams M, Suhan JP, Williams DS, Koretsky AP, Ho C.** Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J.* 1999;76:103–9.
- Dreyer A.** Magnetresonanztomographische Detektion von autologen ovinen mesenchymalen Stammzellen und Verfolgung von Migrationsbewegungen nach Schlaganfall im Schaf [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2012.

- Dreyer A**, Stroh A, Pösel C, Findeisen M, von Geymüller T, Lobsien D et al. Frameless stereotaxy in sheep – neurosurgical and imaging techniques for translational stroke research. In: Balestrino M, Hrsg. *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. 1. Aufl. Rijeka: InTech; 2012. p. 21–46.
- Duncan N**, Arrazi J, Nagra S, Cook M, Thomson AH, Craddock C. Prediction of intravenous cyclosporine area under the concentration-time curve after allogeneic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2010;32:353–8.
- Duncan N**, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:169–74.
- Dunnett SB**. Striatal reconstruction by striatal grafts. *J Neural Transm Suppl*. 1999;55:115–29.
- Dunnett SB**. Neural tissue transplantation, repair, and rehabilitation. *Handb Clin Neurol*. 2013;110:43–59.
- Engelhardt W**, Ahrens F. *Physiologie der Haustiere*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2005.
- Erdö F**, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:780–5.
- Fahimi HD**. An assessment of the DAB methods for cytochemical detection of catalase and peroxidase. *J Histochem Cytochem*. 1979;27:1365–6.
- Ferrer I**, Fabregues I, Condom E. A Golgi study of the sixth layer of the cerebral cortex. I. The lissencephalic brain of Rodentia, Lagomorpha, Insectivora and Chiroptera. *J Anat*. 1986a;145:217–34.
- Ferrer I**, Fabregues I, Condom E. A Golgi study of the sixth layer of the cerebral cortex. II. The gyrencephalic brain of Carnivora, Artiodactyla and Primates. *J Anat*. 1986b;146:87–104.
- Fisher M**, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*. 2009;40:2244–50.
- Focke A**, Schwarz S, Foerschler A, Scheibe J, Milosevic J, Zimmer C et al. Labeling of human neural precursor cells using ferromagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2008;60:1321–8.
- Franklin TJ**, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J*. 1969;113:515–24.
- Freeman DJ**, Laupacis A, Keown PA, Stiller CR, Carruthers SG. Evaluation of cyclosporin-phenytoin interaction with observations on cyclosporin metabolites. *Br J Clin Pharmacol*. 1984;18:887–93.
- Friedman A**, Galazka-Friedman J. The current state of free radicals in Parkinson's disease. Nigral iron as a trigger of oxidative stress. *Adv Neurol*. 2001;86:137–42.
- Gilad AA**, Walczak P, McMahon MT, Na HB, Lee JH, An K et al. MR tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2008;60:1–7.
- Gotti B**, Benavides J, MacKenzie ET, Scatton B. The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res*. 1990;522:290–307.
- Gralla J**, Schroth G, Remonda L, Fleischmann A, Fandino J, Slotboom J et al. A dedicated animal model for mechanical thrombectomy in acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27:1357–61.
- Greenberg ML**, Uretsky BF, Reddy PS, Bernstein RL, Griffith BP, Hardesty RL et al. Long-term hemodynamic follow-up of cardiac transplant patients treated with cyclosporine and prednisone. *Circulation*. 1985;71:487–94.
- Guzman R**, Uchida N, Bliss TM, He D, Christopherson KK, Stellwagen D et al. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:10211–6.
- Hacke W**, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317–29.

- Halloran** PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation*. 1999;68:1356–61.
- Hauser** RA, Furtado S, Cimino CR, Delgado H, Eichler S, Schwartz S et al. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology*. 2002;58:687–95.
- Heymer** A, Haddad D, Weber M, Gbureck U, Jakob PM, Eulert J et al. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials*. 2008;29:1473–83.
- Hill** NC, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP. Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1955;30:625–33.
- Hoehn** M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16267–72.
- Hong** JY, Pan JM, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Yang CS. The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142:1077–83.
- Howells** DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1412–31.
- Hu** Y, Qiu W, Liu Z, Zhu L, Liu Z, Tu J et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:1093–8.
- Hunt** GB, Winson O, Fuller MC, Kim JY. Pilot study of the suitability of dorsal vulval skin as a transposition flap: vascular anatomic study and clinical application. *Vet Surg*. 2013;42:523–8.
- Hunt** J, Cheng A, Hoyles A, Jervis E, Morshead CM. Cyclosporin A has direct effects on adult neural precursor cells. *J Neurosci*. 2010;30:2888–96.
- Imai** H, Konno K, Nakamura M, Shimizu T, Kubota C, Seki K et al. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg*. 2006;104:123–32.
- Janeway** CA. *Immunologie*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2002.
- Joo** KM, Kang BG, Yeon JY, Cho YJ, An JY, Song HS et al. Experimental and clinical factors influencing long-term stable in vitro expansion of multipotent neural cells from human adult temporal lobes. *Exp Neurol*. 2013;240:168–77.
- Joss** DV, Barrett AJ, Kendra JR, Lucas CF, Desai S. Hypertension and convulsions in children receiving cyclosporin A. *Lancet*. 1982;1:906.
- Juengst** E, Fossel M. The ethics of embryonic stem cells--now and forever, cells without end. *JAMA*. 2000;284:3180–4.
- Kahan** BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989;321:1725–38.
- Kahan** BD. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine: 20 years of progress. *Transplant Proc*. 2004;36:378S-391S.
- Kamii** H, Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Epstein CJ, Chan PH. Prolonged expression of hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:478–86.
- Kang** B, Lee J, Jung D, Park C, Gu S, Jeon H et al. Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical and histopathological findings. *J Vet Sci*. 2007;8:369–76.
- Kawaguchi** A, Sugimoto K, Fujimura A. Preventive effect of platelet-activating factor antagonist, Y-24180, against cyclosporine-induced acute nephrotoxicity. *Life Sci*. 2001;68:1181–90.
- Kelly** S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 2004;101:11839–44.
- Kiani** A, Rao A, Aramburu J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*. 2000;12:359–72.
- Kienhuis** AS, Vitins AP, Pennings JLA, Pronk TE, Speksnijder EN, Roodbergen M et al. Cyclosporine A treated in vitro models induce cholestasis response through comparison of phenotype-directed gene expression analysis of in vivo Cyclosporine A-induced cholestasis. *Toxicol Lett*. 2013;221:225–36.
- Kierdorf** K, Katzmarski N, Haas CA, Prinz M. Bone marrow cell recruitment to the brain in the absence of irradiation or parabiosis bias. *PLoS ONE*. 2013;8:e58544.
- Kito** G, Nishimura A, Susumu T, Nagata R, Kuge Y, Yokota C et al. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey. *J Neurosci Methods*. 2001;105:45–53.
- Köchli** VD, Marinček B, Weishaupt D. Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. 6. Aufl. Heidelberg: Springer; 2009.
- Kudo** M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke*. 1982;13:505–8.
- Latif** T, Morris JC. Monoclonal Antibody Therapy of T-Cell Leukemia and Lymphoma. In: Tomita M, Hrsg. T-Cell leukemia: Characteristics, treatment and prevention. Rijeka: InTech; 2013.
- Lee** S, Kim H, Song I, Youm J, Dizon LA, Jeong S et al. Glucocorticoids and their receptors: insights into specific roles in mitochondria. *Prog Biophys Mol Biol*. 2013;112:44–54.
- Lindner** MD, Winn SR, Baetge EE, Hammang JP, Gentile FT, Doherty E et al. Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp Neurol*. 1995;132:62–76.
- Longa** EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84–91.
- Lopez** AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367:1747–57.
- MacDonald** AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation*. 2001;71:271–80.
- Machala** M, Soucek P, Neca J, Ulrich R, Lamka J, Szotáková B et al. Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Arch Toxicol*. 2003;77:555–60.
- Mamelak** AN, Eggerding FA, Oh DS, Wilson E, Davis RL, Spitzer R et al. Fatal cyst formation after fetal mesencephalic allograft transplant for Parkinson's disease. *J Neurosurg*. 1998;89:592–8.
- Mariano** ED, Teixeira MJ, Marie SKN, Lepski G. Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells*. 2015;7:477–82.
- McEwen** MM, Gleed RD, Ludders JW, Stokol T, Del Piero F, Erb HN. Hepatic effects of halothane and isoflurane anesthesia in goats. *J Am Vet Med Assoc*. 2000;217:1697–700.
- Millington** TM, Madsen JC. Innate immunity in heart transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:571–6.
- Mimeault** M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 2006;24:2319–45.
- Modo** M, Cash D, Mellodew K, Williams SCR, Fraser SE, Meade TJ et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 2002;17:803–11.
- Morancho** A, García-Bonilla L, Barceló V, Giralt D, Campos-Martorell M, Garcia S et al. A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012;38:617–27.

- Mozaffarian D**, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131:e29-322.
- Mozdziak PE**, Petite JN, Carson SD. An introductory undergraduate course covering animal cell culture techniques. *Biochem Mol Biol Educ*. 2004;32:319-22.
- Murray BM**, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int*. 1985;28:767-74.
- Myers BD**, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E et al. The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int*. 1988;33:590-600.
- Nam H**, Lee K, Nam D, Joo KM. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. *World J Stem Cells*. 2015;7:126-36.
- Niemoeller OM**, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T et al. Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006;374:41-9.
- Pan H**, Gazarian A, Buff S, Solla F, Gagnieu M, Leveneur O et al. Oral cyclosporine A in neonatal swines for transplantation studies. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014;100:1-7.
- Parker GC**. Stem cell therapy for stroke. *J Pediatr Neurol*. 2010;8:333-41.
- Payne JA**, Herrod HG, Buice R. The effect of cyclosporine on canine lymphocyte activity. *J Clin Lab Immunol*. 1986;20:177-81.
- Pichard L**, Fabre I, Fabre G, Domergue J, Saint Aubert B, Mourad G et al. Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 1990a;18:595-606.
- Pichard L**, Gillet G, Fabre I, Dalet-Beluche I, Bonfils C, Thenot JP et al. Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metab Dispos*. 1990b;18:711-9.
- Plate AY**, Crankshaw DL, Gallaher DD. The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. *Anesth Analg*. 2005;101:1063-4, table of contents.
- Ptachcinski RJ**, Burckart GJ, Venkataramanan R. Cyclosporine concentration determinations for monitoring and pharmacokinetic studies. *J Clin Pharmacol*. 1986;26:358-66.
- Ramirez ER**, Ramirez Nasseti DK, Nasseti MBR, Khatamee M, Wolfson MR, Shaffer TH et al. Pregnancy and outcome of uterine allotransplantation and assisted reproduction in sheep. *J Minim Invasive Gynecol*. 2011;18:238-45.
- Reichenbach JR**, Haacke EM. High-resolution BOLD venographic imaging: a window into brain function. *NMR Biomed*. 2001;14:453-67.
- Rhyan JC**, Dubey JP. Ovine abortion and neonatal death due to toxoplasmosis in Montana. *J Am Vet Med Assoc*. 1984;184:661-4.
- Ridgway JP**. Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010;12:71.
- Rimm DL**. What brown cannot do for you. *Nat Biotechnol*. 2006;24:914-6.
- Robinson RG**, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk T, Bloom FE. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature*. 1975;255:332-4.
- Rose AH**, Ilett KF, O'Donoghue HL, Hackett LP, Penhale WJ, Manning LS et al. Cyclosporin immunosuppression of sheep: pharmacokinetics and allograft survival. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;81:23-36.
- Rosengard BR**, Ojikutu CA, Guzzetta PC, Smith CV, Sundt TM, Nakajima K et al. Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation*. 1992;54:490-7.

- Saver** JL, Albers GW, Dunn B, Johnston KC, Fisher M. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for extended window acute stroke therapy trials. *Stroke*. 2009;40:2594–600.
- Savitz** SI, Chopp M, Deans R, Carmichael T, Phinney D, Wechsler L. Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke*. 2011;42:825–9.
- Savitz** SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson GV, Stieg P, Caplan LR. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20:101–7.
- Schaar** KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2:13.
- Schmitz** SA, Albrecht T, Jensen K, Wolf KJ. SPIO-unterstützte MR-Angiographie des portalvenösen Systems. *Rofo*. 2000;172:51–4.
- Schreiber** SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992;13:136–42.
- Schusser**, GF. Referenzbereiche - Schaf; 2015 (zitiert vom 29.10.2015): <<http://www.vetmed.uni-leipzig.de/ik/wmedizin/labor/diagnostik/referenzwerte/schaf.htm>>.
- Scott** LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2003;63:1247–97.
- Shapiro** AP, Rutan GH, Thompson ME, Nigalye RL. Hypertension following orthotopic cardiac transplantation. *Cardiovasc Clin*. 1990;20:179–88.
- Sharkey** J, Ritchie IM, Kelly PA. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13:865–71.
- Sharma** V, McNeill JH. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br J Pharmacol*. 2009;157:907–21.
- Shen** LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke*. 2007;38:2150–6.
- Sigal** R, Vogl T, Casselman J, Moulin G, Veillon F, Hermans R et al. Lymph node metastases from head and neck squamous cell carcinoma: MR imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (Sinerem MR) -- results of a phase-III multicenter clinical trial. *Eur Radiol*. 2002;12:1104–13.
- Singh** VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:2.
- Soenen** SJH, Himmelreich U, Nuytten N, de Cuyper M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*. 2011;32:195–205.
- Soenen** SJH, Illyes E, Vercauteren D, Braeckmans K, Majer Z, de Smedt SC et al. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials*. 2009;30:6803–13.
- Stanek** B, Kovarik J, Buschbeck W, Silberbauer K, Pinggera W. Renin-angiotensin-aldosterone system in cyclosporin A-treated renal allograft recipients. *Nephron*. 1985;41:124.
- Steffan** J, Favrot C, Mueller R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol*. 2006;17:3–16.
- Steinbeck** JA, Studer L. Moving Stem Cells to the Clinic: Potential and Limitations for Brain Repair. *Neuron*. 2015;86:187–206.
- Stroh** A. Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomographie [Dissertation rer. nat.]. Berlin: Humboldt-Univ. Berlin; 2006.
- Stroh** A, Boltze J, Sieland K, Hild K, Gutzeit C, Jung T et al. Impact of magnetic labeling on human and mouse stem cells and their long-term magnetic resonance tracking in a rat model of

- Parkinson disease. *Mol Imaging*. 2009;8:166–78.
- Stroh A**, Zimmer C, Gutzeit C, Jakstadt M, Marschinke F, Jung T et al. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:976–84.
- Stroh A**, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G et al. Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 2006a;33:886–97.
- Takano K**, Carano RA, Tatlisumak T, Meiler M, Sotak CH, Kleinert HD et al. Efficacy of intra-arterial and intravenous prourokinase in an embolic stroke model evaluated by diffusion-perfusion magnetic resonance imaging. *Neurology*. 1998;50:870–5.
- Takaori K**, Nio Y, Inoue K, Tun T, Fukumoto M, Hashida T et al. A comparative study on immunosuppressive effects of cyclosporin A and FK 506 on peripheral blood lymphocytes in dogs. *Biotherapy*. 1992;4:129–37.
- Tamaki SJ**, Jacobs Y, Dohse M, Capela A, Cooper JD, Reitsma M et al. Neuroprotection of host cells by human central nervous system stem cells in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cell stem cell*. 2009;5:310–9.
- Tamura A**, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1:53–60.
- Tatarishvili J**, Oki K, Monni E, Koch P, Memanishvili T, Buga A et al. Human induced pluripotent stem cells improve recovery in stroke-injured aged rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2014;32:547–58.
- Thomson JA**. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–7.
- Topal A**, Gül N, İlçöl Y, Görgül OS. Hepatic effects of halothane, isoflurane or sevoflurane anaesthesia in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2003;50:530–3.
- Trauner M**, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2003;83:633–71.
- Tsuji A**, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1993;46:1096–9.
- Ustüner ET**, Zdichavsky M, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, Ray M et al. Long-term composite tissue allograft survival in a porcine model with cyclosporine/mycophenolate mofetil therapy. *Transplantation*. 1998;66:1581–7.
- van Kooten C**, Stax AS, Woltman AM, Gelderman KA. Handbook of experimental pharmacology "dendritic cells": the use of dexamethasone in the induction of tolerogenic DCs. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;2009:233–49.
- van Summeren A**, Renes J, Lizarraga D, Bouwman FG, Noben J, van Delft JHM et al. Screening for drug-induced hepatotoxicity in primary mouse hepatocytes using acetaminophen, amiodarone, and cyclosporin a as model compounds: an omics-guided approach. *OMICS*. 2013;17:71–83.
- Wei L**, Xue T, Yang H, Zhao G, Zhang G, Lu Z et al. Modified uterine allotransplantation and immunosuppression procedure in the sheep model. *PLoS ONE*. 2013;8:e81300.
- Wennberg L**, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z et al. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation*. 2001;71:1797–806.
- Whitworth JA**, Mills EH, Coghlan JP, McDougall JG, Nelson MA, Spence CD et al. The haemodynamic effects of cyclosporin A in sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1987;14:573–80.
- Zhang Z**, Chopp M, Zhang RL, Goussev A. A mouse model of embolic focal cerebral ischemia. *J*

Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:1081–8.

## 9 ANHANG

### 9.1 Ergänzende Tabelle zur Herstellung der Gelphantome

Tabelle 38: Herstellungsprotokoll der Schichtgelphantome

Verfahren		Gelphantom 1 (50 ml Gefäß)	Gelphantom 2 (50 ml Gefäß)
1.	<b>Befüllen:</b>	20 ml AG (80°C)	20 ml AG (80°C)
	Gefäße im Ultraschallbad für 15 min bei 73°C Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 20 min, -20 °C für 20 min, RT für 20 min		
2.	Herstellung Agarosegel-Transplantationsmedium-Gemisch (ATG) im Verhältnis 1:1 in einem geeigneten Reaktionsgefäß, ATG im Ultraschallbad für 15 min bei 65°C		
	<b>ATG aufbringen:</b>	100 µl (71°C), <b>keine fhNPZ</b>	100 µl (71°C), <b>keine fhNPZ</b>
Zentrifugation: 500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 10 min, -20 °C für 10 min, RT für 20 min			
3.	<b>Befüllen mit AG:</b>	5 ml AG (75°C)	5 ml AG (75°C)
	Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 20 min, -20 °C für 20 min, RT für 20 min		
4.	Herstellung ATG mit entsprechenden Konzentrationen der fhNPZ (ATGZ) im Verhältnis 1:1 in einem geeigneten Reaktionsgefäß, ATGZ im Ultraschallbad für 15 min bei 72°C		
	<b>ATGZ aufbringen:</b>	100 µl (76°C), <b>keine fhNPZ</b>	100 µl (76°C), ATGZ mit <b>100.000 unmarkierten fhNPZ</b>
Zentrifugation: 500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 10 min, -20 °C für 10 min, RT für 20 min			
5.	<b>Befüllen mit AG:</b>	5 ml AG (70°C)	5 ml AG (70°C)
	Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 20 min, -20 °C für 20 min, RT für 20 min		
6.	Herstellung ATG mit entsprechenden Konzentrationen der fhNPZ (ATGZ) im Verhältnis 1:1 in einem geeigneten Reaktionsgefäß, ATGZ im Ultraschallbad für 15 min bei 68°C		
	<b>ATGZ aufbringen:</b>	100 µl (70°C), ATGZ mit <b>1.000 markierten fhNPZ</b>	100 µl (70°C), ATGZ mit <b>10.000 markierten fhNPZ</b>
Zentrifugation: 500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 10 min, -20 °C für 10 min, RT für 20 min			
7.	<b>Befüllen mit AG:</b>	5 ml AG (70°C)	5 ml AG (70°C)
	Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 20 min, -20 °C für 20 min, RT für 20 min		
8.	Herstellung ATG mit entsprechenden Konzentrationen der fhNPZ (ATGZ) im Verhältnis 1:1 in einem geeigneten Reaktionsgefäß, ATGZ im Ultraschallbad für 15 min bei 68°C		
	<b>ATGZ aufbringen:</b>	100 µl (73°C), ATGZ mit <b>5.000 markierten fhNPZ</b>	100 µl (73°C), ATGZ mit <b>100.000 markierten fhNPZ</b>
Zentrifugation: 500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 10 min, -20 °C für 10 min, RT für 20 min			
9.	<b>Befüllen mit AG:</b>	5 ml AG (71°C)	5 ml AG (71°C)
	Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 20 min, -20 °C für 20 min, RT für 20 min		
10.	Herstellung ATG mit entsprechenden Konzentrationen der fhNPZ (ATGZ) im Verhältnis 1:1 in einem geeigneten Reaktionsgefäß, ATGZ im Ultraschallbad für 15 min bei 70°C		
	<b>ATGZ aufbringen:</b>	100 µl (73°C), ATGZ mit <b>50.000 markierten fhNPZ</b>	100 µl (73°C), ATGZ mit <b>200.000 markierten fhNPZ</b>
Zentrifugation: 500x g ↑↓, Lagerung: 4°C für 10 min, -20 °C für 10 min, RT für 20 min			

<b>Fortsetzung der Tabelle 38: Herstellungsprotokoll der Schichtgelphantome</b>		
<b>Verfahren</b>	<b>Gelphantom 1 (50 ml Gefäß)</b>	<b>Gelphantom 2 (50 ml Gefäß)</b>
<b>11.</b>	<b>Auffüllen mit AG:</b>	15 ml AG (73°C)
	Zentrifugation: 1500x g ↑↓, Abdeckung mit Parafilm, Lagerung bei 4°C bis zur Verwendung	

↑↓ = Beschleunigung der Zentrifuge bis das angegebene Vielfache der Erdbeschleunigung [g] erreicht wird und danach sofortiges Abstoppen; AG = Agarosegel; ATG = Agarosegel-Transplantationsmedium-Gemisch; ATGZ = Agarosegel-Transplantationsmedium-Gemisch mit fhNPZ; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; Gefäße = konische Zentrifugationsgefäße

## 9.2 Ergänzende Tabellen zur Herstellung histologischer Präparate

### 9.2.1 Herstellung der Paraffinblöcke

**Tabelle 39: Arbeitsschritte des Entwässerungsautomats bei der Herstellung der Paraffinblöcke**

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationszeit bei RT in min</b>
<b>1.</b>	70% Ethanol	60
<b>2.</b>	70% Ethanol	6
<b>3.</b>	80% Ethanol	120
<b>4.</b>	96% Ethanol	60
<b>5.</b>	96% Ethanol	120
<b>6.</b>	100% Ethanol	60
<b>7.</b>	100% Ethanol	120
<b>8.</b>	100% Ethanol	120
<b>9.</b>	Xylol	90
<b>10.</b>	Xylol	90
<b>11.</b>	Paraffin 60°C	120
<b>12.</b>	Paraffin 60°C	120

RT = Raumtemperatur

## 9.2.2 Histologische Färbungen und Immunhistochemische Methoden

**Tabelle 40: Anfertigungsprotokoll einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologischer Präparate**

Arbeitsschritte	Reagenz	Inkubationszeit bei RT
<b>1. Entparaffinieren</b>	Xylol	2x 5 min
<b>2. Bewässern</b>	100% Ethanol	kurz
	100% Ethanol	kurz
	90% Ethanol	kurz
	70% Ethanol	kurz
<b>3. Waschen</b>	VE-Wasser	2 - 5 min
<b>4. Kernfärbung</b>	Mayer's Hämalaun	3 min
<b>5. Waschen</b>	VE-Wasser	kurz
<b>6. Bläuen</b> (Fixation des Farbstoffs)	fließendes Leitungswasser	10 min
<b>7. Darstellung des restlichen Gewebes</b>	wässriges Eosin G 0,5%	1 - 3 min
<b>8. Entwässern und Differenzieren</b>	70% Ethanol	10 s
	90% Ethanol	10 s
	100% Ethanol	10 s
	100% Ethanol	30 s
	Isopropanol	2 min
	Xylol	2 - 5 min

RT = Raumtemperatur; VE-Wasser = demineralisiertes Wasser

**Tabelle 41: Anfertigungsprotokoll einer Berliner Blau-Färbung histologischer Präparate**

Arbeitsschritte	Reagenz	Inkubationszeit bei RT
1. Herstellung des Eisengemischs	20 ml 2% Kaliumhexacyanoferrat (II) + 20 ml 1% HCl	
2. Herstellung Kernechtrot	0,2 g Kernechtrot in 200 ml kochende 0,5% wässrige Aluminiumsulfat-Lsg. einrühren	5 - 10 min kochen lassen
	nach dem Erkalten filtrieren	
3. Entparaffinieren	Xylol	2x 5 min
4. Bewässern	100% Ethanol	5 min
	90% Ethanol	5 min
	70% Ethanol	5 min
5. Waschen	VE-Wasser	2 - 5 min
6. Färbung	Eisengemisch	20 min
7. Waschen	VE-Wasser	gründlich
8. Kernfärbung	Kernechtrot	10 min
9. Waschen	VE-Wasser	kurz
10. Darstellung des restlichen Gewebes	wässriges Eosin G 0,5%	1 min
11. Entwässern und Differenzieren	70% Ethanol	10 s
	90% Ethanol	10 s
	100% Ethanol	30 s
	Isopropanol	2 min
	Xylol	2 min

HCl = Salzsäure; Lsg. = Lösung; RT = Raumtemperatur; VE-Wasser = demineralisiertes Wasser

**Tabelle 42: Anfertigungsprotokoll einer Fouchét-Färbung histologischer Präparate**

Arbeitsschritte	Reagenz	Inkubationszeit bei RT
1. Herstellung des Eisenchlorid-Trichloressigsäure-Gemischs	100 ml 22% Trichloressigsäure + 10 ml 10% wässrige Eisen-(III)-Chlorid-Lsg.	
2. Entparaffinieren	Xylol	2x 5 min
3. Bewässern	100% Ethanol	5 min
	90% Ethanol	5 min
	70% Ethanol	5 min
4. Färbung	Eisenchlorid-Trichloressigsäure-Gemisch	5 min
5. Waschen	VE-Wasser	3 min
6. Wässern	VE-Wasser, fließend	3 min

Lsg. = Lösung; RT = Raumtemperatur; VE-Wasser = demineralisiertes Wasser

**Tabelle 43: Anfertigungsprotokoll der STEM101-Immunmarkierung und BB-Färbung**

Arbeitsschritte	Reagenz	Inkubationszeit Ort/Gerät
1. Herstellung des Eisengemischs	20 ml 2% Kaliumhexacyanoferrat (II) + 20 ml 1% HCl	
2. Waschen	Tris-Waschpuffer	10 min bei RT Schüttler
3. Blockade der endogenen Peroxidase	10 nM Natriumazid + 0,1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 0,05 M Tris-HCl	10 min bei RT feuchte Kammer
4. Waschen	Tris-Waschpuffer	10 min bei RT Schüttler
5. Blockade der unspezifischen Bindung	Tris-Waschpuffer + 5% Eselserum	60 min bei RT feuchte Kammer
6. Auftragen des Primärantikörpers	Tris-Waschpuffer + 5% Eselserum + Mouse anti STEM101 1:50	über Nacht bei 4°C feuchte Kammer
7. 3x Waschen	Tris-Waschpuffer	3x 5 min bei RT Schüttler
8. Auftragen des Sekundärantikörpers	N-Histofine Simple Stain Max PO (Multi)	30 min bei RT feuchte Kammer
9. 2x Waschen	Tris-Waschpuffer	2x 5 min bei RT Schüttler
10. Waschen	0,05 M Tris-HCl-Lsg. (pH 7,6)	5 min bei RT Schüttler
11. Visualisierung mit Chromogen DAB	0,1% DAB in Tris-HCl-Lsg. + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
12. mikroskopische Kontrolle	Abstoppen der Reaktion mit Tris- Waschpuffer	ca. 5 min bei RT
13. 3x Waschen	Tris-Waschpuffer	3x 5 min bei RT Schüttler
14. BB-Färbung	Eisengemisch	20 min bei RT Küvette
15. Waschen	VE-Wasser	gründlich Küvette
16. mikroskopische Kontrolle		
17. Entwässern und Differenzieren	70% Ethanol	10 s
	90% Ethanol	10 s
	100% Ethanol	10 s
	100% Ethanol	10 s
	Xylol	10 s
	Xylol	2 min

µl = Mikroliter; DAB = 3,3'-Diaminobenzidine; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid; HCl = Salzsäure; Lsg. = Lösung; M = molar; nM = nanomolar; RT = Raumtemperatur; STEM101 = monoklonaler Mäuseantikörper, der spezifisch an den humanen Ku80-Zellkernmarker bindet; VE-Wasser = demineralisiertes Wasser

**Tabelle 44: Anfertigungsprotokoll der Markierung mittels Iba1-Antikörper**

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationszeit Ort/Gerät</b>
<b>1. 3x Waschen</b>	PBS	3x 5 min bei RT Schüttler
<b>2. Blockade der unspezifischen Bindung</b>	PBS + 5% Ziegen Serum	60 min bei RT feuchte Kammer
<b>3. Auftragen des Primärantikörpers</b>	Blockpuffer + Kaninchen-anti Iba1 1:200	über Nacht bei 4°C feuchte Kammer
<b>4. 3x Waschen</b>	PBS	3 x 5 min bei RT Schüttler
<b>5. Auftragen des Sekundärantikörpers</b>	PBS + 1% Ziegen Serum + Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488 1:200	2 h bei RT im Dunkeln feuchte Kammer
<b>6. Kernmarkierung</b>	DAPI	10 min bei RT im Dunkeln
<b>7. 3x Waschen</b>	PBS	3x 5 min im Dunkeln Schüttler

DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff); PBS = phosphatgepufferte Salzlösung;  
RT = Raumtemperatur

### 9.3 Ergänzende Tabellen zur Statistik

**Tabelle 45: Übersicht über die von der Statistik ausgeschlossenen Daten**

	Wert	Gruppe / Tier	Versuchstag	Grund des Ausschlusses
<b>Albumin</b>	35,3 g/l	Kon/Tier 4	1	Bereits bei Versuchsbeginn erhöhte Werte messbar, Verdachtsdiagnose in Kombination mit der Betrachtung der ASAT- und der CK-Konzentration im Blut: Myopathie, Ausschluss bei Auswertung der Leberparameter
	34,2 g/l		7	
	33,8 g/l		14	
	32,6 g/l		21	
	34,1 g/l		29	
	34,0 g/l		36	
	35,0 g/l		43	
	36,6 g/l		50	
	35,4 g/l		57	
	35,7 g/l		64	
<b>ASAT</b>	391,5 U/l	Kon/Tier 4	1	Bereits bei Versuchsbeginn erhöhte Werte messbar, Verdachtsdiagnose in Kombination mit der Betrachtung der ASAT- und der CK-Konzentration im Blut: Myopathie, Ausschluss bei Auswertung der Leberparameter
	435,0 U/l		7	
	181,5 U/l		14	
	211,0 U/l		21	
	341,5 U/l		29	
	266,2 U/l		36	
	251,8 U/l		43	
	363,4 U/l		50	
	192,1 U/l		57	
	556,6 U/l		64	
<b>CsA</b>	4250,0 ng/ml	kCsA/Tier	29	nicht verwertbar, da Blutprobe aus Portkammer entnommen
	3910,0 ng/ml	11	36	
<b>GLDH</b>	355,5 U/l	Kon/Tier 4	1	Bereits bei Versuchsbeginn erhöhte Werte messbar, Verdachtsdiagnose in Kombination mit der Betrachtung der ASAT- und der CK-Konzentration im Blut: Myopathie, Ausschluss bei Auswertung der Leberparameter
	684,6 U/l		7	
	28,0 U/l		14	
	196,5 U/l		21	
	168,9 U/l		29	
	163,4 U/l		36	
	140,7 U/l		43	
	198,0 U/l		50	
	57,5 U/l		57	
	666,0 U/l		64	

<b>Fortsetzung der Tabelle 45: Übersicht über die von der Statistik ausgeschlossenen Daten</b>			
<b>Wert</b>	<b>Gruppe / Tier</b>	<b>Versuchstag</b>	<b>Grund des Ausschlusses</b>
87,0 U/l	Kon/Tier 4	1	Bereits bei Versuchsbeginn erhöhte Werte messbar, Verdachtsdiagnose in Kombination mit der Betrachtung der ASAT- und der CK-Konzentration im Blut: Myopathie, Ausschluss bei Auswertung der Leberparameter
96,9 U/l		7	
86,9 U/l		14	
75,5 U/l		21	
80,0 U/l		29	
89,6 U/l		36	
89,9 U/l		43	
99,7 U/l		50	
92,8 U/l		57	
100,9 U/l		64	

ASAT = Aspartat-Aminotransferase; CK = Kreatin-Kinase; CsA = Cyclosporin A; GGT =  $\gamma$ -Glutamyltransferase; GLDH = Glutamatdehydrogenase; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe

## 9.4 Verwendete Referenzwerte

**Tabelle 46: Übersicht verwendeter Referenzwerte beim Schaf**

Parameter	Einheit	Referenzwerte nach BAUER et al. (2014)	Referenzwerte nach SCHUSSER 2015 (2015)
Albumin	g/l	30 - 39 (Rind)	20 - 30
ALP	U/l	bis 100	60 - 300
ASAT	U/l	bis 75	40 - 80
Basophile Granulozyten	%	0 - 3	0 - 3
Bilirubin (gesamt)	µmol/l	bis 6,8	1,7 - 5,7
Kalzium	mmol/l	2,1 - 2,7	2,5 - 3,0
Chlorid	mmol/l	94 - 105 (Rind)	95 - 110
CK	U/l	bis 25	13 - 230
Eosinophile Granulozyten	%	1 - 10	0 - 10
Erythrozyten	T/l	6,5 - 11,3	7 - 11
Gesamtprotein		68 - 82 (Rind)	60 - 79
GGT	U/l	bis 32	< 60
GLDH	U/l	bis 7	< 20
Hämatokrit	l/l	0,30 - 0,38	0,27 - 0,40
Hämoglobin	mmol/l	5,4 - 7,9	5,6 - 9,3
Harnstoff	mmol/l	3,3 - 5,0	2,8 - 7,1
Kalium	mmol/l	3,9 - 5,3 (Rind)	3,9 - 5,4
Kreatinin	µmol/l	53 - 124	100 - 125
LDH	U/l	700 - 1400 (Rind)	> 300
Leukozyten	G/l	4,2 - 6,2	5 - 11
Lymphozyten	%	40 - 65	40 - 75
Magnesium	mmol/l	0,8 - 1,2	0,9 - 1,3
Monozyten	%	2 - 6	0 - 6
Natrium	mmol/l	134 - 145 (Rind)	139 - 152
Neutrophile Granulozyten	%	20 - 45	10 - 50
Thrombozyten	G/l	150 - 900	280 - 650

ALP = Alkalische Phosphatase; ASAT = Aspartat-Aminotransferase; CK = Kreatin-Kinase; GGT =  $\gamma$ -Glutamyltransferase; GLDH = Glutamatdehydrogenase; LDH = Laktat-Dehydrogenase

## 9.5 Übersicht der ausgewerteten Blutparameter

**Tabelle 47: Auswertung der Blutparameter: Blutbildung und Knochenmark**

Gruppe (n = 5)		AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Thrombozyten	Kon	40210,0 ± 10707,0	21167,0 ± 5930,0	14138,0 ± 4187,0
	iCsA	39870,0 ± 7282,0		15001,0 ± 1965,0
	kCsA	33297,0 ± 11666,0	18949,0 ± 5329,0 (n = 10)	10975,0 ± 3923,0

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Tabelle 48: Auswertung der Blutparameter: Elektrolyte**

Gruppe (n = 5)		AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kalium	Kon	282,5 ± 13,1	155,4 ± 13,8	95,8 ± 2,5
	iCsA	279,6 ± 7,2		95,1 ± 3,6
	kCsA	276,0 ± 6,4	150,5 ± 9,8 (n = 10)	92,4 ± 3,1
Kalzium	Kon	166,5 ± 4,9 (n = 4)	91,9 ± 3,2 (n = 4)	56,1 ± 2,0 (n = 4)
	iCsA	154,0 ± 21,6 (n = 4)		53,5 ± 2,4 (n = 4)
	kCsA	168,5 ± 4,7 (n = 4)	88,4 ± 14,4 (n = 8)	56,1 ± 1,2 (n = 4)
Magnesium	Kon	36,4 ± 26,0 (n = 4)	24,4 ± 10,7 (n = 3)	18,1 ± 1,5 (n = 3)
	iCsA	30,0 ± 24,3 (n = 4)		13,4 ± 6,0 (n = 4)
	kCsA	46,2 ± 3,3 (n = 3)	26,0 ± 4,6 (n = 5)	15,0 ± 3,3 (n = 3)
Natrium	Kon	9045,0 ± 358,2	4961,0 ± 373,0	3065,0 ± 43,1
	iCsA	9168,0 ± 100,7		3057,0 ± 31,2
	kCsA	9137,0 ± 140,7	4995,0 ± 334,7 (n = 10)	3018,0 ± 60,7

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Tabelle 49: Auswertung der Blutparameter: Muskulatur**

Gruppe (n = 5)		AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Kreatin-Kinase	Kon	12290,0 ± 4692,0	7101,0 ± 3309,0 (n = 4)	2900,0 ± 836,7 (n = 4)
	iCsA	11167,0 ± 3543,0 (n = 4)		3802,0 ± 1813,0 (n = 4)
	kCsA	7170,0 ± 507,6 (n = 4)	5014,0 ± 2668,0 (n = 8)	2354,0 ± 256,9 (n = 4)

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Tabelle 50: Auswertung der Blutparameter: Entzündung**

Gruppe (n = 5)		AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
Basophile Granulozyten	Kon	4,3 ± 6,5	2,9 ± 6,5	0,7 ± 1,6
	iCsA	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0
	kCsA	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 (n = 10)	0,0 ± 0,0
Eosinophile Granulozyten	Kon	152,9 ± 90,1	79,4 ± 46,9	60,2 ± 45,9
	iCsA	402,6 ± 274,0		130,9 ± 61,7
	kCsA	247,3 ± 142,5	165,7 ± 130,5 (n = 10)	92,4 ± 47,9
Leukozyten	Kon	409,2 ± 68,4	224,1 ± 43,3	137,4 ± 23,3
	iCsA	362,2 ± 92,2		124,0 ± 37,5
	kCsA	329,1 ± 54,2	191,4 ± 37,9 (n = 10)	106,8 ± 19,8
Lymphozyten	Kon	3581,0 ± 443,8	2027,0 ± 310,3	1174,0 ± 143,5
	iCsA	3140,0 ± 430,3		1074,0 ± 156,0
	kCsA	3687,0 ± 566,5	1932,0 ± 293,5 (n = 10)	1184,0 ± 249,0
Monozyten	Kon	280,8 ± 69,4	163,9 ± 47,3	78,4 ± 17,4
	iCsA	285,4 ± 74,8		98,0 ± 36,3
	kCsA	250,5 ± 80,8	144,4 ± 55,4 (n = 10)	86,1 ± 19,0
Neutrophile Granulozyten	Kon	2279,0 ± 451,4	1226,0 ± 324,3	785,4 ± 142,5
	iCsA	2474,0 ± 467,5		796,6 ± 226,9
	kCsA	2113,0 ± 504,4	1255,0 ± 240,3 (n = 10)	737,1 ± 215,0

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Tabelle 51: Auswertung der Blutparameter: Leberfunktion**

Gruppe (n = 5)		AUC-I (U)	AUC-II (U)	AUC-III (U)
ALP	Kon	12344,0 ± 2097,0	7172,0 ± 1438,0	3898,0 ± 1327,0
	iCsA	6971,0 ± 3899,0		2216,0 ± 1487,0
	kCsA	11245,0 ± 5956,0	5626,0 ± 2837,0 (n = 9)	4052,0 ± 2084,0
Bilirubin	Kon	101,9 ± 23,7	63,8 ± 18,8	28,8 ± 9,3
	iCsA	103,6 ± 36,6		32,0 ± 12,1
	kCsA	90,1 ± 34,4	51,8 ± 22,7 (n = 10)	36,6 ± 15,4
Gesamtprotein	Kon	4170,0 ± 83,7	2317,0 ± 47,9	1386,0 ± 20,7
	iCsA	4144,0 ± 143,8		1420,0 ± 53,4
	kCsA	4085,0 ± 162,4	2267,0 ± 93,8 (n = 10)	1369,0 ± 51,2
LDH	Kon	19305,0 ± 6192,0	9293,0 ± 6062,0 (n = 4)	5130,0 ± 1367,0
	iCsA	26943,0 ± 8399,0 (n = 4)		5537,0 ± 3094,0 (n = 2)
	kCsA	24316,0 ± 6599,0	13421,0 ± 3728,0 (n = 7)	5774,0 ± 4472,0 (n = 3)

AUC = *area under the curve* entspricht der Flächenberechnung unter der Kurve in U (arbiträre Einheit); AUC-I = Zeitraum Tag 1 - 64; AUC-II = Zeitraum Tag 1 - 36; AUC-III = Zeitraum Tag 37 - 64; iCsA = intermittierende Gruppe; kCsA = kontinuierliche Gruppe; Kon = Kontrollgruppe; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe

## 9.6 Übersicht zu tierexperimentellen Einsätzen von Stammzellen in Schlaganfallmodellen

Tabelle 52: Tierexperimentelle Einsätze von Stammzellen in Schlaganfallmodellen

	Art der Stammzellen	Tierspezies	Applikation	Ergebnisse des Modells
ESZ	emSCs	Ratte <sup>1</sup>	Transplantation in kontralateralen Kortex des Schlaganfalls	Zielgerichtete Migration der Zellen Richtung Läsion
		Maus <sup>1</sup>		Differenzierung in Neurone
FSZ	fhNPZ	Ratte <sup>2</sup>	Transplantation in Umgebung der Infarktregion	Keine Migration
				Bildung von Teratokarzinomen
ASZ	ahMNSCs	Ratte <sup>3</sup>	Stereotaktische Zelltransplantation in den linken lateralen Ventrikel	Zielgerichtete Migration der transplantierten fhNPZ hin zur Läsion
	hNTs	Ratte <sup>4</sup>	Kortikale stereotaktische Transplantation	Großteil der Zellen zeigte neuronalen Phenotyp
	alBMSCs	Ratte <sup>5</sup>	i.a. Applikation in ipsilaterale <i>A.carotis</i>	Reduktion des Infarktolumens Verbesserte Motorik

<sup>1</sup> ERDÖ et al. 2003; <sup>2</sup> KELLY et al. 2004; <sup>3</sup> JOO et al. 2013; <sup>4</sup> BLISS et al. 2006; <sup>5</sup> SHEN et al. 2007; ahMNSCs = adulte humane multipotente neurale Stammzellen; alBMSCs = allogene Knochenmarkstammzellen; ASZ = adulte Stammzellen; emSCs = embryonale murine Stammzellen; ESZ = embryonale Stammzellen; fhNPZ = fetale humane neurale Progenitorzellen; FSZ = fetale Stammzellen; hNT = humane postmitotische unreife Neurone

## 9.7 Auflistung verwendeter Materialien und Geräte

**Tabelle 53: Übersicht verwendeter Reagenzien**

Reagenzien		Hersteller
2-Methylbutan		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose		Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Aluminiumsulfat-Lsg.	0,5%, wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
B27 Supplement minus Vitamin A	50x	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
B-FGF		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Braunoderm		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Cremophor EL		Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
D(+)-Saccharose	30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DAB	0,1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DAKO Mounting Medium		Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DMEM-F12 + 15 mM HEPES		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM-F12 + Glutamax		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eisen-(III)-Chlorid-Lsg.	10%, wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Entellan/Roti-Histo-Kit		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	0,5%, wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eserserum	5%	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanol	70%, 90%, 96%, 80%, 94%, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gefriereinbettmedium		Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
HCl	1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Human Plasma Fibronectin		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Iba1-Antikörper		Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Isopropanol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (II)	2%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LIF		Millipore, Schwalbach, Deutschland
Maus anti STEM101	01:50	StemCells, Inc., Newark, USA
Mayer's Hämalun		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N2 Supplement	100x	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaOH		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	10 nM	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N-Histofine Simple Stain Max PO (Multi)		Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan
Paraffin		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PFA		AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

<b>Fortsetzung der Tabelle 53: Übersicht verwendeter Reagenzien</b>		
<b>Reagenzien</b>		<b>Hersteller</b>
Recombinant Human EGF		PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Taq Polymerase		Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
TBE-Puffer		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	22%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	0,05 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TrypLE Select		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
VSOP	50 mM	Ferropharm GmbH, Teltow, Deutschland
Wasserstoffperoxid	0,1%, 3%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488		Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	5%	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 54: Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel**

<b>Verbrauchsmittel</b>		<b>Hersteller</b>
6 Well-Platten		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Atemfilter	Clear Guard 3	Intersurgical GmbH, Sankt Augustin, Deutschland
Atemkalk		Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland
Braunüle GT		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Wasserfalle		Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck
Deckgläser		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA-Monovetten		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Einbettkassetten		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe	steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Einmalhandschuhe	unsteril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tube (Falcon)	50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Flexüle		BD, Heidelberg, Deutschland
Schottflaschen		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Infusionsbesteck		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kanülen		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Klebeband	rot	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kryotube		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Küvette		Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
LookOut <sup>®</sup> Mycoplasma PCR Detection Kit		Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Mullkompressen		NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, Deutschland

<b>Fortsetzung der Tabelle 54: Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel</b>		
<b>Verbrauchsmittel</b>		<b>Hersteller</b>
Mundschutz		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaCl	0,9%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm		Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Reaktionstubes		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Perfusionsschläuche		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Portnadeln		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen	1/2/5/10/100 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Spatel	steril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tupfer	steril	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland
Trockeneis		Linde AG, Pullach, Deutschland
Tubus		Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland
Zellkulturflaschen	175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplastikwaren		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 55: Übersicht verwendeter Geräte**

<b>Geräte</b>		<b>Hersteller</b>
1,5 T MRT		Siemens Healthcare, München, Deutschland
3,0 T MRT		Siemens Healthcare, München, Deutschland
API 4000 <sup>TM</sup> System		AB Sciex, Wien, Österreich
Autostainer XL	Leica ST5010	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Axio Imager	A.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axio Scan	Z.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Digitale Videokamera		Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland
Digitaler Fotoapparat		Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
elektrische Pipette	accu-Jet® Pro	BRAND GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Entwässerungsautomat	Leica TP1020	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse Ti-E	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	LSM	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Geldokumentation	Alphaimager	Proteinsimple, San Jose, USA
Gelkammer		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heizmagnetrührer		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Inkubationsschrank	HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kryostat	Leica CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

<b>Fortsetzung der Tabelle 55: Übersicht verwendeter Geräte</b>		
<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	
Kühlschrank	4°C/-20°C	Liebherr GmbH, Biberbach an der Riss, Deutschland
Laryngoskop		W. Söhngen GmbH, Taunusstein-Wehen, Deutschland
NMR-Relaxometer	Minispec	Bruker, Ettlingen, Deutschland
Paraffinausgießstation	Leica EG1150H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstrecktisch	Leica HI1220	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
PCR-Lightcycler		Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland
Pipetten		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Powersupply		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica RM 2255	Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Rührfischchen		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stickstofftank GT 140		Air Liquide GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Ultraschallbad	Elmasonic® Xtra 70	Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Deutschland
Wärmeplatte		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Leica HI1210	Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zählkammer, nach Neubauer		Fein-Optik GmbH, Bad Blankenburg, Deutschland
Zellkulturbank	HERA Safe	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Cytospin 3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

**Tabelle 56: Übersicht verwendeter MRT-Sequenzen**

<b>Anwendung</b>	<b>verwendete Sequenz</b>	<b>Räumliche Auflösung</b>	<b>Messzeit</b>
Nachweis eisenmarkierter fhNPZ <i>in vitro</i>	suszeptibilitätsgewichtete Sequenz (SWI)	0,31 x 0,27 x 0,25 mm	6 h und 46 min
Anatomische Aufnahme Schafhirn (1,5 T)	T1-gewichtete Sequenz	1,0 x 1,0 x 1,0 mm	27 min
Nachweis eisenmarkierter fhNPZ <i>in vivo</i>	T2-gewichtete Turbo TSE-Sequenz	0,55 x 0,55 x 2,5 mm	6 min
	SWI-Sequenz	0,56 x 0,30 x 0,25 mm	1 h 26 min

**Tabelle 57: Übersicht verwendeter Medikamente**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Augengel (Corneregal®)		Dr. Gerhard Mann GmbH, Berlin, Deutschland
Butorphanol (Torbugesic®)	10 mg/ml	Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Deutschland
Cyclosporin A (Sandimmun®)		Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Diazepam	10 mg/2 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Enrofloxacin (Baytril®)	50 mg/ml	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Flunixin-Meglumin (Meflosyl®)	50 mg/ml	Fort Dodge Vet. GmbH, Würselen, Deutschland

<b>Fortsetzung der Tabelle 57: Übersicht verwendeter Medikamente</b>		
<b>Wirkstoff</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Heparin-Natrium	25.000 IE/5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran	flüssig	CP Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
Ketaminchlorid (Ursotamin <sup>®</sup> )	100 mg/ml	Serum-Werk Bernburg, Bernburg, Deutschland
Midazolamhydrochlorid	5 mg/ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Natriumcholridlösung	0,9%	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren <sup>®</sup> )	16 g/100 ml	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Propofol	20 mg/ml	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ringer-Lactat-Lsg.		B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2% <sup>®</sup> )	20 mg/ml	Serum-Werk Bernburg, Deutschland

**Tabelle 58: Übersicht verwendeter chirurgischer Instrumente und Operationszubehör**

<b>Chirurgische Instrumente/Operationszubehör</b>		<b>Hersteller</b>
Anästhesiegerät Dräger	Primus <sup>®</sup>	Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck
Arterienklemmen (2x)		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Bohraufsätze		Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Bohrsystem	Microspee d <sup>®</sup> uni	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Durahaken		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Elektrochirurgiegerät	ME 411	KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Hamilton Spritze (10µl, 26 g, 5 cm)	RN 1001	Hamilton Company, USA
iMac		Apple Inc., Cupertino, USA
Knochenwachs		Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Messer mit Klinge		fürs Lamellieren, spezielles Messer
Nadelfadenkombination		Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Nadelhalter		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Neuronavigationssystem	BrainSight <sup>®</sup>	Rouge Research Inc., Montreal, Kanada
oszillierende Säge	KM-40	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Perfusorpumpen (2x)	Perfusor <sup>®</sup> compact	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pinzette chirurgisch/anatomisch		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Pinzette nach Adson Brown		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Pinzette, bipolar, abgewinkelt		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Pinzette, bipolar, gerade		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Portkammer, MRI Portimplant γ-F-Chronoflex	8.0 F	C. R. Bard, Inc., New Jersey, USA
Portlagesystem Deltalong I EKG-Positions Kontrollsystem	5 ml LL Spritze	Pajunk, Geisingen, Deutschland

<b>Fortsetzung der Tabelle 58: Übersicht verwendeter chirurgischer Instrumente und Operationszubehör</b>		
<b>Chirurgische Instrumente/Operationszubehör</b>		<b>Hersteller</b>
Portlagesystem Deltalong-Switchbox, Universaladapter für EKG-Systeme		Pajunk, Geisingen, Deutschland
Raspatorium	3 mm/5 mm	KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Schere nach Metzenbaum		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Schere, chirurgisch, stumpf		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpellgriff		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpellklingen		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Tuchenklemme nach Backhaus (7x)		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Wundspreizer, nach Gelpi		KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 59: Übersicht verwendeter Gerätesoftware**

<b>Gerätesoftware</b>	<b>Hersteller</b>
Corel Draw X4	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
GraphPad Prism	GraphPad® Software, Inc., USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MISStar 3.2	Apollo Medical Imaging Technology, Melbourne, Australia

## 9.8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung der Zellteilung und -differenzierung .....	2
Abbildung 2: Darstellung lebender fhNPZ im Rattenhirn 4 Wochen nach Transplantation.....	8
Abbildung 3: Bestimmung der T1- und T2-Zeitkonstanten .....	10
Abbildung 4: Wirkmechanismen gebräuchlicher Immunsuppressiva (DIEHL et al. 2016) .....	15
Abbildung 5: Ergebnisse des Mykoplasmentests nach Gelelektrophorese .....	23
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Gelphantome .....	25
Abbildung 7: Übersicht des Versuchsablaufs über 64 Tage .....	28
Abbildung 8: Inhalations- und Injektionsnarkose beim Schaf .....	30
Abbildung 9: Portimplantation beim Schaf.....	32
Abbildung 10: Applikation von CsA beim Schaf .....	33
Abbildung 11: Durchführung der MRT-Aufnahmen .....	34
Abbildung 12: Stereotaktische Zelltransplantation .....	35
Abbildung 13: Quantifizierung von eisenmarkierten fhNPZ im Schafhirn .....	36
Abbildung 14: Schema des Lamellierens eines Schafhirns.....	38
Abbildung 15: Schematische Darstellung der gefärbten Serienschichten auf den Objektträgern .....	39
Abbildung 16: Bewertungsschlüssel für die Beurteilung der Nierentubulusepithelzellen.....	42
Abbildung 17: Definition des Bewertungsschlüssels für die Beurteilung der Hepatozyten .....	43
Abbildung 18: Schema der Berechnung von AUCs.....	44
Abbildung 19: Proliferationstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung .....	48
Abbildung 20: Vitalitätstests zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung .....	49
Abbildung 21: Darstellung der T2-Zeitkonstante 0 h und 24 h nach Eisenmarkierung.....	50
Abbildung 22: Darstellung der eisenmarkierten fhNPZ mittels 3,0 T MRT in Schichtgelphantomen .	51
Abbildung 23: Darstellung der gruppenspezifischen CsA-Konzentrationen im Blut .....	52
Abbildung 24: Darstellung der individuellen Unterschiede der CsA-Blutkonzentration.....	54
Abbildung 25: Darstellung der Ergebnisse der neurologischen Untersuchungsgänge.....	55
Abbildung 26: Volumina eisenmarkierter Stammzellkumulate im Schafhirn .....	56
Abbildung 27: Darstellung vitaler eisenmarkierter fhNPZ im Schafhirn .....	57
Abbildung 28: Darstellung eisenmarkierter fhNPZ im Schafhirn nach Versuchsende.....	58
Abbildung 29: Darstellung der Körpertemperaturverläufe .....	60
Abbildung 30: Darstellung der Körpergewichte .....	61
Abbildung 31: Darstellung der mittleren arteriellen Blutdrücke in Narkose .....	62
Abbildung 32: Auswertung der Erythrozyten-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich.....	63
Abbildung 33: Auswertung des Hämatokrit im Gruppenvergleich.....	64
Abbildung 34: Auswertung der Hämoglobin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich.....	65
Abbildung 35: Auswertung der ASAT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich .....	66
Abbildung 36: Auswertung der GLDH-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich .....	67
Abbildung 37: Auswertung der GGT-Aktivität im Blut im Gruppenvergleich .....	67

Abbildung 38: Auswertung der Albumin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich .....	68
Abbildung 39: Auswertung der Harnstoff-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich.....	69
Abbildung 40: Auswertung der Kreatinin-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich .....	70
Abbildung 41: Auswertung der Chlorid-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich .....	71
Abbildung 42: Makroskopische Darstellung Leber.....	72
Abbildung 43: Makroskopische Darstellung Niere .....	73
Abbildung 44: Darstellung der histologischen Auswertung von Leber und Nieren.....	74
Abbildung 45: Darstellung der Berliner Blau- und Fouchét-Färbung .....	74
Abbildung 46: Nebenbefund einer interstitiellen nicht-eitrigen Nephritis .....	75

## 9.9 Formelverzeichnis

[ 1 ] Bestimmung der Gesamtzellzahl .....	21
[ 2 ] Bestimmung der Zellvitalität .....	21
[ 3 ] Einstellung der Zielzellkonzentration im definierten Transplantationsvolumen .....	23
[ 4 ] Bestimmung der T2-Zeitkonstante .....	24

## 9.10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der verschiedenen Stammzellpopulationen .....	3
Tabelle 2: Vor- und Nachteile kommerzieller Stammzellprodukte.....	4
Tabelle 3: Empfehlungen der Expertenkommissionen STAIR und STEPS.....	6
Tabelle 4: Übersicht zu Tiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie (CANAZZA et al. 2014).....	7
Tabelle 5: Einteilung von Immunsuppressiva in Wirkstoffklassen .....	14
Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	20
Tabelle 7: Gruppeneinteilung und jeweiliges Behandlungsregime .....	26
Tabelle 8: Bewertungsschlüssel des neurologischen Untersuchungsgangs.....	27
Tabelle 9: Behandlungsregime nach operativen Eingriffen .....	31
Tabelle 10: Übersicht der statistisch angewandten Tests .....	46
Tabelle 11: Auswertung der Proliferationstests zu verschiedenen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung.....	47
Tabelle 12: Auswertung der Vitalitätstests zu verschiedenen Zeitpunkten nach Eisenmarkierung .....	48
Tabelle 13: Auswertung der T2-Relaxationszeit 0 h und 24 h nach Eisenmarkierung .....	50
Tabelle 14: Auswertung der CsA-Konzentration im Blut im Gruppenvergleich .....	53
Tabelle 15: Individuelle Unterschiede der CsA-Konzentration innerhalb der Gruppen .....	54
Tabelle 16: Auswertung der neurologischen Untersuchungsgänge.....	55
Tabelle 17: Volumina eisenmarkierter Stammzellkumulate im Schafhirn im Gruppenvergleich.....	56
Tabelle 18: Die relative Volumenabnahme im Zeitverlauf und Gruppenvergleich .....	56
Tabelle 19: Auswertung der Körpertemperaturverläufe.....	59
Tabelle 20: Auswertung der Körpergewichtverläufe .....	60
Tabelle 21: Auswertung der Veränderungen der Körpergewichte im Versuchsverlauf.....	60

Tabelle 22: Auswertung der mittleren arteriellen Blutdrücke in Narkose .....	61
Tabelle 23: Auswertung der Erythrozyten-Konzentration im Blut .....	63
Tabelle 24: Auswertung des Hämatokrit im Blut.....	63
Tabelle 25: Auswertung der Hämoglobin-Konzentration im Blut.....	64
Tabelle 26: Auswertung der ASAT-Aktivität im Blut .....	65
Tabelle 27: Auswertung der GLDH-Aktivität im Blut .....	66
Tabelle 28: Auswertung der GGT-Aktivität im Blut .....	67
Tabelle 29: Auswertung der Albumin-Konzentration im Blut.....	68
Tabelle 30: Vergleich der Albumin-Konzentration im Blut an Tag 1 und 64.....	68
Tabelle 31: Auswertung der Harnstoff-Konzentration im Blut.....	69
Tabelle 32: Auswertung der Kreatinin-Konzentration im Blut.....	70
Tabelle 33: Auswertung der Chlorid-Konzentration im Blut.....	71
Tabelle 34: Organgewichte im Gruppenvergleich .....	72
Tabelle 35: Übersicht der Sektionsbefunde für Leber und Niere.....	72
Tabelle 36: Übersicht der histologischen Auswertung von Leber und Nieren .....	73
Tabelle 37: Übersicht der Auswertung der Berliner Blau-Färbung von Leber und Nieren .....	74
Tabelle 38: Herstellungsprotokoll der Schichtgelphantome .....	110
Tabelle 39: Arbeitsschritte des Entwässerungsautomats bei der Herstellung der Paraffinblöcke.....	111
Tabelle 40: Anfertigungsprotokoll einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologischer Präparate.....	112
Tabelle 41: Anfertigungsprotokoll einer Berliner Blau-Färbung histologischer Präparate .....	113
Tabelle 42: Anfertigungsprotokoll einer Fouchét-Färbung histologischer Präparate .....	113
Tabelle 43: Anfertigungsprotokoll der STEM101-Immunmarkierung und BB-Färbung .....	114
Tabelle 44: Anfertigungsprotokoll der Markierung mittels Iba1-Antikörper .....	115
Tabelle 45: Übersicht über die von der Statistik ausgeschlossenen Daten .....	116
Tabelle 46: Übersicht verwendeter Referenzwerte beim Schaf .....	118
Tabelle 47: Auswertung der Blutparameter: Blutbildung und Knochenmark.....	119
Tabelle 48: Auswertung der Blutparameter: Elektrolyte .....	119
Tabelle 49: Auswertung der Blutparameter: Muskulatur.....	120
Tabelle 50: Auswertung der Blutparameter: Entzündung.....	120
Tabelle 51: Auswertung der Blutparameter: Leberfunktion .....	121
Tabelle 52: Tierexperimentelle Einsätze von Stammzellen in Schlaganfallmodellen .....	122
Tabelle 53: Übersicht verwendeter Reagenzien.....	123
Tabelle 54: Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel.....	124
Tabelle 55: Übersicht verwendeter Geräte.....	125
Tabelle 56: Übersicht verwendeter MRT-Sequenzen .....	126
Tabelle 57: Übersicht verwendeter Medikamente.....	126
Tabelle 58: Übersicht verwendeter chirurgischer Instrumente und Operationszubehör .....	127
Tabelle 59: Übersicht verwendeter Gerätesoftware .....	128

## 10 DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Dr. Johannes Boltze**, der mir diese Doktorarbeit ermöglichte. Seine tatkräftige, schnelle und stets konstruktive Unterstützung hat meine Doktorarbeit maßgeblich beeinflusst und vor allem vorangetrieben.

Ganz herzlich möchte ich Herrn **Prof. Dr. Christoph Mülling** für die Betreuung meiner Doktorarbeit und das stets offene Ohr danken.

Ebenso gilt mein Dank Frau **Dr. Antje Dreyer** für ihre Unterstützung bei der Arbeit mit den Versuchstieren.

Ganz herzlich möchte ich mich zudem bei Frau **Dr. Kristin Müller** für ihre fachliche und immer fröhliche Unterstützung bei den pathologischen und histopathologischen Fragestellungen dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz herzlicher Dank geht an Herrn **Dr. Björn Nitzsche** für die immer produktiven Diskussionsrunden und Denkanstöße.

Zudem möchte ich Frau **Dr. Susan Hetz** für ihre tatkräftige Unterstützung gerade in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit danken. Liebe Susan, du hast mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt, dafür danke ich dir!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn **Dr. Holger Kirsten** für seine fachmännische Unterstützung bei statistischen Fragestellungen bedanken.

Bei der Arbeit mit den Schafen im Stall und im MRT haben mich zum Glück sehr viele Menschen tatkräftig unterstützt. Dafür möchte ich Herrn **Dr. Donal Lobsien** für seine fachliche Unterstützung im MRT, und den Tiermedizinischen Fachangestellten **Natalie Jakubke** und **Isabel Harzendorf** für ihren Einsatz am Tier danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau **Dr. Vilia Zeisig**, Herrn **PhD Damian McLeod** und Frau **Ann-Kathrin Schatzl** bedanken. Ihr wart in guten wie in schlechten Zeiten stets an meiner Seite. Thanks for a wonderful time!

Ein riesengroßer Dank, der sich gar nicht in Worte fassen lässt geht an meine wunderbaren Laborfeen Herrn **Sören Pietsch**, Frau **Wenke Fröhlich** und Frau **Elfi Quente**. Ohne eure Unterstützung hätte ich meine Doktorarbeit nie geschafft!!! Stets hattet ihr ein offenes Ohr für meine Fragen und immer eine

Antwort parat. Doch nicht nur theoretisch, vor allem praktisch habt ihr es in diesem großen Projekt überhaupt möglich gemacht, dass hieraus eine wissenschaftliche Arbeit entstehen konnte.

Zu mit den wichtigsten Personen in meinem Umfeld gehören Frau **Kerstin Fischer** und Frau **Theresa Bartosch**. Ich danke euch dafür, dass ihr immer für mich da seid; ihr seid ganz wunderbare Menschen, die ich sehr lieb habe!

Ein unglaublich großer Dank gilt meiner Freundin Frau **Dr. Fabienne Ferrara**. Liebe Fabienne, du warst immer zusammen mit Emil für mich da und hast mich enorm unterstützt, sowohl bei meiner Doktorarbeit als auch bei allen leichten und schwierigen Fragen des Lebens. Dafür danke ich dir sehr! Ich habe dich lieb!

Ohne die großartige Unterstützung meiner Familie, die mir in guten und in den schlechten Zeiten, meist mit langen Telefonaten, beigestanden hat, hätte ich diese Arbeit nie geschafft. Liebe **Elisabeth**, liebe **Judith** und lieber **Sebastian**, ihr seid die allerbesten Geschwister der Welt, die ich sehr liebe und ich bin unglaublich dankbar, dass wir alle Teil dieser tollen Familie sind!

Liebe **Mama**, lieber **Papa**, wie ich den Dank an euch in Worte fassen soll weiß ich leider nicht. Ihr habt mir so viel ermöglicht und mich bis hierher begleitet, ganz im Sinne von Johann Wolfgang von Goethe, der sagte:

„Zwei Dinge sollten Kinder von ihren Eltern bekommen: Wurzeln und Flügel.“

In diesem Sinne danke ich euch dafür, dass ihr mir die Leichtigkeit beigebracht habt, durch das Leben zu fliegen und dabei doch nicht die Bodenhaftung zu verlieren, dank unglaublich starker Wurzeln. Ich liebe euch sehr!

Zum Schluss möchte ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: Lieber **Simon**, ich danke dir sehr dafür, dass du in den letzten sehr intensiven Jahren liebevoll und wunderbar stets an meiner Seite warst. Ich liebe dich! Und freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft zusammen mit der besten feuchten Hundeschnauze die es gibt namens **Ayla**.