

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Morphologische Analyse verletzter Glutealmuskulatur nach
intraoperativer Transplantation von allogenen mesenchymalen
Stromazellen nach transglutealer Hüftendoprothetik

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Henning Plage
aus Parchim

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract (deutsch)	4
2. Abstract (english)	5
3. Einleitung	7
3.1 Muskelschädigung in der Hüfttotalendoprothetik	7
3.2 Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur	9
3.3 Aktuelle Therapieansätze	14
3.3.1 RICE-Schema.....	14
3.3.2 Hyperbare Sauerstofftherapie	15
3.3.3 Therapeutischer Ultraschall	16
3.3.4 Anti-inflammatorische Pharmakotherapie.....	16
3.3.4.1 Nicht steroidale Antirheumatika.....	16
3.3.4.2 Steroide	17
3.3.5 Anti-fibrotische Pharmakotherapie	17
3.3.6 Zelltherapie	18
3.3.6.1 Mesenchymale Stromazellen der Plazenta.....	20
3.3.6.2 Placental expanded adherant stromal cell product (PLX).....	22
3.4 Zielsetzung und Hypothesen	24
4. Material und Methoden	26
4.1 Studiendesign	26
4.1.1 Studienablauf.....	26
4.2 Patientenkollektiv	27
4.3 Herstellung der PLX Zellen	28
4.4 Operationstechnik der Hüfttotalendoprothesenimplantation und Studienintervention	29
4.5 Rehabilitation	29
4.6 Makromorphologie	30
4.6.1 MRT Untersuchungen.....	30
4.6.1.1 Beurteilung des Muskelvolumens.....	30
4.6.1.2 Beurteilung der fettigen Muskelatrophie.....	32
4.7 Mikromorphologie	33
4.7.1 Durchführung der Biopsien	33
4.7.2 Aufbereitung der Biopsien.....	33
4.7.3 Anfertigung der Schnitte	33
4.7.4 Fixierung der Schnitte	34

4.7.5 Färbungen	34
4.7.5.1 Konventionelle Histologie	34
4.7.5.2 Immunhistochemie	35
4.7.6 Auswertung der histologischen Präparate	37
4.8 Statistische Auswertung	43
5. Ergebnisse	45
5.1 Patientenkollektiv	45
5.2 Makromorphologie	46
5.2.1 Einfluss der PLX Zellen auf das Muskelvolumen.....	46
5.2.2 Einfluss der PLX Zellen auf den Fettanteil in der Muskulatur	47
5.3 Mikromorphologie	50
5.3.1 Einfluss der PLX Zellen auf den Muskelfaserdurchmesser.....	51
5.3.2 Einfluss der PLX Zellen auf die Anzahl der Regeneratfasern	52
5.3.3 Einfluss der PLX Zellen auf die Fasertypverteilung	53
5.3.4 Einfluss der PLX Zellen auf die Gefäßdichte	53
5.3.5 Einfluss der PLX Zellen auf die T-Lymphozyteninfiltration.....	54
5.3.6 Einfluss der PLX Zellen auf die Makrophageninfiltration	56
6. Diskussion	57
6.1 Beurteilung der Makromorphologie	57
6.2 Beurteilung der Mikromorphologie	59
6.3 Beurteilung der Dosierung.....	66
6.4 Methodenkritik	67
6.5 Ausblick	70
Abkürzungsverzeichnis	72
Danksagung	74
Eidesstattliche Versicherung	75
Literaturverzeichnis	76
Lebenslauf.....	85

1. Abstract (deutsch)

Einleitung: Beim transglutealen Zugang zur Implantation einer Hüfttotalendoprothese (HTEP) wird der Musculus gluteus medius (GM) inzidiert, um eine optimale Darstellung für den Gelenkersatz zu erreichen. Vor allem bei schwereren Muskelschädigungen kann es zu einer unvollständigen Reparatur kommen, die auf Basis des Verlustes kontraktile Einheiten sowie deren Ersatz durch Fett- und Bindegewebe zu funktionellen Einschränkungen führt. Die Möglichkeit Regenerationsprozesse durch zellbasierte Therapieansätze zu unterstützen wird aktuell vielseitig untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von mesenchymalen Stromazellen der Plazenta (Placental expanded stromal cell product, PLX Zellen) auf den traumatisierten GM nach einer HTEP-Implantation anhand von morphologischen Parametern zu evaluieren.

Methodik: In einer monozentrischen, placebo-kontrollierten, doppelblinden, prospektiven Studie wurden 20 Patienten drei Gruppen randomisiert zugeordnet und untersucht. Nach der HTEP-Implantation wurden folgende Studieninterventionen verglichen: intramuskuläre Applikation von 1) Placebo (N=7), 2) 150×10^6 (N=7) und 3) 300×10^6 (N=6) PLX Zellen. Zur Analyse der Makromorphologie wurden Magnetresonanztomografie- (MRT) Aufnahmen präoperativ und 6, 12 sowie 26 Wochen postoperativ durchgeführt und das Muskelvolumen und die fettige Infiltration analysiert. Für die Mikrostruktur wurden intraoperativ und 12 Wochen postoperativ eine Muskelbiopsie des GM entnommen und folgende histologische Analysen durchgeführt: Muskelfaserdurchmesser, Anzahl der Regeneratfasern, Fasertypverteilung, Gefäßdichte, Infiltration mit T-Lymphozyten und Makrophagen.

Ergebnisse: 26 Wochen postoperativ zeigte die MRT-Analyse einen signifikanten Unterschied der Muskelvolumenzunahme bei Patienten, welche mit 150M PLX Zellen therapiert worden waren im Vergleich zur Placebogruppe ($p=0.004$). Patienten der 300M Gruppe erwiesen sich als inferior zur 150M Gruppe mit einem GM Volumen, das zwischen Placebo und 150M lag. Die Veränderung des intramuskulären Fettanteils war in allen Gruppen gleich. In der mikromorphologischen Analyse zeigte sich ein Muster, welches schneller ablaufende Regenerationsvorgänge nach Zelltherapie beschrieb. Gekennzeichnet war dies durch noch bestehende Anzeichen für Regeneration in der Placebogruppe, wie Myoblasten und kleinere Faserdurchmesser, 12 Wochen postoperativ. Angiogene Effekte sowie Veränderungen der Fasertypverteilung konnten in der Biopsie nicht beobachtet werden. Ein Einfluss der Zelltherapie auf lokale

immunologische Parameter, wie Lymphozyten- und Makrophageninfiltration, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die mikro- und makromorphologische Untersuchung des traumatisierten GM nach klinischer Anwendung von PLX Zellen weist auf einen möglichen Wirkmechanismus über die Zunahme kontraktiles Muskelgewebes hin. Eine schnellere Regeneration könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Für definitive Aussagen sind weitere Studien mit größeren Patientenzahlen notwendig.

2. Abstract (english)

Introduction: During transgluteal total hip arthroplasty (THA) the gluteus medius muscle (GM) is incised to achieve an ideal exposure for the hip replacement. Particularly severe muscle traumas can induce an insufficient repair which can lead to functional limitations based on a lack of contractile units and a replacement by fatty and fibrotic tissue. Currently the potential to support the regeneration process by cell-based therapies is investigated widely. The aim of this thesis is to evaluate the influence of mesenchymal stromal cells of the placenta (placental expanded stromal cell product, PLX cells) on the traumatized GM after THA with the focus on morphological parameters.

Method: In a monocentric, placebo-controlled, double blind, prospective study 20 patients were randomized in three groups and examined. After the THA the following study interventions were compared: intramuscular application of 1) placebo (N=7), 2) 150×10^6 (N=7) and 3) 300×10^6 (N=6) PLX cells. For the macromorphological analysis magnet resonance imaging (MRI) images were investigated for muscle volume and fatty infiltrations preoperatively and 6, 12, as well as 26 weeks postoperatively. For the analysis of the microstructure muscle biopsies of the GM were removed intraoperatively and 12 weeks postoperatively for the following measurements: muscle fibre diameter, amount of regenerated fibres, fibre type distribution, vessel density, infiltration of t-lymphocytes and macrophages.

Results: 26 weeks postoperatively the MRI analysis demonstrated a significant difference in the increase of muscle volume in patients treated with 150M PLX cells in comparison to the placebo group ($p=0.004$). Patients of the 300M group represented inferior to the 150M group with a GM volume which was between the placebo and 150M. The change of intramuscular fat was equal in all groups. The micromorphological

analysis presented a pattern describing faster regeneration processes after cell therapy. This was marked by ongoing regeneration in the placebo group 12 weeks postoperatively, as represented by myoblasts and minor fibre size diameter. Angiogenic effects and changes in fibre type distribution were not detected in the biopsy. An influence of the cell therapy on local immunological parameters, like the infiltration of the lymphocytes and the macrophages, was equally not established.

Conclusion: The micro- and macromorphological analysis of the traumatised GM after clinical application of PLX cells indicate an increase of contractile muscle tissue as a potential mode of action. A faster regeneration could also be relevant. For definitive statements further studies with higher number of patients are necessary.

3. Einleitung

3.1 Muskelschädigung in der Hüfttotalendoprothetik

Sportverletzungen sind die häufigsten und bekanntesten Ursachen für Schädigungen der Skelettmuskulatur. Eine klinisch häufig unterschätzte Ursache von Muskelverletzungen ist die iatrogene Schädigung im Rahmen von operativen Eingriffen. Speziell in der Orthopädie und Unfallchirurgie kommt es dabei zur Traumatisierung gelenknaher Skelettmuskulatur durch unterschiedlich gewählte Zugänge¹⁻⁴. Als konkretes Beispiel wird in dieser Arbeit die Implantation der Hüfttotalendoprothese (HTEP) beschrieben.

Die HTEP beschreibt den kompletten Ersatz eines kranken Hüftgelenks mit Implantaten und wird vorrangig zur Therapie schwerer Hüftgelenksarthrose (Koxarthrose) angewendet. Weitere Indikationen sind die Hüftkopfnekrose (2%), Schenkelhalsfrakturen des Femurs (2%), Dysplasien der Hüfte (2%) oder die rheumatoide Arthritis (<1%)⁵. Bei der HTEP werden sowohl die Hüftpfanne als auch der Hüftkopf durch Implantate mit dem Ziel der Schmerzlinderung und der Verbesserung der Gelenkfunktion ersetzt.

2011 sind in Deutschland insgesamt 230.000 Operationen zum Hüftgelenkersatz durchgeführt worden. Ein relativer Anstieg der Fallzahlen von 11% (+ 15300 Eingriffe) in den Jahren 2005 bis 2011 ist mit der demographischen Struktur der Bevölkerung, der steigenden Lebenserwartung sowie der Verbesserung der Implantate und der Operationstechnik zu erklären. Zusätzlich zum Anstieg der allgemeinen Fallzahlen an Hüftoperationen von 2005 bis 2011 stieg zeitgleich die Anzahl der Prothesenwechsel. Mit einer Zunahme von 22% (+ 4300 Eingriffe) machen sie den relativ größten Teil des Zuwachses an Hüftoperationen aus⁶.

Ein wichtiger Parameter für ein gutes funktionelles Outcome ist die Intaktheit der beckenstabilisierenden Muskulatur, besonders des Musculus gluteus medius (GM). Vor allem beim transglutealen (lateralen) Zugang kommt es zu einer Schädigung durch die notwendige iatrogene Inzision des GM⁷⁻⁹. Dieser Zugang ist in Europa weit verbreitet, da er eine geringe Inzidenz von postoperativen Dislokationen sowie eine gute Darstellung des Acetabulum und des proximalen Femur für den Gelenkersatz ermöglicht⁷. Posttraumatisch beginnt das Muskelgewebe sich über ein intrinsisches Reparatursystem zu regenerieren. Nichtsdestotrotz können bei einem insuffizienten

Heilungsprozess des GM eine Schwäche der Hüftabduktion mit Trendelenburgzeichen, Einschränkungen des Gangbildes und peritrochantäre Schmerzen folgen ^{7,10-12}. Im Jahr 2001 beschrieben Demos et al. ¹³ ein Auftreten von postoperativem Hinken von 11,6% bei 1333 behandelten Patienten mit einer primären Endoprothese. Eine Dislokation der Endoprothese wurde hingegen nur mit einer Inzidenz von 0,4% angegeben. Dies liegt deutlich unterhalb der Inzidenz einer Dislokation von 1-5%, die bei einem posterioren Zugang angegeben wird ⁸. Laut von Roth et al. ¹ kann der bei einer Primäroperation entstandene Defekt des GM zum Teil gut kompensiert werden und klinisch unauffällig bleiben. Jeder weitere Eingriff aufgrund von Revisionen erhöht jedoch den Schaden, und es kommt zunehmend zu einer sichtbaren makroskopischen fettigen Atrophie und funktionellen Einschränkungen ¹. In Anbetracht der steigenden Fallzahlen an Primär- und Wechseloperationen ist die Umsetzung einer Defektminimierung von besonderer Bedeutung.

Um den iatrogen erzeugten Schäden entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche minimal invasive Zugangswege beschrieben, die schonender für die Weichteile sein sollten ¹⁴⁻¹⁶. Der Effekt auf die Glutealmuskulatur wurde in mehreren Studien diskutiert ^{9,17,18}. In der Studie von Meneghini et al. ¹⁷ entstand beim posterioren Zugang zur HTEP bei Kadavern ein Schaden des Musculus gluteus minimus von 18%, beim minimalinvasiven anterioren Zugang nach Smith-Petersen von 8%. Van Oldenrijk et al. ¹⁸ zeigten 2010 in ihrer Kadaverstudie eine Überlegenheit des minimal invasiven anterioren Zugangs im Bezug auf die Verletzung des GM. Andere minimal invasive Zugangswege, die ebenfalls in der Studie von Van Oldenrijk et al. untersucht wurden, wie der 2-Incision Eingriff nach Berger/ Duwelius, lieferten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum konventionellen lateralen Zugang ¹⁸. Auch Müller et al. ⁹ konnten in einer randomisierten klinischen Studie eine funktionelle und morphologische Überlegenheit eines minimal invasiven anterolateralen Zugang im Vergleich zu einem modifizierten transglutealen Zugang nachweisen. In der Analyse von Magnetresonanztomographie- (MRT) Aufnahmen zeigte sich sowohl nach 3 als auch nach 12 Monaten beim minimalinvasiven anterolateralen Zugang eine signifikant geringere fettige Atrophie des anterioren Anteils des GM. Zudem ließ sich nach 12 Monaten eine verminderte Inzidenz von Trendelenburgzeichen nachweisen.

Kritiker minimal invasiver Zugangsmethoden befürchten die Zunahme anderer intra- und postoperativer Komplikationen, welche den klinischen Nutzen einschränken. Unter anderem wird durch die erschwerte Einsehbarkeit anatomischer Landmarken von einer

schwierigen Implantationspositionierung mit Implantatfehlagen berichtet¹⁹⁻²¹. Graw et al.²² beschrieben sogar ein höheres Transplantatversagen und frühere Revisionseingriffe unter minimal invasiver Implantationstechnik. Weitere beschriebene Komplikationen sind, neben Trochanterfrakturen, Druckschäden der Haut und Nerven durch Kompression der Retraktoren^{18,21,23,24}. So werden beispielsweise beim anterioren Zugangsweg vor allem der N. cutaneus femoris lateralis und beim anterolateralen Zugang der N. gluteus superior geschädigt^{18,24}. Woolson et al.²¹ berichteten bei Anwendung eines minimal invasiven Zugangs von vermehrten Wundinfektionen der Haut mit Staphylokokken, die mit zusätzlicher intravenöser Antibiose und chirurgischen Maßnahmen therapiert werden mussten.

Eine weitere Option, den Muskelschaden während der Hüftoperationen gering zu halten, ist die Unterstützung des intrinsischen Reparatursystems des Skelettmuskelgewebes.

3.2 Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur besitzt eine beachtliche Regenerationskapazität und kann im Zuge eines Traumas durch das Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen eine Selbstheilung einleiten. Unabhängig von der Art der Muskelverletzung (mechanisch, thermisch, chemisch) läuft der Heilungsprozess allgemein in drei Phasen ab: I) Degeneration/ Inflammation, II) Reparatur und Regeneration und III) Remodelling. Die einzelnen Phasen sind eng miteinander verbunden und überlappen sich gegenseitig^{25,26} (Abb. 1A). Durch das Zerreißen der Zellstrukturen der Muskelfasern (speziell der Zellmembran und der Basallamina) sowie der versorgenden Gefäße kommt es zu einer Nekrose sowie zur Hämatombildung im geschädigten Bereich. Direkt nach Verletzung verhindert ein sogenanntes „Kontraktionsband“, bestehend aus kondensiertem Zytoskelett, dass sich die Schädigung auf die gesamte Länge der Muskelfasern ausbreitet²⁵. Der Riss der Kapillaren sowie die Ausschüttung chemotaktischer Reize (z.B. Wachstumsfaktoren, Interleukine) bewirken die Mobilisation von Zellen des Immunsystems aus dem Blut in das Traumaareal. In den ersten 24 Stunden ist der Anteil der neutrophilen Granulozyten am größten, bis ihre Anzahl sinkt und anschließend vor allem myeloide Zellen (z.B. Makrophagen) und T-Lymphozyten vorhanden sind^{26,27} (Abb. 1B).

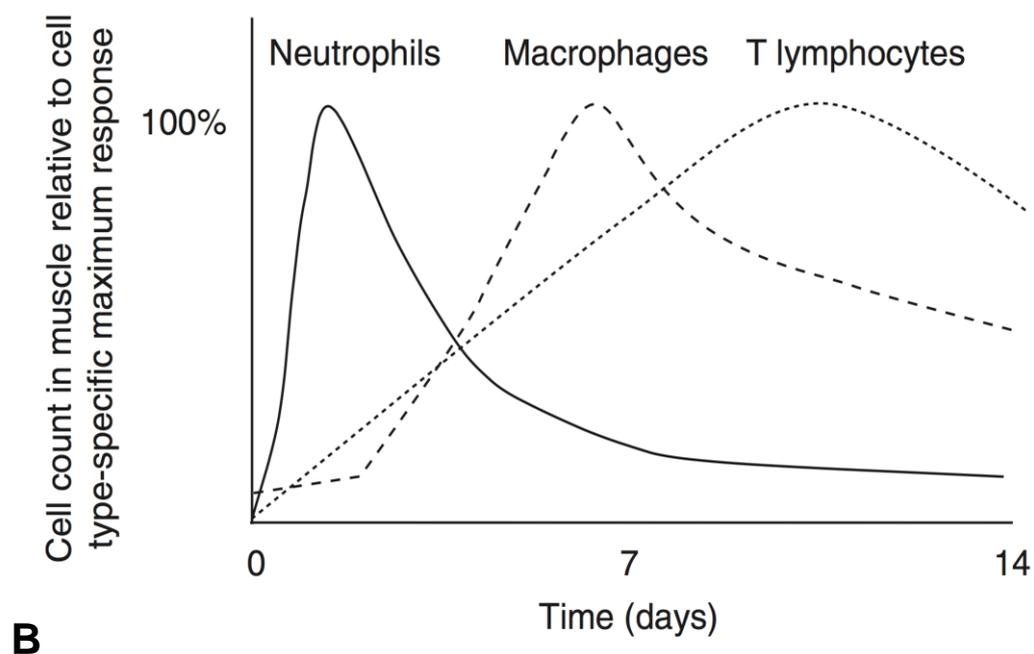
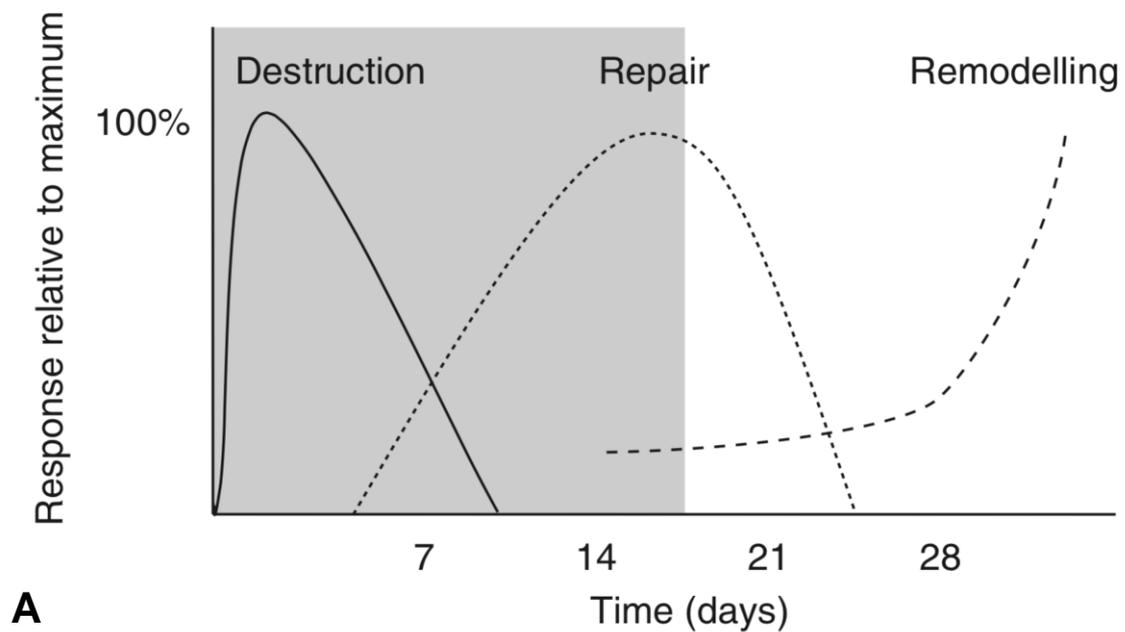


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf A) der einzelnen Phasen der Muskelregeneration sowie B) der immunologischen Zellen angegeben mit dem jeweiligen Maximum zu bestimmten Zeitpunkten aus Smith et al. (2008)²⁶.

Den Makrophagen und T-Lymphozyten wird in der komplexen Muskelregeneration eine entscheidende Rolle zugeordnet. Schon die Untersuchung von Lescaudron et al.²⁸ zeigte 1999 die enorme Bedeutung der Makrophagen für die Regeneration der Skelettmuskulatur. So verhinderte eine Depletion von Makrophagen die Regeneration von traumatisierter Tibialismuskulatur im Mausmodell²⁸. Während der

Muskelregeneration sind die Makrophagen neben der Phagozytose von nekrotischem Gewebe auch simultan an der Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt. Der pro-inflammatorische M1-Subtyp stimuliert zum Beispiel die Freisetzung des Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6). Diese haben neben der Aufrechterhaltung der Inflammation einen proliferationsfördernden Effekt auf ruhende Satellitenzellen, der wichtigsten Zellpopulation für die Genese neuer Muskelfasern. Für die Reparaturphase ist ein Phänotypenwechsel der Makrophagen von M1 zu M2 nach ungefähr einer Woche essentiell. Die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen setzen die Interleukine IL-4 und IL-10 frei und induzieren eine Differenzierung von Satellitenzellen über Myoblasten zu Myotuben^{29,30}.

Die T-Lymphozyten, die das verletzte Gewebe ebenfalls posttraumatisch infiltrieren, beeinflussen die Muskelregeneration über verschiedene Mechanismen. Die CD4+ regulatorischen T-Zellen (Treg) sind diesbezüglich am ausführlichsten untersucht^{31,32}. Zum einen modulieren sie den beschriebenen Phänotypenwechsel der Makrophagen³¹. Zum anderen wird auch eine Regulation anderer infiltrierender T-Zellpopulationen beschrieben. So führte im Mausmodell von Burzyn et al.³² eine iatrogen erzeugte Depletion von Treg zu einem Anstieg anderer T-Zellen im Gewebe, z.B. CD8+ Zellen, die möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Muskelregeneration haben. Darüber hinaus beschrieben Burzyn et al.³² eine direkte Wirkung der Treg auf die Satellitenzellen und deren Funktion. Als mögliche Ursache der Beeinflussung der Satellitenzellen vermuteten sie die Expression des Wachstumsfaktors Amphiregulin von Treg.

Die Bildung neuer Muskelfasern durch Satellitenzellen prägt die Reparaturphase. Mauro et al.³³ identifizierten 1961 erstmals die mononukleären Satellitenzellen als muskelspezifische Stammzellen, die zwischen der Basallamina und dem Sarkolemm der Muskelfasern lokalisiert sind. Dort befinden sie sich in einem mitotisch inaktiven Ruhezustand (reversibler G0-Zustand). Ruhende Satellitenzellen sind vor allem durch die Expression der „paired box transcription factor family“ (Pax7) charakterisiert³⁴. Durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Reize bei einem Trauma können die Satellitenzellen wie oben beschrieben aktiviert werden. Zum einen gibt es eine determinierte Subpopulation der Satellitenzellen, die sich direkt zu Myoblasten differenziert. Zum anderen existiert eine weitere Subpopulation, die eher durch Proliferation den Zellpool an verfügbaren Satellitenzellen aufrecht hält.³⁵ Kontrolliert

wird dies über mehrere myogene Regulationsfaktoren (MRF) wie Myf5, MyoD, Myogenin und MRF4³⁶. Beispielsweise ergaben die Untersuchungen von Kuang et al.³⁶, dass nur 10% der Satellitenzellen nie den myogenen Faktor Myf5 exprimieren, aber speziell diese Myf5⁻ Zellen das Reservoir an Satellitenzellen durch Proliferation erhöhen. Die Transkriptionsfaktoren Myogenin und MRF4 hingegen sind eher für die Differenzierung zu Myoblasten und der Aufrechterhaltung der terminal differenzierten Zellen verantwortlich³⁷. Innerhalb weniger Tage fusionieren die Myoblasten untereinander und mit den bereits bestehenden Muskelfasern zu mehrkernigen Muskelfasern, die charakteristischer Weise noch zentralständige Kerne aufweisen^{35,38}. Während der weiteren Reifung der Muskelfasern mit der Ausbildung neuer funktionsfähiger kontraktile Elemente erfolgte die Wanderung der Zellkerne in die Peripherie³⁸. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der einzelnen Phasen der Regeneration mit einigen typischen Transkriptionsfaktoren³⁹.

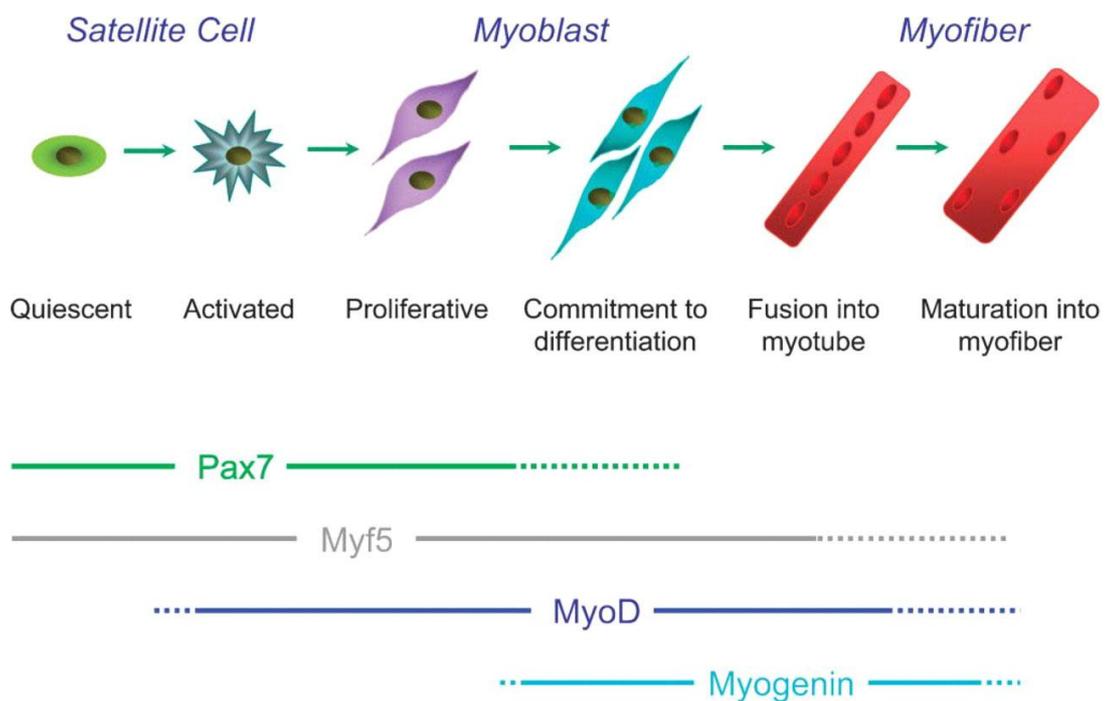


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Myogenese und typische Marker für die einzelnen Phasen, modifiziert aus Zammit et al. (2006)³⁹.

Neben den Satellitenzellen gibt es noch weitere Zellarten mit myogenem Potential, die Einfluss auf die Muskelregeneration haben. Darunter zählen unter anderem endotheliale Zellen (z.B. Perizyten), interstitielle Muscle Derived Stem Cells oder mesenchymale Stromazellen (MSC)⁴⁰. So zeigten Dellavalle et al.⁴¹, dass die

ortsständigen Perizyten, die sich unter der Basallamina von kleinen Gefäßen der Skelettmuskulatur befinden und zur deren Stabilität beitragen, spontan und mit hoher Effizienz Muskelfasern bilden können, begleitet von einer Expressierung der myogenen Faktoren Myf5 und MyoD. Zu den interstitiellen Muscle Derived Stem Cells gehören unter anderem die sich in der Nähe von Gefäßen aufhaltenden Side Population Cells mit stammzellähnlichen Charakteristika. In Ko-Kulturen mit Myoblasten ließen sich bei diesen Zellen myogene Differenzierungseigenschaften aufweisen, die eine Muskelregeneration unterstützen⁴². Zusätzlich zu den ortsständigen Zellen können auch Zellen aus dem Knochenmark wie die mesenchymalen Stromazellen infolge eines Traumas aktiviert und über die Blutbahn aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Der Einfluss von mesenchymalen Stromazellen wird unter 3.3.6 weiter vertieft.

Die Remodellingphase ist charakterisiert durch die Reorganisation der neugebildeten Muskelfasern mit der extrazellulären Matrix (ECM), der Reinnervation und der Revaskularisierung (Angiogenese)⁴³. Järvinen et al.⁴⁴ beschrieben bereits 1993 das Aussprossen neuer Kapillaren im Traumaareal als ein erstes morphologisches Zeichen in den ersten 5 Tagen in der frühen Remodellingphase. Vergleichbar datierten Winkler et al.⁴⁵ in ihrer Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Muskelregeneration die Gefäßneubildung ab Tag 4 nach einem Crushtrauma im Rattenmodell. Zum einen ist die Revaskularisierung von entscheidender Bedeutung für Sauerstoff- und nutritive Versorgung der sich regenerierenden Muskelfasern. Zum anderen unterstützen die neu gebildeten Endothelzellen die Myogenese direkt bzw. durch die Mobilisation von wichtigen inflammatorischen Zellen⁴⁶. Eine Triggerung erfolgt über verschiedene Zytokine, von denen der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wahrscheinlich am häufigsten untersucht wurde^{46,47}.

Die Fibroseentwicklung, definiert als übersteigerte Proliferation der ECM, ist häufig der limitierende Faktor einer kompletten Regeneration⁴⁸. Im Rahmen eines Muskeltraumas bewirkt der Mediator Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) die Entwicklung von Myofibroblasten⁴⁹. Zunächst synthetisieren diese die Proteine Fibronectin und Tenascin C, gefolgt von Kollagen I und III. Bei akuten und kleineren Verletzungen (beispielsweise leichten „Muskelzerrungen“) verschwinden die Myofibroblasten durch Apoptose nach der Wundheilung wieder. Kommt es jedoch zu einer andauernden Inflammation im Zuge von schweren Muskeldefekten, persistieren die Myofibroblasten und produzieren weiterhin extrazelluläres Material, vor allem Kollagen I⁵⁰. Es resultiert fibrotisches Narbengewebe, welches eine mechanische Barriere für sich

regenerierende Muskelfasern darstellt²⁵. Zudem verursacht die Fibrose eine reduzierte Elastizität des Muskels, was erneute Verletzungen hervorrufen kann⁵¹.

3.3 Aktuelle Therapieansätze

Derzeit gestaltet sich die Therapie von Muskelverletzungen als problematisch. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Therapien, die eine vollständige Regeneration der Skelettmuskulatur mit Restitutio ad integrum ermöglichen. Im Folgenden werden dennoch aktuell im klinischen Einsatz befindliche sowie experimentelle Maßnahmen beschrieben, welche die intrinsische Regenerationsfähigkeit unterstützen und die entstandenen Schäden begrenzen sollen.

3.3.1 RICE-Schema

Als sofortige Therapie eines akuten Muskeltraumas nutzt man heute die Prinzipien des RICE-Schemas. Dieses Akronym setzt sich aus folgenden Methoden zusammen: Rest (Ruhigstellung), Ice (Kühlung), Compression (Kompression) und Elevation (Hochlagern)⁵². Ziel dieses konservativen Vorgehens ist die Minimierung der Hämatombildung. Obwohl es aktuell keine randomisierte kontrollierte klinische Studie zu deren Effizienz gibt, wurde der Nutzen der einzelnen Komponenten in Studien untersucht^{44,53-57}. Eine Immobilisation soll die Retraktion der zerrissenen Muskelfasern reduzieren und somit neben der Verringerung des Bluteinstroms auch die Narbenbildung eingrenzen⁵⁵. Allerdings empfehlen einige Studien nur die Anwendung kurzer Immobilisation, da eine frühe Mobilisation den Regenerationsprozess in ihren Beobachtungen vergleichsweise verbesserte^{44,53}. Für die Anwendung kühlender Maßnahmen besteht keine einheitliche Meinung. 2007 wurde in einer Studie von Schaser et al.⁵⁴ in einem Rattenmodell die Oberschenkelmuskulatur nach einem geschlossenen Muskeltrauma analysiert, die therapeutisch eine Kühlung der Hautoberfläche auf 8° C für sechs Stunden erhielt. Im Vergleich zu der nicht gekühlten Kontrollgruppe kam es nach 24 Stunden zu geringeren intramuskulären Drücken, einer verminderten Infiltration mit Granulozyten und einem kleineren Nekroseareal. Die Kapillardichte und -funktionalität war zusätzlich in der gekühlten Gruppe erhöht. Daher gingen Schaser et al. von einem Nutzen der Kryotherapie für die Mikrozirkulation und die Inflammation am Rattenmodell aus⁵⁴. Takagi et al.⁵⁶ empfehlen hingegen den Verzicht einer Kühlung aufgrund ihrer histologischen Untersuchungen im Rattenexperiment im Jahr 2011. Die Kühlung auf

10°C Hauttemperatur mittels Kühlpacks verursachte ebenfalls eine verminderte Infiltration von inflammatorischen Zellen, speziell Leukozyten und Makrophagen. Langfristig führte dies jedoch zu einer verzögerten Aktivierung der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen sowie zu einer vermehrten Bildung von kollagenhaltigem Bindegewebe nach 28 Tagen⁵⁶.

Zur Kompression einer Muskelverletzung existieren derzeit wenige Studien. Thorsson et al.⁵⁷ untersuchten in einer prospektiven Studie eine Kompression mit einer Bandage für maximal 5 Minuten an 40 Athleten mit einem Muskeltrauma der unteren Extremität. Hierbei kam es zu keiner signifikanten Reduzierung des Hämatoms sowie der Zeit bis zur vollständigen funktionellen Erholung. Auch die mögliche Entwicklung eines Kompartmentsyndroms macht den klinischen Nutzen zweifelhaft⁵⁸.

Das Hochlagern der Extremität nach einem Muskeltrauma wurde in keiner Studie als alleiniges Therapieregime untersucht, beruht aber auf der physiologischen Beobachtung, dass durch den geringeren hydrostatischen Druck der Gewebedruck und die Ödembildung minimiert wird. Trotz mangelnder Evidenz positiver Ergebnisse unter der Therapie des RICE-Schema für die Regeneration der Skelettmuskulgewebe wird sie aufgrund mangelnder Alternativen weiterhin im klinischen Alltag angewendet und empfohlen⁵².

3.3.2 Hyperbare Sauerstofftherapie

Bei der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBOT) wird medizinisch reiner Sauerstoff (100%) unter erhöhtem Umgebungsdruck verwendet. Sie gilt als vielversprechende Methode für die Unterstützung der Muskelheilung aufgrund positiver Ergebnisse unter anderem bei Dehnungsverletzungen der unteren Extremität⁵⁹. Auch ein Effekt auf die Satellitenzellproliferation und die myogene Differenzierung unter Hochregulation von MyoD, Myogenin und des Insulin like Growth Factors 1 (IGF-1) konnte unter HBOT festgestellt werden⁶⁰. Eine Metaanalyse über neun randomisierte Studien zu geschlossenen Weichteilteilverletzungen und der Delayed onset muscle soreness (DOMS) konnte allerdings keinen Nutzen der HBOT für Muskelverletzungen nachweisen. Für leichtere Verletzungen wie DOMS kann es sogar zur vermehrten Schmerzentwicklung kommen⁶¹. Möglicherweise besitzt die HBOT erst bei schwereren Verletzungsarten wie einem Crushtrauma einen therapeutischen Nutzen⁶².

3.3.3 Therapeutischer Ultraschall

Die Anwendung von Ultraschall für Muskelverletzungen ist in der Orthopädie und Unfallchirurgie weit verbreitet, obwohl es wenig evidenzbasierte Daten zu deren Wirksamkeit gibt. Ein proliferierender Effekt auf Satellitenzellen konnte im Tierexperiment zwar nachgewiesen werden, aber keine weiteren morphologischen Belege für eine bessere Muskelregeneration⁶³. Auch bei Kontusionsverletzungen von Athleten verbesserte die angewandte Ultraschalltherapie nicht die Genesung⁶⁴.

3.3.4 Anti-inflammatorische Pharmakotherapie

3.3.4.1 Nicht steroidale Antirheumatika

Nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) sind gängige Medikamente zur Schmerztherapie in der Sportmedizin. Sie beruhen auf der Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX), wodurch die Prostaglandinsynthese gestört wird. Durch deren anti-inflammatorische Wirkung wurde neben der Analgesie ein modulierender Effekt auf den Heilungsprozess von Muskeltraumata vermutet. Paulsen et al.⁶⁵ untersuchten 2010 in einer klinischen Studie placebokontrolliert den Einfluss von Celecoxib (COX-2-Hemmer) nach exzentrischer Muskelbelastung und konnten im Vergleich zu Placebo keine verbesserte Regeneration im Bezug auf Muskelfunktion oder morphologischen Parameter (Inflammation in Muskelbiopsie) feststellen. Lindern ließ sich allein der Muskelschmerz. Andere Studien zeigten zwar einen anfänglichen Nutzen in funktionellen und histologischen Untersuchungen nach einer Woche, die Langzeitergebnisse ergaben jedoch eine Verschlechterung der Muskelregeneration⁶⁶⁻⁶⁸. Dies unterstützt die oben diskutierte Annahme, dass die Inflammation für eine Heilung des Muskels erforderlich ist. Shen et al.⁶⁸ sowie Bondesen et al.⁶⁹ postulieren, dass speziell der COX-2 Weg notwendig für die frühe Phase der Muskelregeneration und somit die Anwendung von einigen NSAR zur regenerationsfördernden Zwecken ungünstig ist. In-vivo und In-vitro Untersuchungen von Shen et al. zeigten beispielsweise eine verminderte Proliferation und Differenzierung von myogenen Vorläuferzellen und auch eine verzögerte Reifung der Muskelfasern in der Histologie unter der COX-2-Hemmung⁶⁸. Somit ist zwar der Nutzen der NSAR zur Analgesie weiterhin gegeben, zur Unterstützung der Regeneration jedoch kritisch zu evaluieren.

3.3.4.2 Steroide

Speziell die als „Stresshormone“ bekannten Glukokortikoide sind Gegenstand der Forschung. Analog zu den NSAR haben sie eine anti-inflammatorische Wirkung und werden daher vielfach in der Medizin bei Entzündungsreaktionen eingesetzt. In einer tierexperimentellen Studie konnten Hakim et al. ⁷⁰ bei einmaliger Gabe von Dexamethason in geschädigte Tibialis anterior Muskulatur der Ratte zeigen, dass nach kurzer Zeit eine vergrößerte Muskelkraft und ferner eine Reduzierung von Interleukin-1 β und TGF- β 1, wichtige Botenstoffe in der Pathogenese der Narbenbildung, resultieren. Selbst nach drei Wochen ließen sich keine negativen Auswirkungen feststellen.

In einer ähnlichen Studie konnten Beiner et al. ⁷¹ zwei Tage nach einer Applikation von Methylprednisolon im Kontusionsmodell der Ratte ebenfalls eine signifikante Kraftsteigerung gegenüber einer Kontrollgruppe nachweisen. Die Langzeituntersuchungen führten interessanterweise zu umgekehrten Resultaten. Neben einer reduzierten Muskelkraft kam es nach 14 Tagen zudem zu einer histologischen Degeneration des Muskels und der Gewebearchitektur bei der mit Methylprednisolon behandelten Tiergruppe ⁷¹. Dies ähnelt den Beobachtungen der Langzeitergebnisse bei Anwendungen der anti-inflammatorischen NSAR wie unter 3.3.4.1 beschrieben. Relevante Studien über klinische Anwendungen und deren langfristigen Folgen fehlen derzeit.

3.3.5 Anti-fibrotische Pharmakotherapie

Da eine überschüssige Fibroseentwicklung zu Beeinträchtigungen der funktionellen Genesung führt, wurden verschiedene Substrate auf deren Verwendung zur Muskelregeneration hin überprüft. Dabei konzentrierte man sich zum Beispiel auf die Zytokine TGF- β 1 sowie Myostatin und deren Signalwege in der Pathogenese der Fibrose. Das Protein Myostatin gehört ebenfalls zur TGF- β 1-Familie und stimuliert die Proliferation von Myofibroblasten und somit die Bildung von ECM. Eine iatrogene Depletion der Myostatin-Gene kann hingegen eine Muskelhypertrophie hervorrufen ⁷². Das Heparinanalogen Suramin konnte in-vitro die Proliferation von Fibroblasten durch eine Antagonisierung von TGF- β 1 und Myostatin hemmen ⁷³. Die dazu durchgeführte in-vivo Untersuchung an geschädigter Gastrocnemiusmuskulatur zeigten sowohl eine reduzierte Fibrose als auch eine Verbesserung der Kontraktionskraft ^{73,74}. Neuere Studien zu dem Heparinanalogen wurden nicht mehr publiziert. Auch das Proteoglykan

Decorin interagiert mit TGF- β 1 und vermag die überschüssige Kollagenproduktion zu hemmen^{75,76}. Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, die üblicherweise in der Therapie des arteriellen Hypertonus eingesetzt werden, weisen ebenfalls ein vielversprechendes anti-fibrotisches Potential auf. Bereits in der Untersuchung am Myokard, der Leber und der Lunge verminderten die Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten die Fibrose und verbesserten die Organfunktion in tierexperimentellen Studien⁷⁷⁻⁷⁹. In der Therapie des Skelettmuskeltraumas reduzierte das relativ nebenwirkungsarme Losartan im Mausmodell über die Deletion von Myostatin das Fibroseareal. Zusätzlich war die mit Losartan behandelte Tiergruppe in den funktionellen Kraftmessungen der Kontrollgruppe überlegen^{80,81}. Klinische Anwendungen der anti-fibrotischen Pharmaka zur Therapie des Musktraumas existieren derzeit nicht.

3.3.6 Zelltherapie

Im Bereich der regenerativen Medizin hat die Zelltherapie in den letzten Jahrzehnten viel Aufmerksamkeit gewonnen. Mithilfe einer zellbasierten Therapie soll einerseits der gewebespezifische Zellpool erweitert werden, andererseits sollen durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die komplexen Abläufe der Regeneration unterstützt werden. Die Flexibilität der Zellen, sich dem ausgesetzten Milieu anzupassen und lokal individuell über verschiedene Mechanismen zu wirken, macht sie im Vergleich zur einfachen Pharmakotherapie sehr attraktiv.

Die Population der Satellitenzellen als Hauptakteure bei der Regeneration von Muskelfasern ist derzeit wohl am besten untersucht. Beindruckend sind die Ergebnisse von Sacco et al.⁸², die 2008 zeigen konnten, dass bereits die Transplantation einer einzelnen Satellitenzelle im Mausmodell über ein ausreichendes therapeutisches Potential für die Entstehung neuer Muskelfasern und Satellitenzellen verfügt. Für große Muskelschäden benötigt man hingegen wahrscheinlich eine große Anzahl an Satellitenzellen, sodass eine Kultivierung ex-vivo nötig wäre. Die Studie von Montarras et al.⁸³ fand diesbezüglich heraus, dass unglücklicherweise die ex-vivo Expansion von Satellitenzellen ihr regeneratives Potential reduziert. Weitere Limitationen für die Transplantation von Satellitenzellen sind beispielsweise deren hohe Heterogenität oder das mangelnde Überleben im Empfängergewebe^{84,85}.

Wie in Abschnitt 3.2 erwähnt, haben neben Satellitenzellen noch weitere Zelllinien Einfluss auf die Muskelregeneration⁴⁰. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde hierbei

die Rolle der MSC zunehmend vielseitig untersucht. Diese erstmalig in den 1960er Jahren von Friedenstein et al.⁸⁶ im Knochenmark entdeckten multipotenten nicht-hämatopoetischen Zellen sind fähig zur osteogenen, chondrogenen, adipogen und myogenen Differenzierung⁸⁶⁻⁸⁸. Die genaue Charakterisierung der MSC beinhaltet nach der International Society for Cellular Therapy (ISCT) neben den Differenzierungseigenschaften ihre Plastikadhärenz und eine Reihe von Oberflächenmarkern. Mindestens 95% der MSC Population müssen positiv für die Marker CD105, CD73 und CD90 sein. Negativmarker sind CD45 (Leukozyten), CD34 (Hämatopoetische Progenitorzellen und Endothelzellen), HLA-DR (Histokompatibilitätskomplex), CD14 oder CD11b (Makrophagen und Monozyten) und CD79a oder CD19 (B-Zellen)^{89,90}.

Für Forschungszwecke werden die MSC bisher überwiegend aus dem Knochenmark isoliert⁹¹. Ferrari et al.⁸⁸ gelten heute als Vorreiter in der Anwendung von Knochenmarkszellen zur Muskelregeneration. Sie transplantierten 1998 erstmals Stammzellen aus dem Knochenmark in Cardiotoxin geschädigte Muskulatur der Maus und konnten eine myogene Differenzierung und eine Regeneration defekter Muskelfasern feststellen. Eine durch Cardiotoxin ausgelöste Myolyse entspricht leider nur wenig der klinischen Realität eines Muskeltraumas. Daher entwickelte die Arbeitsgruppe von Matziolis et al.⁹² 2006 ein mechanisches Traumamodell für ihre Untersuchungen von MSC und deren Wirksamkeit in der Muskelregeneration. Nach einem offenen Crushtrauma des Musculus soleus bei Sprague Dawley Ratten erhöhten autolog transplantierte MSC die Kontraktionskraft nach tetanischer und fast-twitch Stimulation⁹². Mit der Intention einer späteren klinischen Studie folgten weitere Untersuchungen zu den aus dem Knochenmark stammenden mesenchymalen Stammzellen (BMMSC) im selben Traumamodell^{45,93-95}. In einer Studie zur Überprüfung einer dosisabhängigen Wirkung der BMMSC kam es bei zunehmender Anzahl an injizierten Zellen zu einer Steigerung der Kontraktionskraft gemäß einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Dosierungen verglichen (0, 10^5 , 10^6 , $2,5 \times 10^6$, 10^7)⁹⁴.

Neben der richtigen Dosierung vermuteten Winkler et al.⁹⁵, dass auch der Transplantationszeitpunkt von großer Bedeutung sei. Aufgrund der initialen Inflammation während der Muskelregeneration nahmen sie an, dass es bei einer unmittelbaren Transplantation von BMMSC nach dem Muskeltrauma zu einer Abräumung der BMMSC durch Makrophagen und einer Minderung des therapeutischen

Effekts kommen würde. Entgegen dieser Hypothese führte auch die sofortige Transplantation von BMMSC in die geschädigte Soleusmuskulatur in ihrer Studie zu einer wirksamen Kraftsteigerung. Im Vergleich zu einer Transplantation nach einer Woche konnte kein Unterschied festgestellt werden. Der Effekt der BMMSC zum frühen Transplantationszeitpunkt wurde hierbei in den anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften auf die frühe Entzündungsphase im Regenerationsprozess geschädigter Muskulatur vermutet⁹⁵.

Obwohl MSC die Fähigkeit zur myogenen Differenzierung besitzen und auch Fusionen mit bestehenden Muskelfasern beschrieben wurden^{88,96}, werden die positiven Einflüsse aktuell eher den parakrinen trophischen Faktoren und der Beeinflussung des Mikromilieus zugeschrieben⁹⁷⁻¹⁰¹. Bereits 2004 vermuteten Natsu et al.⁹⁷ aufgrund fehlender Fusionsereignisse von transplantierten und mit green fluorescent protein (GFP) markierten BMMSC mit bestehenden Muskelfasern in traumatisierter Tibialismuskulatur, dass andere Wirkmechanismen dieser Zellreihe die positiven Effekte in der Regulation des Skelettmuskelgewebes verursachen. Daraufhin folgten zahlreiche Studien, die zeigten, dass MSC fähig sind, unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sezernieren, welche die Regeneration auf verschiedene Weise unterstützen: z.B. Unterstützung der Neovaskularisation über VEGF oder der Modulierung der ECM mit der Minderung der Fibrose über den Hepatocyte Growth Factor oder Adrenomedullin⁹⁹. Zusätzlich findet ein Crosstalk der MSC mit Immunzellen wie den Makrophagen und T-Zellen statt, der den Heilungsprozess ebenfalls günstig beeinflusst^{99,101}.

3.3.6.1 Mesenchymale Stromazellen der Plazenta

Ungeachtet der Tatsache, dass das Knochenmark als Goldstandard für eine Isolierung der MSC gilt, ist dies auch aus anderen Geweben wie Fett¹⁰², Muskel¹⁰³, Blut¹⁰⁴ oder der Plazenta¹⁰⁵ möglich. Die Gewinnung der MSC ist üblicherweise mit einem invasiven Eingriff verbunden. Beispielsweise wird beim Knochenmark Gewebe mittels Punktionsnadel aus dem Beckenkamm entnommen. Plazentagewebe bildet dabei eine Ausnahme. Im klinischen Alltag wird die Plazenta meist ohne weiteren Nutzen als medizinischer „Abfall“ nach einer Geburt entsorgt. Somit steht sie nach einer Geburt ohne zusätzliche Interventionen frei zur Verfügung. Das macht sie zu einer interessanten alternativen Ressource für die Zelltherapie. Im Gegensatz zur autologen

Transplantation von BMMSC haben plazentare mesenchymale Stromazellen (PMSC) zudem den Vorteil einer allogenen Nutzung. Eine sowohl zeit- als auch kostenaufwendige Isolierung aus dem Knochenmark entfällt und eine Transplantation „on demand“ ist realisierbar. Speziell bei akut auftretenden Verletzungen (z.B. Sportverletzungen, Polytrauma) käme eine autologe Zelltherapie an ihre Grenzen. Barlow et al.¹⁰⁶ verglichen die Zellcharakteristika, das Wachstumsverhalten und die in-vivo Toxizität nach intravenöser Applikation der Maus von BMMSC mit PMSC. In Bezug auf Morphologie, Größe, phänotypische Oberflächenmarker der MSC und mesodermaler Differenzierungseigenschaften zeigten PMSC und BMMSC ähnliche Ergebnisse. PMSC wiesen sogar ein robusteres Wachstum unter kontrollierten Kulturbedingungen auf. Weder die BMMSC noch die PMSC erzeugten eine akute toxische Reaktion nach der intravenösen Gabe verschiedener Dosen (Normaldosis: 1×10^6 Zellen/kg; Hochdosis: 1×10^7 Zellen/kg)¹⁰⁶. Von der Plazenta selbst können die MSC unterschiedlichen Ursprungs sein: sie entstammen den fetalen Membranen (Amnion, Chorion)^{105,107}, der maternalen Dezidua¹⁰⁵ oder auch der Nabelschnur¹⁰⁸. PMSC besitzen wie andere MSC trophische sowie immunmodulatorische Eigenschaften und wurden kürzlich in verschiedenen präklinischen Studien unterschiedlicher medizinischer Fachdisziplinen auf ihre regenerationsfördernden Eigenschaften hin untersucht¹⁰⁹⁻¹¹². Im Bereich der Angiologie führte 2015 in der Untersuchung von Francki et al.¹¹¹ die intramuskuläre Applikation von PMSC zur Therapie einer iatrogenen Hinterlaufischämie im Tierexperiment (Maus und Ratte) zu einem Anstieg der Gefäßdichte und des Blutflusses im Musculus quadriceps. Zhang et al.¹¹² untersuchten 2014 in einer ähnlichen Studie zur Hinterlaufischämie am Mausmodell funktionelle und immunologische Veränderungen unter Applikation von PMSC. Zum einen verbesserte sich das Laufverhalten unter der Zelltherapie, zum anderen konnte in ELISA-Analysen aus Muskellysat ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil mit hohen Spiegeln von IL-10 und niedrigen Konzentrationen von IL-6 und TNF- α nachgewiesen werden¹¹². In einer Stroke-Studie von 2013 aus der Arbeitsgruppe von Chen et al.¹⁰⁹ hatte eine intravenöse Gabe von PMSC nach einer induzierten zerebralen Ischämie im Rattenmodell beachtliche neuroprotektive Effekte. In dieser Studie kam es durch die Zelltherapie zu einem Anstieg von protektiven Zytokinen für die Regeneration wie VEGF, Brain Derived Neurotrophic Factor, Hepatocyte Growth Factor und damit zu einer Reduzierung der Apoptose.

In einer kardiologischen Studie zur chronischen Herzinsuffizienz von Chen et al. ¹¹⁰ von 2015 verbesserten PMSC die ventrikuläre systolische und diastolische Funktion und zeigten auch in morphologischen Analysen eine Reduzierung der Fibrose.

Gleichermaßen sind für die Nutzung von PMSC bei Muskelschäden bereits Studien publiziert. Arakawa et al. ¹¹³ prüften, inwiefern aus Chorionzotten isolierte PMSC ein myogenes Potential besitzen. In ihrer Studie zeigten diese die Eigenschaft einer Differenzierung zu Myotuben unter Hochregulierung der myogenen Marker MyoD, Myogenin, Desmin und auch Dystrophin. Dies ließ die Arbeitsgruppe vermuten, dass PMSC potentiell für Studien zur Regeneration der Skelettmuskulatur geeignet sind ¹¹³. Grabowska et al. ¹¹⁴ untersuchten sogar den Einfluss aus der Nabelschnur isolierter PMSC auf cardiotoxingeschädigte Gastrocnemiusmuskulatur in der Maus. In dieser Untersuchung ließen sich auch myogene Differenzierungscharakteristika erkennen. Die festgestellte verbesserte Regeneration wurde in dieser Arbeit jedoch eher trophischen Faktoren, die durch PMSC freigesetzt werden können, zugeschrieben ¹¹⁴. Dies entspricht der allgemeinen Meinung der Wirkweise der MSC in der Literatur ^{98,99,101}.

3.3.6.2 Placental expanded adherant stromal cell product (PLX)

PLX ist der Produktname adhätierender mesenchymaler Stromazellen, die unter standardisierten Bedingungen aus vollständigen Plazenten isoliert und zunächst in 2D, danach in 3D-Bioreaktoren kultiviert werden. Sie besitzen eine spindelförmige, polygonale Morphologie und haben eine Größe von 15-19 µm im Durchmesser. Die Positivität für die Oberflächenmarker CD105, CD73, CD29 als auch die Negativität für die Oberflächenmarker CD14, CD31, CD45, CD119 entsprechen phänotypisch mesenchymalen Stromazellen ⁹⁰. Da nur die fehlende Differenzierung zu adipogenem, chondrogenem oder osteogenem Gewebe nicht den Kriterien der ISCT entspricht, wird zum Teil auch der Begriff „MSC-like Cells“ verwendet ¹¹⁵.

Präklinische Studien zu deren pharmakologischen und toxischen Eigenschaften wurden an immundefizienten NOD-SCID Mäusen durchgeführt ¹¹⁶. Hierbei erfolgte eine Injektion von 10⁶ Zellen (einmalig bzw. 3 Wiederholungen im Intervall von 3 Tagen) oder eines Placebo (Plasmalyte, 10% Dimethylsulfoxid, 5% Albumin) in die Hüftmuskulatur der Mäuse. In einem Untersuchungszeitraum von 3 Monaten wurden keine negativen Unterschiede in den klinischen, hämatologischen, biochemischen und histologischen Parametern zwischen den Gruppen festgestellt. Zu erwähnen ist aber

die Inzidenz von malignen Lymphomen des Thymus bei einigen Mäusen beider Gruppen nach einem Monat. Dies ist ein häufig spontan auftretendes Phänomen von NOD-SCID Mäusen, dessen Pathogenese aber noch unklar ist ^{117,118}. Insgesamt konnte die Anwendung von PLX Zellen in der oben genannten Dosis ohne unerwünschte Ereignisse beschrieben werden ¹¹⁶.

Im Anschluss folgten Studien zur Wirksamkeit der PLX Zellen in der Unterstützung der Regeneration bei verschiedenen Anwendungsgebieten. Vergleichbar zu den bisher beschriebenen PMSC existieren für PLX Zellen ebenso Studien im Bereich der Angiologie, Kardiologie und Neurologie. 2009 untersuchten Prather et al. ¹¹⁵ in einer Tierstudie den therapeutischen Nutzen der PLX Zellen zur Behandlung des chronischen Ischämiesyndroms der Extremitäten, im Englischen auch als „Critical Limb Ischemia“ (CLI) bezeichnet. Darunter versteht man eine schwere fortgeschrittene Form der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) ¹¹⁹. Im Speziellen wurde in der Studie der Einfluss einer intramuskulären Applikation der PLX Zellen am Hinterlauf der Maus analysiert. Die angewendete Methodik ist vergleichbar zu den Studien der bereits erwähnten Untersuchung der PMSC von Francki et al. ¹¹¹ und Zhang et al. ¹¹². Unter der Zelltherapie kam es in der Dopplersonografie zu einer Verbesserung des Blutflusses in den Extremitäten. Dies ist wahrscheinlich auf eine vermehrte Angiogenese zurückzuführen, die sich auch in der Histologie in einer erhöhten Kapillardichte widerspiegelte. Weiterhin waren der oxidative Stress und der Endothelschaden gegenüber der Kontrollgruppe verringert ¹¹⁵. Die derzeit nicht publizierten Phase-I-Studien (NCT00951210, NCT00919958) zur klinischen Anwendung der PLX Zellen zur Therapie der CLI zeigten sogar einen sicheren Einsatz im Patienten. Ähnlich der Wirkweise anderer PMSC geht man bei den PLX Zellen von parakrinen Effekten aus. Dass PLX Zellen fähig zur Sekretion wichtiger Faktoren wie VEGF sind, zeigte auch die Untersuchung von Roy et al. ¹²⁰ im Jahr 2013. In dieser Studie zum Myokardinfarkt konnten außer den angiogenen Eigenschaften auch günstige Effekte der PLX Zellen auf Infarktgröße, Kontraktionskraft und Wandstärke der Ventrikel nachgewiesen werden ¹²⁰. Kranz et al. ¹²¹ prüften 2010 den neuroprotektiven Einfluss der PLX Zellen am Stroke-Modell der Ratte. Nach iatrogener Okklusion der A. cerebri media erfolgte eine intravenöse Applikation der Zellen über die Schwanzvene. In einem Beobachtungszeitraum von 60 Tagen zeigten sich unter der Zelltherapie signifikant bessere Ergebnisse in der Überprüfung der sensomotorischen Defizite sowie der Infarktgröße im MRT im Vergleich zur Kontrollgruppe ¹²¹. Lahiani et al. ¹²²

identifizierten in ihrer Studie einer neuronalen Zelllinie VEGF und IL-6 als Faktoren, die von PLX Zellen unter ischämischen Bedingungen freigesetzt werden und zu der Neuroprotektion beitragen könnten.

Infolge dieser erfolgsversprechenden Ergebnisse in den verschiedenen Fachdisziplinen untersuchte unsere Projektgruppe den Nutzen der PLX Zellen in der Regeneration von Skelettmuskeltraumata in einer bisher nicht publizierten Tierstudie der Ratte. Basierend auf den tierexperimentellen Vorstudien von Winkler et al. zur Transplantation autologer MSC des Knochenmarks verwendete man das gleiche Traumamodell^{45,92,94,95}. Die intramuskuläre Transplantation der PLX Zellen nach dem Crushtrauma zeigte eine signifikante Überlegenheit in funktionellen Kraftmessungen im Vergleich zum Placebo. Diese Verbesserung der Kraft war vergleichbar zu den Ergebnissen mit autologen MSC.

3.4 Zielsetzung und Hypothesen

Die bisherigen Therapieansätze von Muskelverletzungen führen aktuell nur zu eingeschränkten Erfolgen in der Genesung und stellen somit die Orthopädie und Unfallchirurgie vor noch ungelöste Herausforderungen. Speziell in der Endoprothetik besteht das Problem der iatrogenen Traumatisierung der gelenksumgebenden Muskulatur. Ein vielversprechender Ansatz ist die Anwendung plazentarer mesenchymaler Stromazellen. Momentan existiert keine Humanstudie, die allogene Zelltherapie für die Regeneration verletzter Skelettmuskulatur im klinischen Bereich untersucht. Folglich wurde 2013/14 eine Phase I/II Studie (NCT01525667) an der Charité Berlin zur Sicherheit und Wirksamkeit der PLX Zellen im Muskelschaden nach Hüftgelenkersatz durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurde die postoperative Muskelregeneration nach Placebothherapie mit zwei verschiedenen Dosierungen von PLX Zellen (150/ 300 Millionen Zellen) verglichen. Die Schädigung der Glutealmuskulatur in der Hüftendoprothetik eignet sich hierfür als mögliches Traumamodell, da es sich dabei um eine sehr gut standardisierte Muskelverletzung von hoher klinischer Relevanz handelt.

Im Rahmen der durchgeführten klinischen Studie zeigten sich funktionelle Verbesserungen der Muskelkraft unter der Zelltherapie im postoperativen Verlauf (NCT01525667). Für die Untersuchung der Wirksamkeit spielen neben biomechanischen Parametern, wie die Messung der Muskelkraft, aber auch Analysen

auf makro- und mikrostruktureller Ebene eine wichtige Rolle, da sie Hinweise auf die Funktionsweise einer Therapie geben können.

Ziel dieser Dissertation ist daher die Analyse der morphologischen Veränderungen der Glutealmuskulatur nach der intraoperativen Transplantation von PLX Zellen im klinischen Versuch.

Das MRT als nichtinvasives bildgebendes Verfahren bewährte sich diesbezüglich für die Beurteilung der Weichteile auch nach dem Einsatz der HTEP^{1,9,11,123,124}. Mit dieser strahlenfreien Bildgebung lassen sich neben Aussagen einer Gewebecharakterisierung auch Größenverhältnisse bestimmen. Folgende Parameter werden in dieser Arbeit untersucht: i) Muskelvolumen des GM und ii) die fettige Degeneration innerhalb der Muskulatur präoperativ und zu den Zeitpunkten 6,12 und 26 Wochen postoperativ.

Auf mikrostruktureller Ebene eignen sich Muskelbiopsien und deren histologische Aufarbeitung. In dieser Studie wurden zwei Biopsien durchgeführt (intraoperativ, 12 Wochen postoperativ). Histologische Präparate des Muskelgewebes geben Aufschluss über dessen Feinstruktur und die allgemeine Morphologie (Fasergröße, Fasertyp). Da PLX Zellen in bisherigen Studien sowohl angiogene als auch immunmodulatorische Eigenschaften aufwiesen, ist die Beurteilung der Gefäßarchitektur und immunologischer Zellen ebenfalls von besonderer Relevanz. Im Detail werden nachstehende histomorphometrische Daten evaluiert: I) Muskelfaserdurchmesser, II) Fasertypverteilung, III) Anzahl von Regeneratfasern, IV) Gefäßdichte, V) T-Lymphozyteninfiltration VI) Makrophageninfiltration.

Für die Arbeit werden nachstehende Hypothesen formuliert:

Nullhypothese: Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PLX Gruppen und der Placebogruppe in den makro- und mikromorphologischen Parametern im postoperativen Verlauf.

Alternativhypothese: Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den PLX Gruppen und der Placebogruppe in den makro- und mikromorphologischen Parametern im postoperativen Verlauf.

4. Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine monozentrische, randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte Phase I/II Studie, bei der folgende drei Gruppen verglichen wurden: 1) Placebo (bestehend aus Plasmalyte, 10% Dimethylsulfoxid, 5% Albumin), 2) Behandlung mit 150 Millionen (M) PLX Zellen und 3) Behandlung mit 300 Millionen (M) PLX Zellen. Die Randomisierung der Patienten erfolgte 1:1:1 über einen Computeralgorithmus. Vor Beginn der Durchführung im Januar 2013 wurde das Studienprotokoll von der zuständigen Ethikkommission des Paul-Ehrlich Instituts (Nr.: 1552101) und dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Nr.: 12/ 0045) geprüft und bewilligt.

4.1.1 Studienablauf

Das Screening und die Randomisierung der Patienten zu den Interventionsgruppen erfolgten 3 Wochen vor der Operation. In einem Zeitraum von 26 Wochen fanden anschließend die klinischen Aufenthalte für die Implantation der HTEP mit der Studienintervention, die MRT-Aufnahmen sowie die Muskelbiopsien statt (Tabelle 1).

	Tag -21	Tag 0	Tag 1 OP	Woche 6 post OP	Woche 12 post OP	Woche 26 post OP
Screening	✓					
Randomisierung	✓					
Operation HTEP			✓			
Studienintervention			✓			
MRT		✓		✓	✓	✓
Muskelbiopsie			✓		✓	

Tabelle 1: Übersicht des Studienablaufes, ✓ -Markierung für stattgefundene Untersuchungen.

4.2 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar bis Mai 2013 wurden 21 Patienten in der ambulanten Sprechstunde im Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte für die oben genannte Studie gescreent. Nach Ausschluss eines Screening-Failures wurden 20 Patienten (10 Männer, 10 Frauen) therapiert und untersucht:

Einschlusskriterien:

- Alter: 50-75 Jahre zum Zeitpunkt des Screenings
- Geplante Behandlung mit einer HTEP
- ASA Klassifikation ≤ 3
- Schriftliche Einverständniserklärung nach Aufklärung über die Studie

Ausschlusskriterien:

- Muskelerkrankung
- Schwere neurologische Erkrankung
- Langzeitmedikation mit Opioiden
- Schmerzchronifizierung > Stadium II nach Gebershagen
- Immunsuppression aufgrund einer Erkrankung bzw. von Medikamenten
- Spondylitis ancylosans
- Periartikuläre Ossifikation jeglicher Lokalisation in der medizinischen Anamnese
- Ausschlusskriterien für das MRT (Herzschrittmacher, Defibrillatoren, ferromagnetische Clips)
- Nicht kontrollierbarer arterieller Hypertonus (diastolischer Blutdruck > 100 mmHg oder systolischer Blutdruck > 200 mmHg)
- Lebensbedrohliche ventrikuläre Herzrhythmusstörungen bzw. instabile Angina pectoris
- STEMI und/ oder eine transitorische ischämische Attacke (TIA) in den letzten 3 Monaten vor dem Screening
- Schwere kongestive Herzinsuffizienz (NYHA IV)
- Aktuelle maligne Erkrankung, die mit einer Chemotherapie, Bestrahlung oder Immuntherapie assoziiert ist
- Body Mass Index (BMI) $\geq 35 \text{ Kg/ m}^2$

- Bekannte Allergie gegen proteinhaltige Produkte (Pferde oder Rinderserum, Schweine-Trypsin), die in der Zellproduktion verwendet werden
- Positiver HIV/ Syphilisstatus zum Screeningzeitpunkt
- Bekannte aktive Hepatitis B/C Infektion zum Screeningzeitpunkt
- Bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit bzw. potentielle Schwangerschaft durch fehlende Anwendung kontrazeptiver Maßnahmen
- Nach Meinung des prüfenden Studienarztes ungeeignet für die Anwendung der Zelltherapie
- Patient befindet sich derzeit in einer laufenden Medikamenten- oder Prüfpräparatstudie bzw. hat diese in einem Zeitraum der letzten 30 Tage beendet

4.3 Herstellung der PLX Zellen

Die Produktion der PLX Zellen erfolgte nach den Prinzipien der „Good Manufacturing Practice“ in der Biotechnologiefirma Pluristem Therapeutic Inc. (Haifa, Israel). Die allogenen Stromazellen wurden aus vollständigen Plazenten isoliert, die während einer geplanten Kaiserschnittgeburt entnommen wurden. Die Plazentaspende erfolgte nur nach vorheriger ausführlicher Aufklärung und einer schriftlichen Einverständniserklärung der Mutter basierend auf den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (WMA, 2008). Zunächst wurden die gewaschenen und mit Kollagenase behandelten Plazenten in 2D-Kulturflaschen für 2-3 Tage bei 37°C kultiviert, um eine Oberflächenadhärenz zu gewährleisten. Daraufhin wurde ein für die mesenchymalen Stromazellen optimiertes 2D-Kultur-Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen in flüssigem Stickstoff in einem 2D-Zell-Lager gekühlt. Testungen auf Sterilität, Kontamination mit Mycoplasmen, Immunphänotypen und Zellebensfähigkeit folgten. Bei der Immunphänotyp-Charakterisierung wurden folgende MSC-typische Oberflächenmarker überprüft: CD73+, CD29+, CD105+ und CD34-, CD45-, CD19-, CD14- und HLA-DR-. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen aufgetaut, gewaschen und in einem 3D-Bioreactor (CelliGen Plus, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) expandiert. Nach einem weiteren Wachstum von 1-2 Wochen wurden die Zellen entnommen, erneut auf phäno- und karyotypische Veränderungen untersucht und schließlich als „PLX“ Zellen in flüssigem Stickstoff bei $-170 \pm 30^\circ\text{C}$ gekühlt und dort bis zum Einsatz gelagert.

4.4 Operationstechnik der Hüfttotalendoprothesenimplantation und Studienintervention

Alle Operationen wurden vom Ärztlichen Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité Prof. Dr. med. Carsten Perka mit der gleichen Operationstechnik durchgeführt. Für den transglutealen Zugang wurde die Haut zunächst in longitudinaler Richtung lateral des Trochanter major inzidiert und das subkutane Gewebe sowie die Faszia lata durchtrennt. Nach der Eröffnung des Tractus iliotibialis erfolgte die unter Punkt 4.7.1 detailliert beschriebene Muskelbiopsie. Danach wurde die Glutealmuskulatur im vorderen Drittel in Höhe des Trochanter major ca. 5 cm scharf durchtrennt und der entstandene Gluteus-Vastus-Lappen nach anterior gehoben. Im Folgenden wurde die Gelenkkapsel reseziert und der Femurkopf und -hals entfernt. Zur Pfannenimplantation wurden Osteophyten entfernt, das Acetabulum für die passende Prothesengröße aufgefräst und eine zementfreie „Pressfit“ Pfanne (Allofit, Zimmer, Warsaw, USA) mit Polyethyleninlay implantiert. Zur Implantation des Prothesenschaftes wurde das Bein in maximaler Außenrotation und Adduktion gelagert, der Markraum anschließend mit einem Kastenmeißel eröffnet und mit Schafffräsen präpariert. Nach Einbringen der Schaftprothese (SL Plus, Smith & Nephew, Hamburg, Deutschland) und Aufsetzen des Hüftkopfes erfolgte die Reposition. Nach Platzierung einer intraartikulären Redondrainage wurde die Glutealmuskulatur mit Einzelknopfnähten (Vicryl Gr. 1, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) adaptierend genäht. Anschließend erfolgte die Studienintervention nachdem die PLX Zellen parallel zur Operation im Wasserbad bei 37°C aufgetaut worden waren. Dafür wurden die PLX Zellen beziehungsweise das Placebo direkt in die traumatisierte Muskulatur appliziert. Dies erfolgte durch 10 Injektionen à 1,5 ml mit einer 20 Gauge Nadel mit jeweils fünf Injektionen anterior und posterior des Schnittes. Beendet wurde die OP mit dem Verschluss des Tractus und der Subkutis, gefolgt von der Hautnaht und einem sterilen Verband mit Kompressen.

4.5 Rehabilitation

Bereits am ersten postoperativen Tag erfolgte unter Anleitung der Physiotherapie eine Vollbelastung des operierten Beines mit Hilfe von Unterarmgehstützen. Nach Beendigung des stationären Aufenthaltes an der Charité Berlin Campus Mitte fand eine streng standardisierte Anschlussheilbehandlung für alle Studienteilnehmer im Medical

Park Humboldtmühle Berlin statt. Zum Reha-Programm gehörten Übungen zur Mobilisierung in Hüftextension, -abduktion, -flexion, Ausdauer am Fahrradergometer sowie Kräftigung der oberen und unteren Extremität. Insgesamt betrug die Dauer des Aufenthaltes in dem Rehabilitationszentrum drei Wochen. Anschließend wurde von der Physiotherapie ein Übungsplan für das häusliche Umfeld bereitgestellt.

4.6 Makromorphologie

4.6.1 MRT Untersuchungen

Alle Patienten erhielten an Tag 0 (präoperativ), Woche 6, 12 und 26 postoperativ eine MRT Untersuchung des Beckens in der Radiologischen Abteilung der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte. Als Magnetresonanztomograph wurde ein 1,5 Tesla „Avanto“ Gerät von Siemens verwendet. Jede MRT Untersuchung umfasste T1- und T2-gewichtete Bilder. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die technischen Details der Aufnahmen.

Sequenz	Auflösung	Schichtdicke	Flip Angle	Repetition Time	Echo Time
T1 axial	512 x 168	5 mm	180°	623 ms	11 ms
T1 coronar	512 x 307	5 mm	150°	5550 ms	61 ms
Coronar T2 Haste	256 x 256	5 mm	150°	1000 ms	91 ms
Coronar TIRM	512 x 168	5 mm	150°	6000 ms	60 ms

Tabelle 2: Überblick der verschiedenen Aufnahmen der MRT Untersuchungen und den spezifischen Parametern.

4.6.1.1 Beurteilung des Muskelvolumens

Mit der PACS Workstation Osirix v.5.8.2 (Osirix Imaging Software, Genf, Schweiz) wurden die DICOM-Bilder der MRT Untersuchungen jedes Patienten analysiert. Für die Berechnung des Muskelvolumens wurde zunächst in jedem Slice der T1-gewichteten transversalen Aufnahmen der Musculus gluteus medius segmentiert und mit Hilfe des Tools „Geschlossenes Polygon“ die Fläche bestimmt (Abb. 3A).

Über die T2-Aufnahmen und die koronaren T1-Aufnahmen konnte das Muskelgewebe gegenüber Ödemen oder Flüssigkeitsansammlungen im Operationsgebiet abgegrenzt werden. Über die Schichtdicke $d=0,5$ cm konnte für jede Schicht ein Teilvolumen bestimmt werden. Das Gesamtvolumen wurde über die Summe aller Teilvolumina berechnet (Abb. 3B und 3C).

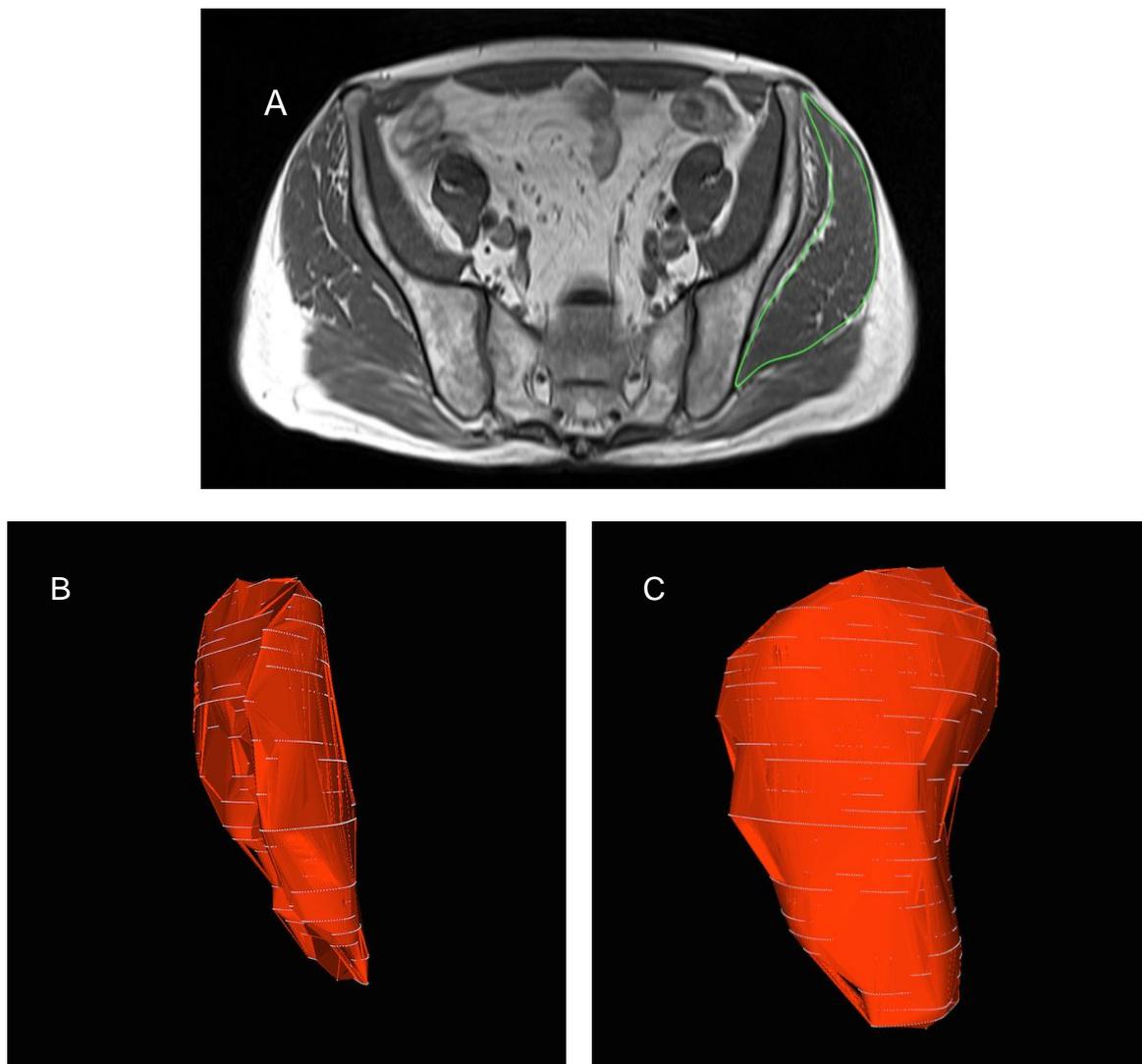


Abbildung 3: Darstellung des GM in A) transversaler Ebene einer T1-gewichteten MRT-Aufnahme. Die segmentierte Fläche zur Volumenberechnung ist gekennzeichnet (Grüne Markierung). B) und C) zeigen eine dreidimensionale Rekonstruktion aus der Schichtdicke und allen segmentierten Flächen in koronarer und sagittaler Ebene.

4.6.1.2 Beurteilung der fettigen Muskelatrophie

Die Quantifizierung der fettigen Muskelatrophie beruht auf der Methode von von Roth et al. ¹. Diese basiert auf der Grauwertbestimmung der T1-gewichteten transversalen MRT Untersuchung. Zu allererst wurden drei Schichten gewählt, die sich genau sechs Schichten kranial der Spitze des Trochanter major befinden und in einem 8-bit Format abgespeichert. Mit dem Programm Photoshop CS3 (San José, USA) wurde nun über eine 1 cm² große Region of Interest (ROI) im subkutanen Fettgewebe die Signalintensität über die Mittelwerte der Grauwerte bestimmt. Dabei können die Pixel im 8-bit Format einen Grauwert zwischen 0 und 256 annehmen. Für weitere Berechnungen galt für „reines Fett“ folgende Spanne an Grauwerten: Mittelwert ± 2 Standardabweichungen (SD). Für eine Bestimmung der Grauwerte von „reinem Muskelgewebe“ wurde der M. iliacus als Referenz gewählt. Auch hier galt für weitere Berechnungen eine Spanne von ± 2 SD vom Mittelwert durch die Anwendung von ROI. Anschließend wurde die Glutealmuskulatur mit dem Plugin Lineal in 3 gleich große Segmente (anterior, medius, posterior) unterteilt (Abb. 4). Die Fläche der jeweiligen Segmente wurde im Histogramm auf die Anzahl der Pixel im „Fett“- und „Muskelgewebe“-Grauwertbereich untersucht. So konnte der Fettgehalt des Segmentes über folgenden Quotienten berechnet werden:

$$\text{Prozentualer Fettgehalt} = \frac{\text{Anzahl Pixel(Fett)}}{\text{Anzahl Pixel(Fett)} + \text{Anzahl Pixel(Muskel)}} \times 100\%$$

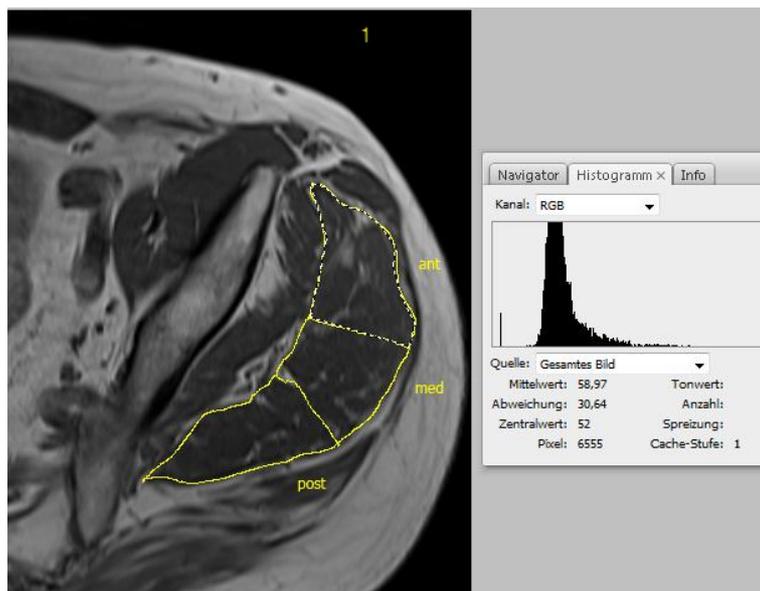


Abbildung 4: Transversale T1-gewichtete Aufnahme zur Bestimmung des Fettgehalts im GM. Der GM ist eingeteilt in 3 Segmente (anterior, medius, posterior). Das Histogramm zeigt die Pixelverteilung von verschiedenen Grauwerten.

4.7 Mikromorphologie

4.7.1 Durchführung der Biopsien

Im Laufe der Studie wurden jedem Patienten insgesamt 2 Muskelbiopsien aus dem GM entnommen: am OP-Tag (Tag 1) sowie 12 Wochen postoperativ. Während der Operation wurde vor der Inzision der Glutealmuskulatur vom 1. Operateur eine Stanzbiopsie mittels MAGNUM® Biopsiesystem (Siemens, Erlangen, Deutschland) circa 5 cm proximal des Trochanter major entnommen. Die Biopsie erfolgte quer zum Muskelfaserverlauf. 12 Wochen postoperativ fand eine weitere Biopsie in der Orthopädischen Ambulanz Charité Berlin Campus Mitte statt. Dafür wurde das gleiche Biopsiegerät verwendet wie an Tag 1 und die Glutealmuskulatur sowie der Ort der Punktion ultraschallgesteuert identifiziert. Zur Anästhesie wurde Lidocain 1% streng intrakutan appliziert. Anschließend wurde nach einer Stichinzision der Haut unter sterilen Bedingungen die Probe 5 cm kranial des Trochanter major entnommen. Durchgeführt wurden alle postoperativen Biopsien von PD Dr. med. Tobias Winkler.

4.7.2 Aufbereitung der Biopsien

Alle entnommenen Muskelproben wurden direkt nach Biopsie kryoeingebettet. Dafür wurden Tissue-Tek® O.C.T. Compound als Einbettmedium und Cryomolds (Einbettform) verwendet. Die vertikal in den Cryomolds befindlichen Muskelbiopsien wurden zunächst für 2 Minuten in flüssiges 2-Methylbutan, gekühlt in flüssigem Stickstoff, getaucht. Die kryogefrorenen Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.7.3 Anfertigung der Schnitte

Für alle Präparate wurden mit einem Kryostaten (Microm HM 60, MICROM International, Walldorf, Deutschland) Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt und mit Wärme auf die Objektträger gezogen. Nach einer kurzen Spülung mit Aceton wurden die Schnitte erneut bei -80°C gekühlt und gelagert.

4.7.4 Fixierung der Schnitte

Nachdem die Kryoschnitte 30 Minuten an der Luft getrocknet waren, wurden zwei verschiedene Fixierungsmethoden genutzt. Die Fixierung in gekühltem Aceton wurde für folgende Färbungen verwendet: Myosin Fast, T-Zell-Rezeptor, CD68. Für die HE- (Hämatoxylin-Eosin) sowie Faktor VIII-Färbung wurde eine Fixierung in 4% Paraformaldehyd gewählt. Nach jeder Fixierung erfolgten jeweils zwei Spülungen in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) in einer 1:10 Verdünnung für 5 Minuten.

4.7.5 Färbungen

4.7.5.1 Konventionelle Histologie

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist eine Routinefärbemethode, bestehend aus zwei Einzelfärbungen, die für morphologische Untersuchungen standardmäßig eingesetzt wird. Hämatoxylin als positiv geladener Farbstoff färbt dabei alle sauren beziehungsweise basophilen Zellstrukturen blau. Darunter zählen das raue endoplasmatische Retikulum, Ribosomen oder Zellkerne mit den darin enthaltenden Nukleinsäuren. Eosin als negativ geladener Farbstoff färbt alle basischen beziehungsweise azidophilen Zellstrukturen als Gegenfärbung rot. Vor allem Zytoplasmaproteine, Mitochondrien oder das glatte endoplasmatische Retikulum sind davon betroffen. Die HE-Färbung wurde für die Beurteilung von Regeneratfasern und Messung der Muskelfaserdurchmesser genutzt.

Durchführung:

- Hämatoxylinfärbung nach Harris für 7 Minuten
- 2 x Spülen in Aqua dest.
- 0,25% HCl-Alkohol für wenige Sekunden
- Wässern (Bläuen) in Leitungswasser für 10 Minuten
- Eintauchen in Eosin für 2 Minuten
- Entwässern in 2 x 96% Alkohol und 2 x 100% Alkohol jeweils für 2 Minuten
- Entfetten in 2 x Xylol für 2 Minuten
- Eindecken mit Vitroclud und Deckglas

4.7.5.2 Immunhistochemie

Grundlagen

Bei der Immunhistochemie werden Reaktionen zwischen Antigenen (Ag) und spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern (Ak) benutzt, um gezielt Proteine oder andere Gewebestrukturen zu markieren und diese im weiteren Prozess über gekoppelte Farbstoffe sichtbar zu machen. Generell kann zwischen einer direkten und indirekten Färbemethode unterschieden werden. Bei der direkten Färbung ist der primäre Ak direkt mit einem „Marker“ (fluoreszierender Farbstoff, Enzym, etc.) gekoppelt, der eine Farbreaktion hervorruft. Die in dieser Studie angewandte Avidin-Biotin-Komplex-Methode ist eine indirekte Färbung und benötigt weitere Zwischenschritte. Zunächst wird ein spezifischer primärer unkonjugierter Ak verwendet, der gegen ein Epitop im zu untersuchenden Präparat gerichtet ist. Aufgrund von Ladungsverteilungen oder Bindungen von Proteinen an dem Fc-Teil des primären Ak, kann es auch zu unspezifischen Bindungen an verschiedenen Strukturen im Gewebe kommen. Durch die Zugabe von Normalserum sollen diese unspezifischen Bindungen blockiert werden. Anschließend wird ein sekundärer mit Biotin markierter Ak zugegeben, der an den primären Ak bindet. Daraufhin wird der Avidin-Biotin-Komplex hinzugefügt, um eine Signalverstärkung zu verursachen, was besonders bei geringen Mengen eines Epitops im Präparat sinnvoll ist. Das aus Hühnereiweiß gewonnene Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin: eine für den biotinylierten sekundären Ak und drei weitere für an Biotin gekoppelte Markermoleküle. Abgeschlossen wird die Färbemethode mit der Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, bei welcher es zu einer sichtbaren Färbung aufgrund der enzymatischen Reaktion des Substrates mit dem Marker kommt. In dieser Arbeit wurde Alkalische Phosphatase als Markermolekül an dem Avidin-Biotin-Komplex (# AK 5000, Alkaline Phosphatase Standard Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und Vector® Red Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) als Substrat verwendet.

Durchführung:

- Kryoschnitte mit Fettstift umranden (Pap Pen)
- 2 x Spülung mit PBS (1:10) für 5 Minuten
- Inkubation mit Normalserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in feuchter Kammer

- Inkubation mit primärem Ak für 60 Minuten bei 37°C
- 2 x Spülung mit PBS (1:10) für 5 Minuten
- Inkubation mit sekundärem Ak für 30 Minuten bei RT in feuchter Kammer
- 2 x Spülung mit PBS (1:10) für 5 Minuten
- Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex für 50 Minuten bei RT in feuchter Kammer
- 2 x Spülung mit PBS (1:10) für 5 Minuten
- Inkubation des Chromogenpuffers für 5 Minuten bei RT in feuchter Kammer bis pH 8,2 erreicht ist
- Inkubation mit Substratgemisch aus Substrat Kit in feuchter Kammer unter mikroskopischer Kontrolle (sichtbare Rotfärbung der jeweiligen Struktur)
- Abstoppen der Reaktion durch 2 x Spülen mit PBS (1:10) für 5 Minuten
- Spülung mit Aqua dest. für 5 Minuten
- Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (1:2 mit Aqua dest.) für 2 Minuten
- Wässern (Bläuen) in Leitungswasser für 5 Minuten
- Eindecken mit Aquatex und Deckgläsern

In dieser Studie wurden folgende primäre/ sekundäre Antikörper und Normalseren verwendet:

Primärantikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller/ Nummer	Verwendete Verdünnung
Anti-FVIII	Kaninchen, Polyklonal	Biocare Medical, Concorde, USA/ # CP 039B	1:200
Anti-Skeletal Myosin (Fast)	Maus, Monoklonal	Sigma Aldrich, St. Louis, USA / # M4276	1:4000
Anti-CD68	Maus, Monoklonal	Acris Antibody, Herford, Deutschland/ # SM 1718T	1:10
Anti- $\alpha\beta$ -T-Zell- Rezeptor	Maus, Monoklonal	Acris Antibody, Herford, Deutschland/ # SM 1230 PS	1:100

Biotinylierte Sekundärantikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller/ Nummer	Verwendete Verdünnung
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Vector Laboratories, Birlingame, USA/ # BA-1000	1:10
Anti-Maus-IgG	Pferd	Vector Laboratories, Birlingame, USA/ # BA-2001	1:10

Normalseren/ Blockierung

Serum	Hersteller/ Nummer	Verdünnung
Ziege	Vector Laboratories, Birlingame, USA/ # S-1000	1:10 in PBS
Pferd	Vector Laboratories, Birlingame, USA/ # S-2000	1:10 in PBS

4.7.6 Auswertung der histologischen Präparate

Alle gefärbten Schnitte wurden zunächst mittels Leica DMRB Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht und anschließend mit Hilfe einer damit verbundenen Kamera (Zeiss, AxioCam, MRc, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) in 100facher Vergrößerung in einzelnen Kacheln fotografiert und mit der Software AxioVision Rel. 4.4 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) zu einem gesamten Schnitt zusammengesetzt. Dies funktioniert über die Funktion „Stitching“, die überlappende Bilder automatisch aufgrund von angrenzenden Strukturen zusammenfügt. Für alle histomorphometrischen Messungen wurde die Software ImageJ 1.44 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) benutzt.

Beurteilung der Muskelfaserdurchmesser

Für die Auswahl der Muskelfasern wurde für jedes HE-Präparat ein zufälliger Ausschnitt gewählt. Anschließend wurde die kürzeste Distanz gemessen, die eine Faser teilt (Abb. 5). Aus allen Messwerten wurden das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt.

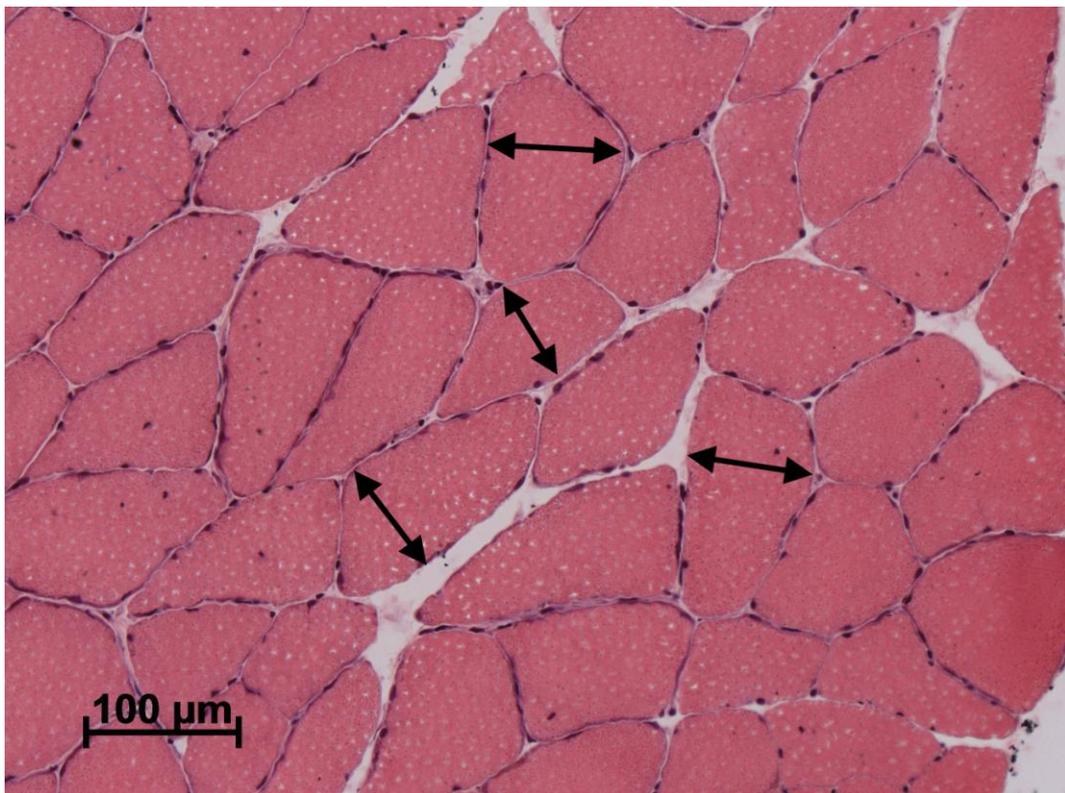


Abbildung 5: Muskelfaserquerschnitt in HE-Färbung (200fache Vergrößerung). Der Muskelfaserdurchmesser ist bei vier Fasern markiert (schwarze Pfeile).

Beurteilung der Regeneratfasern

Alle Muskelfasern mit zentralständigen Kernen wurden für diese Analyse als „Regeneratfasern“ definiert. Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine Regeneratfaser. In allen HE-gefärbten Schnitten wurde die gesamte Anzahl an Regeneratfasern mittels Plug-In „Cell Counter“ ausgezählt und pro Fläche des dargestellten Muskelquerschnitts berechnet. Die Gesamtfläche des Schnittes konnte mit einem „Lasso“-Tool bestimmt werden. Gefrierartefakte, überschüssiges Bindegewebe etc. konnten manuell entfernt werden.

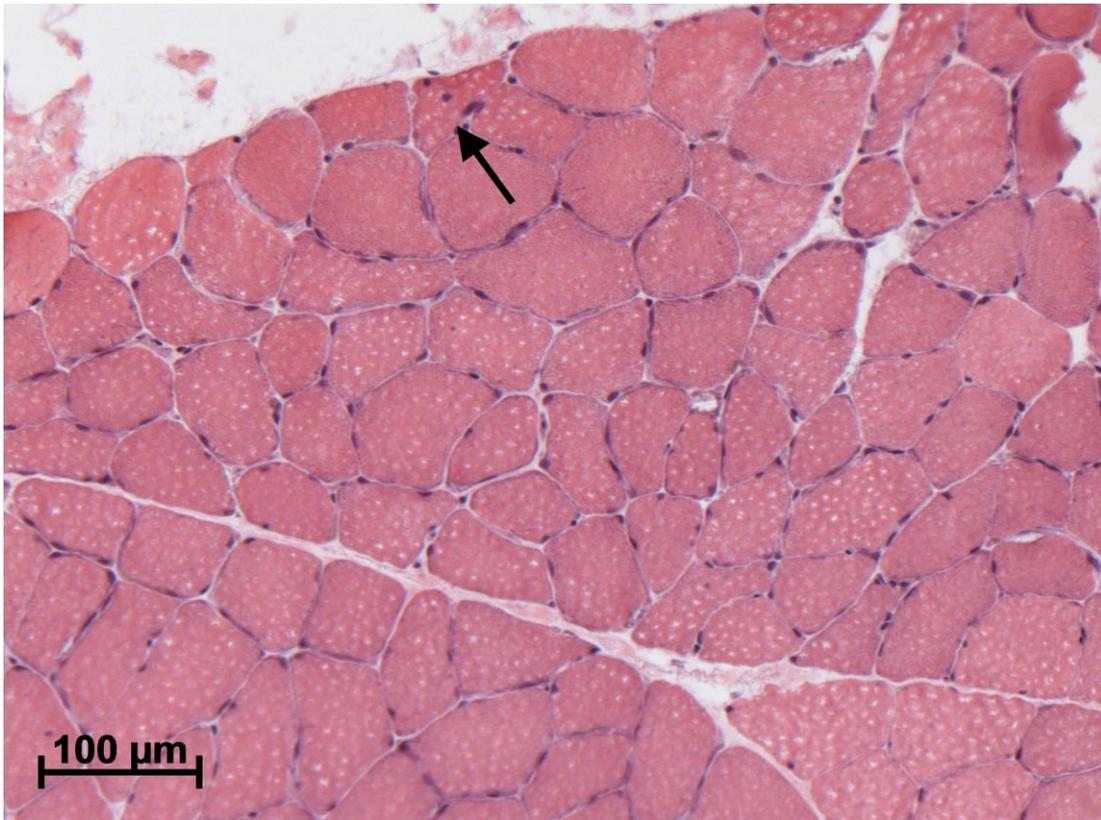


Abbildung 6: Muskelfaserquerschnitt in der HE-Färbung (200fache Vergrößerung). Gekennzeichnet ist eine Regeneratfaser als Muskelfaser mit einem zentralständigen Kern (schwarzer Pfeil).

Beurteilung der Faserverteilung

In den Myosin-Fast-Färbungen wurde in einem zufälligen Ausschnitt die Anzahl der positiv rot gefärbten Fast-Twitch-Fasern (Typ-II-Fasern) sowie die Anzahl der negativ blau gefärbten Muskelfasern (Typ-I-Fasern) über das Plug-In „Cell Counter“ gezählt (Abb. 7). Durch das Verhältnis der absoluten Anzahl der Fasertypen ließ sich der prozentuale Fast-Faser-Anteil bestimmen.

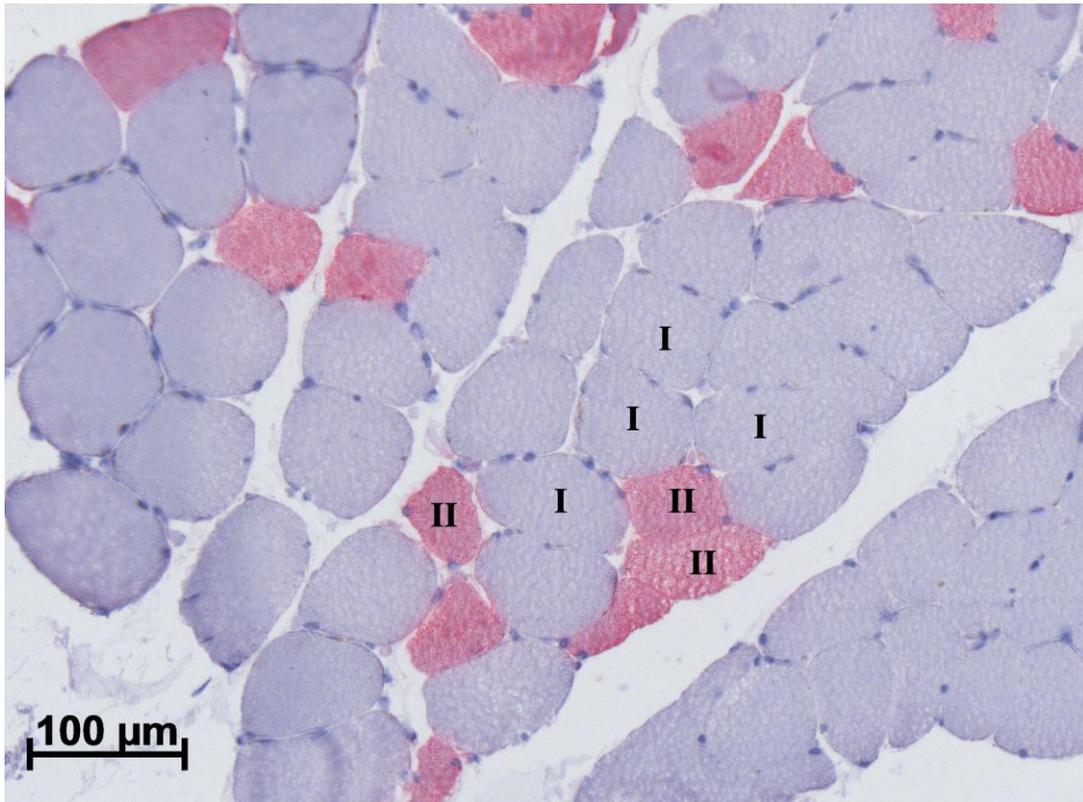


Abbildung 7: Faserverteilung in der Myosin-Fast-Färbung (200fache Vergrößerung).
 Kennzeichnung der verschiedenen Fasern: I- Typ-I-(slow)-Faser, II – Typ-II-(fast)-Faser.

Beurteilung der Gefäße

Für diese Analyse wurden Faktor-VIII-gefärbte Präparate benutzt. Der Faktor VIII (auch von-Willebrand-Faktor) ist ein Glykoprotein, das an der Hämostase beteiligt ist. Es wird von Megakaryozyten und von Endothelzellen, welche die Intima von Blutgefäßen auskleiden, synthetisiert. Somit kann Faktor VIII auch als Marker für die Beurteilung der Gefäße/ Gefäßdichte herangezogen werden. Die Ermittlung der Gefäße wurde anhand von Regions of Interest (ROI) durchgeführt. Dabei wurde ein Raster von 500 x 500 Pixel verwendet und zuvor eine Skalierung vorgenommen. Über eine in der Software vorhandene Randomisierung wurden zehn beliebige ROIs in jedem Präparat untersucht und die Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Gefäße pro ROI gezählt (Abb. 8). Bestimmt wurden alle angefärbten Gefäße (Arteriolen, Kapillaren etc.).

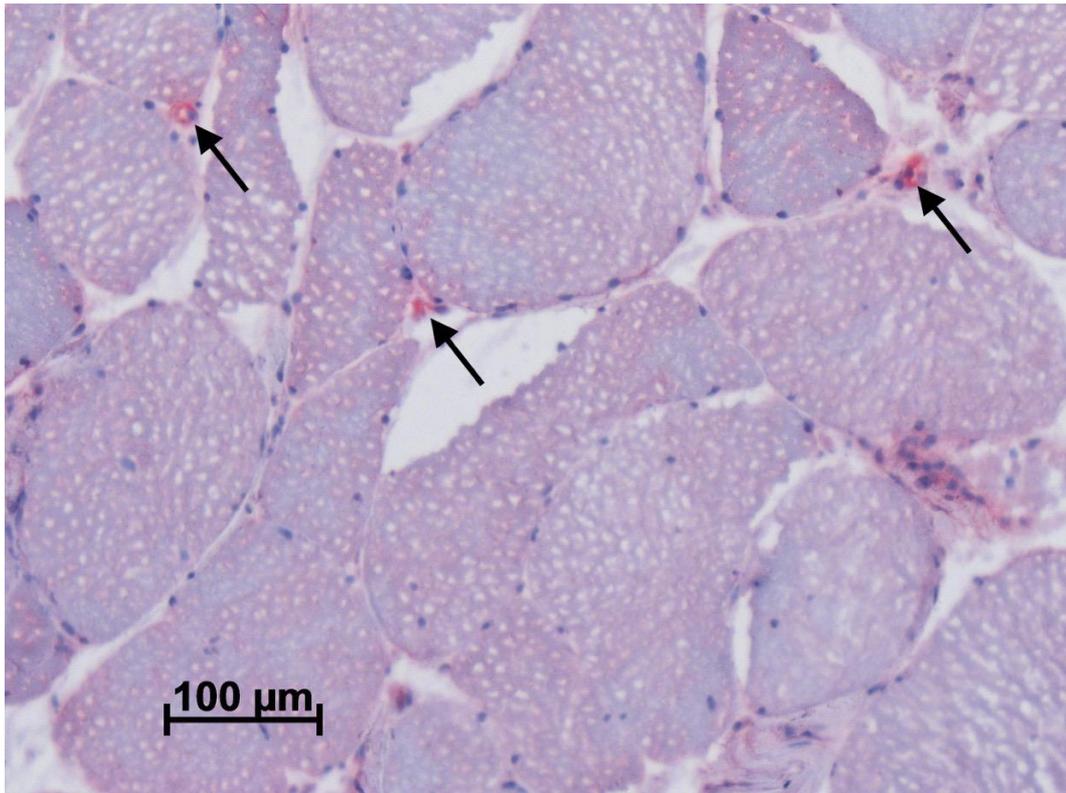


Abbildung 8: Gefäßdarstellung im Muskelgewebe in Faktor-VIII-Färbung (200fache Vergrößerung). Die angeschnittenen Kapillaren sind gekennzeichnet (schwarze Pfeile).

Beurteilung der T-Lymphozyten

Für die Analyse der absoluten Anzahl der T-Lymphozyten wurden Präparate mit der $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptorfärbung verwendet. Bei wenigen T-Lymphozyten in einem gefärbten Schnitt wurden die einzelnen T-Lymphozyten manuell gezählt und pro Gesamtfläche des Querschnitts (mm^2) berechnet. Bei Vorkommen von Lymphozytenclustern wurde folgende Methode verwendet: zunächst wurde über ein „Lasso“-Tool die Fläche von mindestens zehn verschiedenen einzelnen T-Lymphozyten pro Schnitt gemessen, um aus dem arithmetischen Mittel eine Standardgröße eines T-Lymphozyten zu erhalten. Abbildung 9 zeigt so ein Lymphozytencluster. Anschließend wurde die Fläche von den jeweiligen Clustern in den Präparaten ebenfalls mit dem „Lasso“-Tool bestimmt und anhand dieser Parameter die Anzahl der T-Lymphozyten pro Gesamtquerschnittsfläche ermittelt.

$$\text{Anzahl T – Lymphozyten gesamt} = \frac{\text{Gesamtfläche Cluster}}{\text{Fläche Lymphozyt}}$$

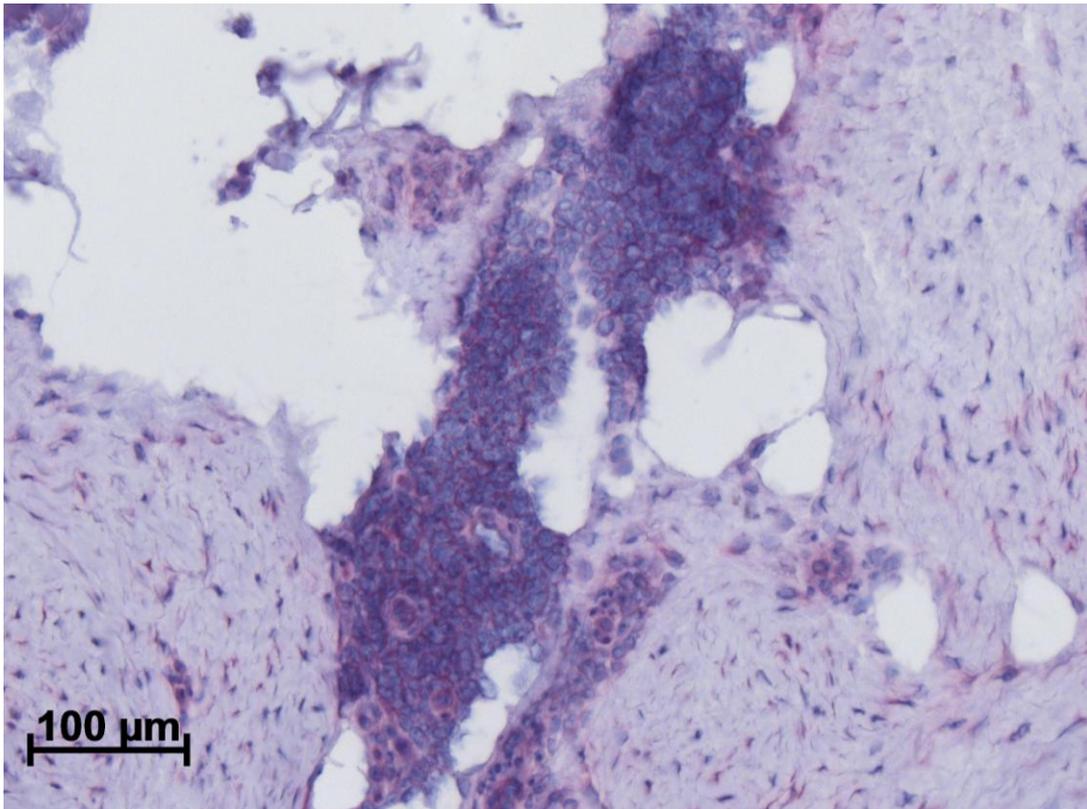


Abbildung 9: Darstellung eines Lymphozytenclusters in der T-Zell-Rezeptor-Färbung (200fache Vergrößerung).

Beurteilung der Makrophagen

Die Beurteilung der Makrophagen erfolgte anhand der mittels CD68+ Antigen-Antikörper-Reaktion gefärbten Präparate. CD68 ist ein Glykoprotein der lysosomalen Membran von Myeloidzellen, welches vorrangig von Gewebsmakrophagen exprimiert wird. Für die Beurteilung der Makrophagen/ Histozyten wurde die Anzahl der gefärbten Zellen mittels Plug-in „Cell Counter“ pro Gesamtfläche jedes Schnittes in den CD68-Färbungen gezählt (Abb. 10).

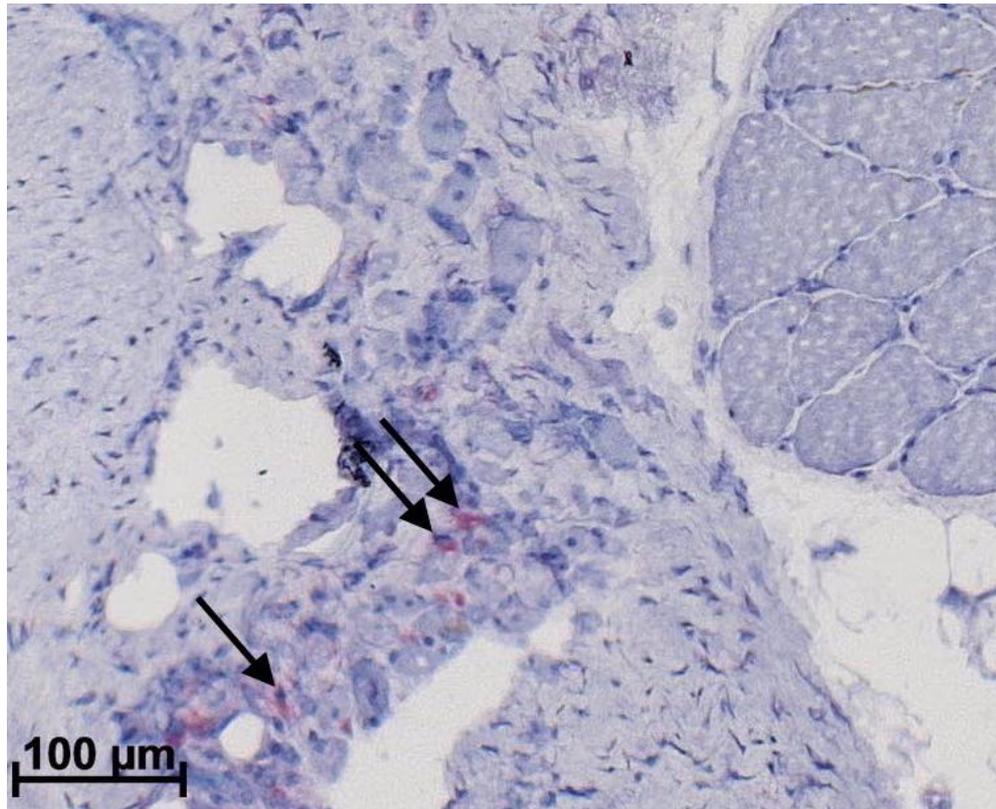


Abbildung 10: Darstellung von Makrophagen in der CD68-Färbung (200fache Vergrößerung). Die positiv reagierenden Makrophagen sind gekennzeichnet (schwarze Pfeile).

4.8 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung der Hypothesen wurde eine modifizierte Intention-to-treat-Analyse durchgeführt. Dafür wurden alle Daten der randomisierten Studienteilnehmer verwendet, die eine Hüftendoprothese mit jeweiliger Studienintervention erhalten haben und mindestens eine postoperative Messung eines Endpunktes besitzen. Die Endwerte der untersuchten Parameter wurden mit einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) untersucht, um die Effekte der PLX Zellen auf die morphologischen Zielpunkte ohne schon vorher bestehende Gruppenunterschiede zu messen. Für die makromorphologischen Untersuchungen nutzte man eine ANCOVA mit Messwiederholung mit der Veränderung der Messwerte über den gewählten Zeitraum als abhängige Variable, der Gruppenzugehörigkeit als „festen Faktor“ und den Baseline-Werten als Kovariate. Da es für die histologischen Analysen nur eine postoperative Messung gab, wurde eine ANCOVA ohne Messwiederholung angewendet. Die individuelle Veränderung zur

Baseline war hierbei die abhängige Variable, die Gruppenzugehörigkeit der „feste Faktor“ und die Baseline-Werte waren die Kovariate. Für alle Baselinewerte wurden jeweils die Mittelwerte und deren Standardabweichung (SD) bestimmt. Die Baseline-adjustierten Endwerte der ANCOVA wurden mit Standardfehler (standard error, SE) angegeben. Die Gruppenvergleiche wurden mit einem Signifikanzlevel von $p=0.05$ und einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. Alle Auswertungen erfolgten mit der Software SAS vs. 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

5. Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv

Die Tabelle 3 zeigt die demographischen Charakteristika der Patienten zum Studienbeginn geordnet nach den jeweiligen Interventionsgruppen. Beurteilungsmerkmale sind Alter, Geschlecht, Körpergröße, Körpergewicht, BMI und Ethnie. Bis auf die Verteilung der Geschlechter sind die Gruppen in den Merkmalen homogen.

	Placebo	150M PLX	300M PLX
	(N=7)	(N=7)	(N=6)
Alter (Jahre)	64,3 ±6,4	65,4 ±5,9	64,5 ±7,4
Geschlecht			
<i>weiblich, N (%)</i>	6 (85,7)	3 (42,9)	1 (16,7)
<i>männlich, N (%)</i>	1 (14,3)	4 (57,1)	5 (83,3)
Größe (cm)	167,3 ±3,4	167,6 ±8,6	176,2 ±4,2
Gewicht (kg)	73,6 ±8,0	78,9 ±21,9	88,7 ±9,7
BMI (kg/ m ²)	26,3 ±2,8	27,5 ±5,9	28,7 ±4,2
Ethnie			
<i>Kaukasier, N (%)</i>	7 (100)	7 (100)	6 (100)

Tabelle 3: Demographische Charakteristika der Studienteilnehmer zum Studienbeginn (Tag 0).
Werte angegeben als Mittelwerte ±SD. N – Anzahl ; BMI – Body Mass Index.

5.2 Makromorphologie

5.2.1 Einfluss der PLX Zellen auf das Muskelvolumen

Zum Zeitpunkt vor der Implantation der HTEP und der begleitenden Studienintervention (Tag 0) betrug die Größe des GM in der Placebogruppe $211,9 \pm 40,5 \text{ cm}^3$, der 150M Gruppe $237,4 \pm 72,0 \text{ cm}^3$ und der 300M Gruppe $299,5 \pm 36,7 \text{ cm}^3$ (Abb. 11). Nach 26 Wochen kam es in allen Gruppen zu einer Steigerung des Muskelvolumens (Abb. 12). Der Unterschied der Baseline adjustierten Mittelwerte der Placebogruppe ($+6,4 \pm 4,4 \text{ cm}^3$) und der 150M Gruppe ($+24,4 \pm 4,2 \text{ cm}^3$) war signifikant ($p=0.004$). Der Vergleich der 300M Gruppe ($+15,6 \pm 4,1 \text{ cm}^3$) zur Placebogruppe war hingegen nicht signifikant ($p=0.189$).

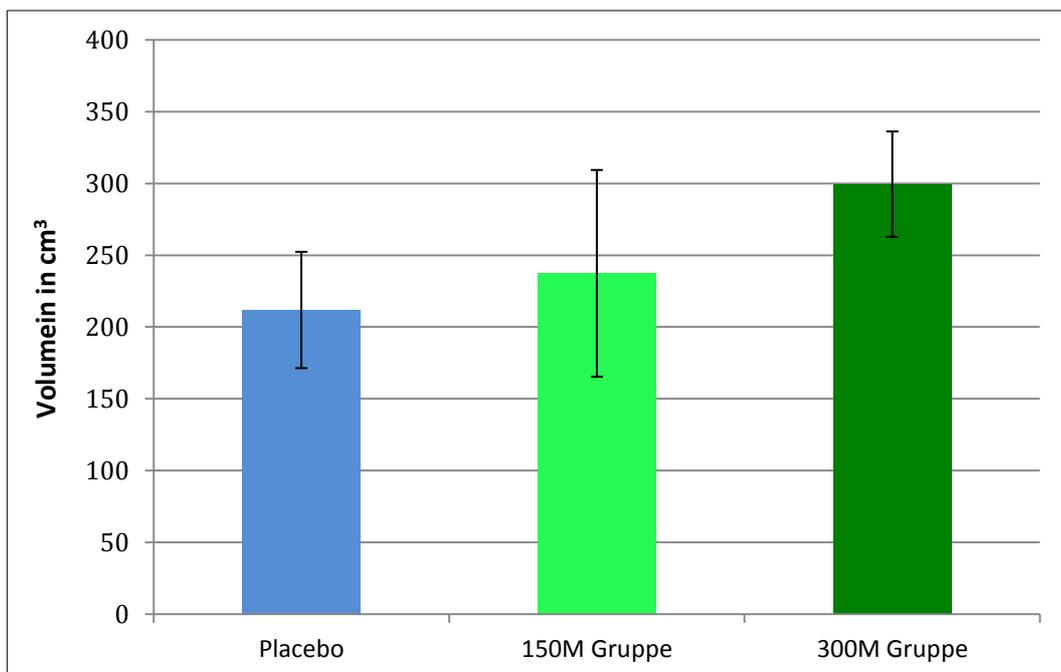


Abbildung 11: Muskelvolumina des GM in $\text{cm}^3 \pm \text{SD}$ der Kontroll- und der Therapiegruppen zum Zeitpunkt Tag 0 (Baseline).

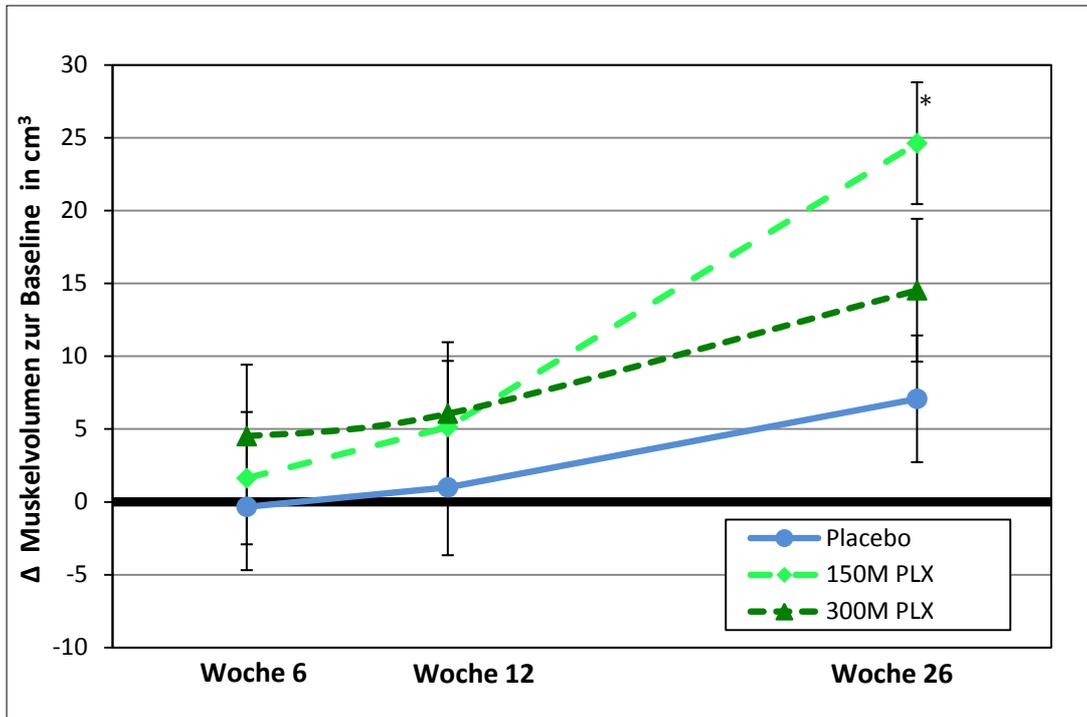


Abbildung 12: Postoperative Veränderung des Muskelvolumens des GM in $\text{cm}^3 \pm \text{SE}$ zur Baseline in der Kontroll- und den Therapiegruppen; * - signifikanter Unterschied der 150M Gruppe zur Placebogruppe ($p=0.004$).

5.2.2 Einfluss der PLX Zellen auf den Fettanteil in der Muskulatur

Zum Zeitpunkt vor dem Einsatz der HTEP und der begleitenden Studienintervention (Tag 0) betrug der prozentuale Gesamt-Fettanteil des GM in der Placebogruppe $3,7 \pm 2,7\%$, in der 150M Gruppe $6,8 \pm 7,2\%$ und in der 300M Gruppe $3,3 \pm 1,3\%$ (Abb. 13). Die Abbildung 14 zeigt den Fettgehalt im postoperativen Verlauf. 26 Wochen postoperativ stieg in der Placebogruppe der prozentuale Fettanteil absolut um $+1,8 \pm 0,8\%$, in der 150M Gruppe um $+0,2 \pm 0,8\%$ und in der 300M Gruppe um $+2,5 \pm 0,9\%$. Statistisch konnten keine signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (150M Gruppe vs. Placebo $p=0.141$; 300M Gruppe vs. Placebo $p=0.580$). Tabelle 4 zeigt die postoperativen Werte des Fettgehalts jeweils in den einzelnen Segmenten anterior, medius und posterior.

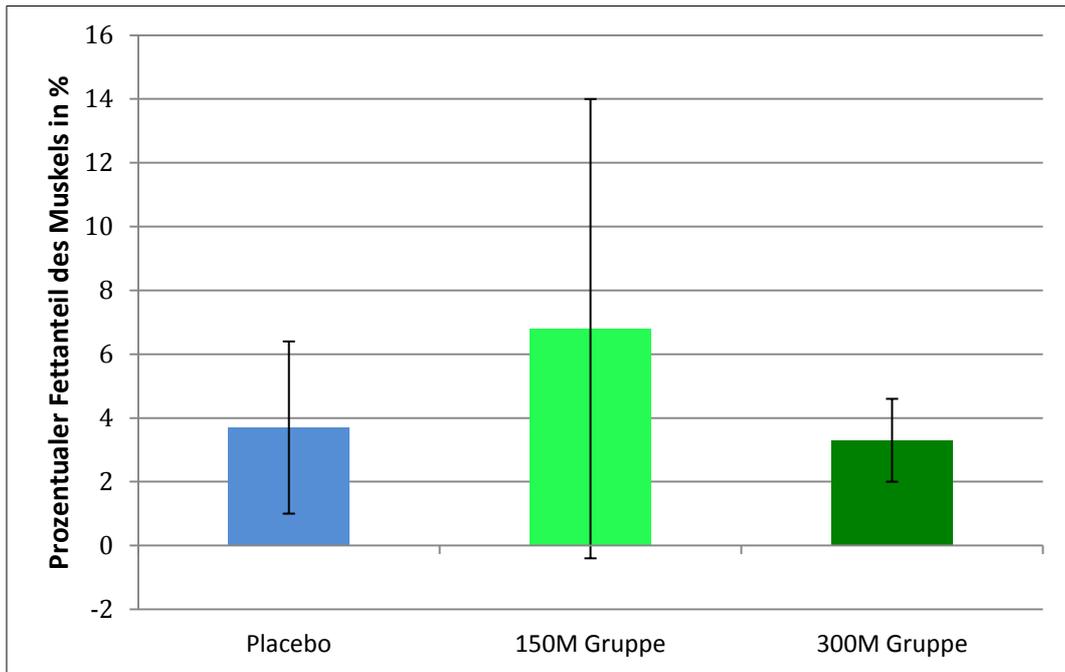


Abbildung 13: Fettanteil_{gesamt} des GM in % \pm SD in der Kontroll- und den Therapiegruppen zum Zeitpunkt Tag 0 (Baseline).

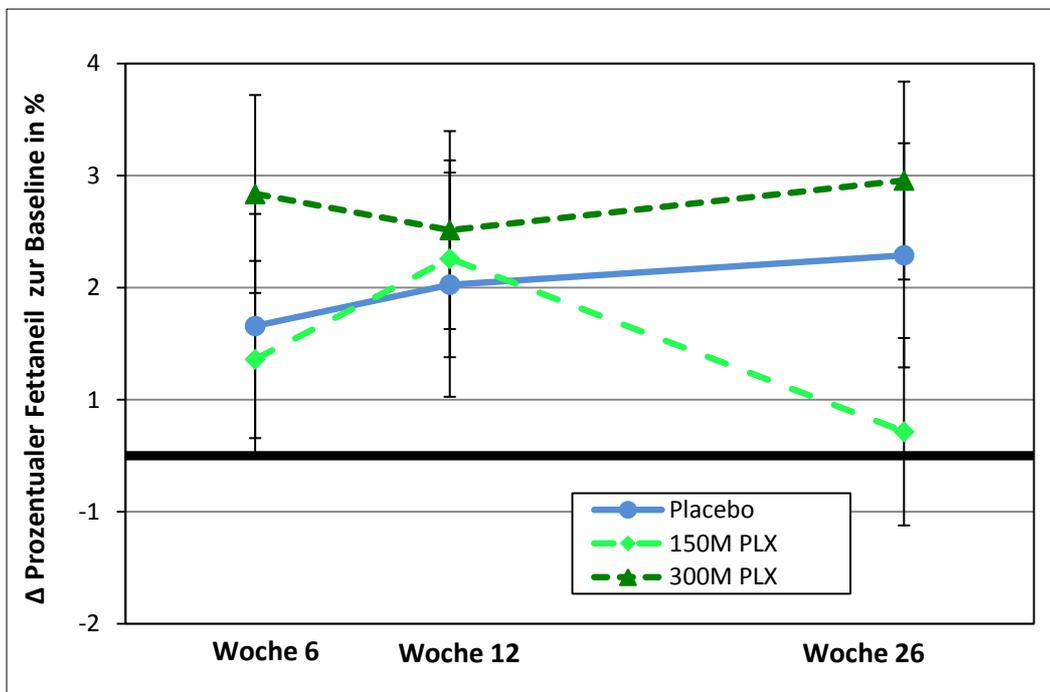


Abbildung 14: Postoperative Veränderung des Fettanteils_{gesamt} des GM zur Baseline (Tag 0) in % \pm SE in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

		6 Wo Post OP	12 Wo Post OP	26 Wo Post OP
Placebo N=7	anterior	3,0 ±1,6	3,0 ±1,7	3,0 ±1,7
	medius	0,2 ±1,2	1,0 ±1,2	1,2 ±1,2
	posterior	1,3 ±1,2	1,2 ±1,2	1,2 ±1,2
150M PLX N=7	anterior	2,3 ±1,7	0,2 ±1,7	0,5 ±1,7
	medius	0,7 ±1,2	3,6 ±1,2	-0,3 ±1,2
	posterior	-1,5 ±1,2	1,0 ±1,2	0,4 ±1,2
300M PLX N=6	anterior	2,9 ±1,8	3,3 ±1,8	5,1 ±1,8
	medius	3,6 ±1,2	1,7 ±1,2	2,3 ±1,2
	posterior	1,2 ±1,2	2,5 ±1,2	1,0 ±1,2

Tabelle 4: Übersicht der postoperativen Veränderungen des Fettanteils des GM in % ±SE in den einzelnen Segmenten (anterior, medius, posterior) in Bezug zur Baseline in der Kontroll- und den Therapiegruppen; (Wo – Wochen).

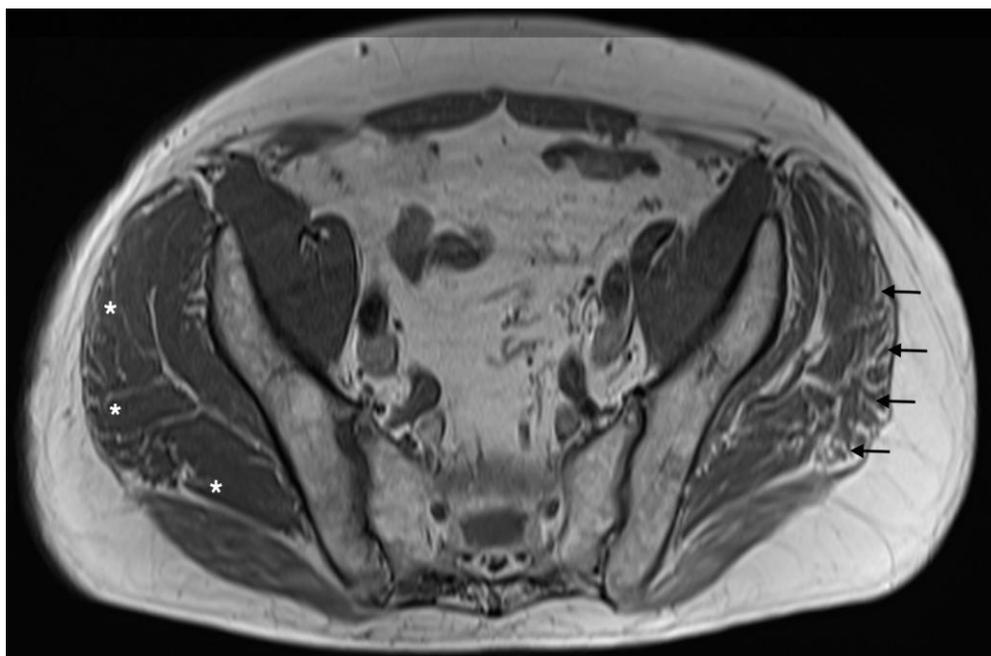


Abbildung 15: Darstellung eines transversalen Schnitts einer T1-gewichteten Aufnahme eines Patienten aus der 300M Gruppe mit makroskopisch sichtbarer fettiger Atrophie im traumatisierten GM 26 Wochen postoperativ. Auf der operierten Seite ist eine erhöhte fettige Atrophie mit „fatty streaks“ im GM dargestellt (schwarze Pfeile). Der GM auf der nicht operierten Seite besitzt kaum fettige Anteile (weiße Sterne).

5.3 Mikromorphologie

Tabelle 5 zeigt die Baseline-Werte der histomorphometrischen Messungen zum Zeitpunkt der Implantation der HTEP (Tag 1). Die Unterschiede der untersuchten mikromorphologischen Parameter zwischen den Gruppen sind nur geringfügig, sodass von homogenen Merkmalen zum Zeitpunkt Tag 1 ausgegangen werden kann. In der Untersuchung der Regeneratfasern ließen sich nur vereinzelt Muskelfasern mit dem Merkmal zentralständiger Kerne vorfinden. In gleicher Weise waren Baseline-Werte für die Anzahl immunologischer Zellen (Lymphozyten, Makrophagen) an Tag 1 gering.

	Placebo N=7	150M Gruppe N=7	300M Gruppe N=6
Muskelfaserdurchmesser (μm)	60,5 \pm 13,6	57,0 \pm 11,3	61,7 \pm 10,0
Regeneratfasern (pro mm^2)	0,8 \pm 0,9	0,6 \pm 0,7	0,6 \pm 0,4
Typ-II-Faser Anteil (%)	25,2 \pm 11,5	34,6 \pm 12,3	25,1 \pm 16,0
Gefäße (pro ROI)	6,7 \pm 1,1	5,6 \pm 1,1	6,9 \pm 1,0
T-Lymphozyten (pro mm^2)	1,3 \pm 1,3	2,7 \pm 4,7	5,3 \pm 7,5
Makrophagen (pro mm^2)	0,02 \pm 0,1	0,04 \pm 0,1	0

Tabelle 5: Übersicht der histologischen Baseline-Werte der Kontroll- und der Therapiegruppen angegeben als Mittelwert \pm SD.

5.3.1 Einfluss der PLX Zellen auf den Muskelfaserdurchmesser

12 Wochen postoperativ wies der Faserdurchmesser der Placebogruppe einen im Vergleich zur Baseline $-5,2 \pm 3,4 \mu\text{m}$ kleineren Wert auf. In den beiden PLX Gruppen zeigte sich kein relevanter Unterschied des Faserdurchmessers zur Baseline (150M Gruppe: $+1,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$; 300M Gruppe: $+0,3 \pm 3,2 \mu\text{m}$) (Abb. 16). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Placebo und der 150M Gruppe ($p=0.190$) beziehungsweise der 300M Gruppe ($p=0.250$).

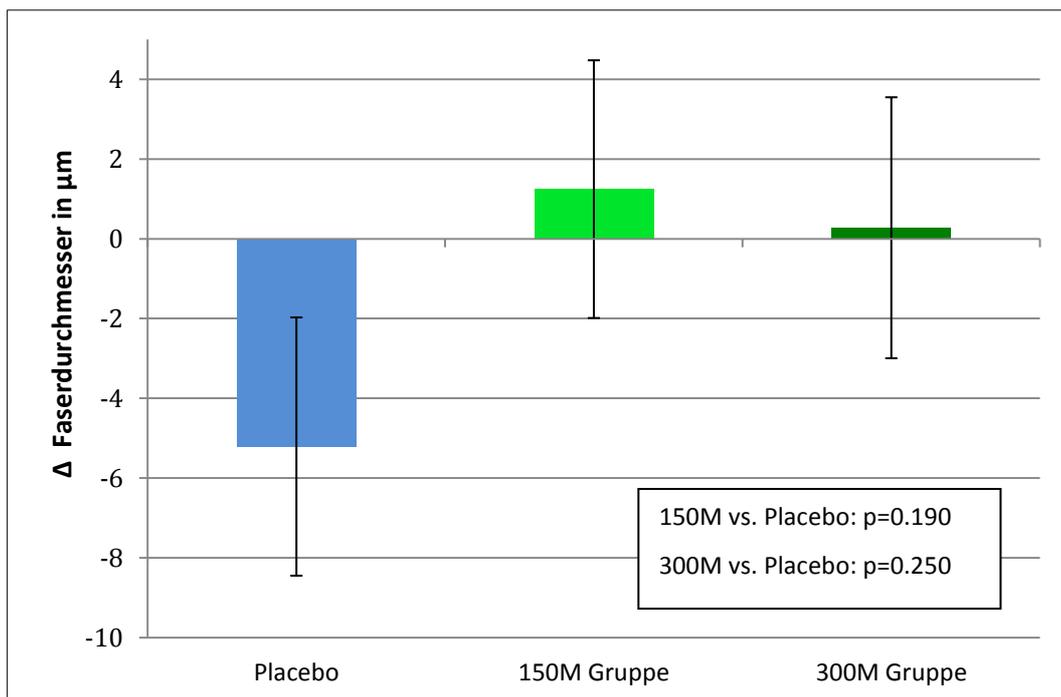


Abbildung 16: Veränderung der Muskelfaserdurchmesser des GM in $\mu\text{m} \pm \text{SE}$ von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

5.3.2 Einfluss der PLX Zellen auf die Anzahl der Regeneratfasern

12 Wochen postoperativ fand sich in den GM Biopsien der Placebogruppe die höchste Anzahl an Regeneratfasern mit $+4,8 \pm 2,2/ \text{mm}^2$. In den Therapiegruppen zeigte sich eine nur leichte Zunahme der Regeneratfasern (150M Gruppe: $+1,8 \pm 2,1/ \text{mm}^2$; 300M Gruppe: $+1,9 \pm 2,1/ \text{mm}^2$) (Abb. 17). Die Unterschiede zwischen Placebogruppe und Therapiegruppen zeigten keine statistische Signifikanz (150M vs. Placebo $p=0.365$; 300M vs. Placebo $p=0.378$).

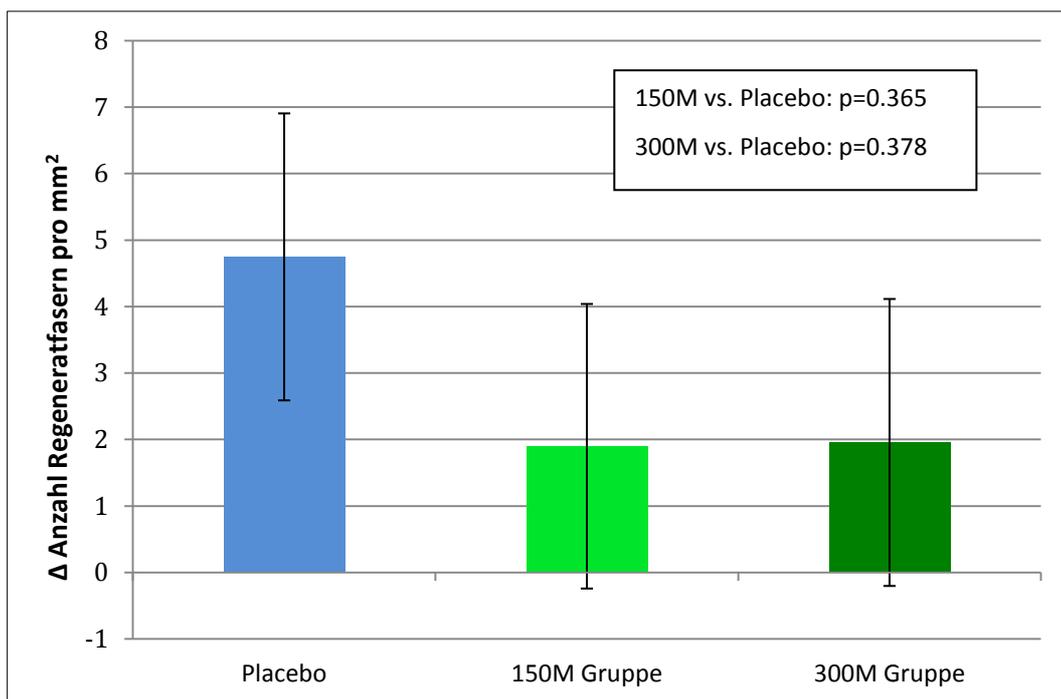


Abbildung 17: Veränderung der Anzahl der Regeneratfasern pro mm² des GM \pm SE von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

5.3.3 Einfluss der PLX Zellen auf die Fasertypverteilung

Die Fasertypverteilung kann Abbildung 18 entnommen werden. 12 Wochen postoperativ zeigten sich nur geringe Veränderungen (Placebo: +2,7 \pm 2,8%; 150M Gruppe: +0,4 \pm 2,8%; 300M Gruppe: -3,3 \pm 2,8%). Insgesamt ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (150M Gruppe vs. Placebo p=0.579; 300M Gruppe vs. Placebo p= 0.147).

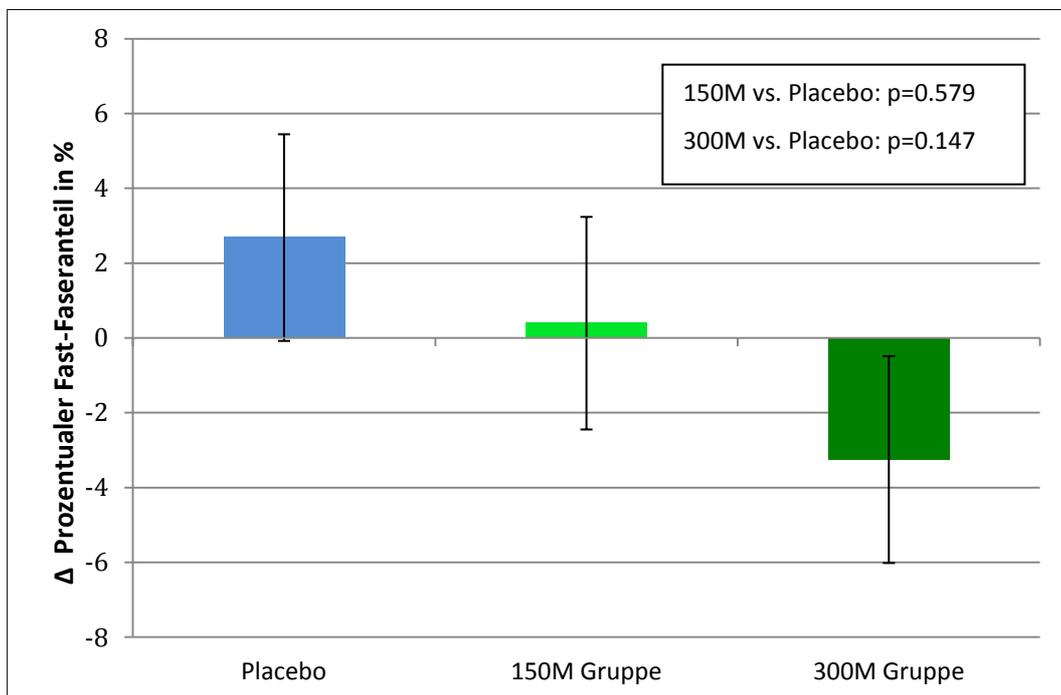


Abbildung 18: Veränderung des Anteils der Fast-Fasern (Typ II Fasern) in % \pm SE aller Muskelfasern des GM von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

5.3.4 Einfluss der PLX Zellen auf die Gefäßdichte

In allen Gruppen kam es postoperativ zu einer Zunahme der Gefäße pro ROI. Die Placebogruppe wies einen absoluten Zuwachs von +2,4 \pm 0,7, die 150M Gruppe von +2,5 \pm 0,7 und die 300M Gruppe von +3,3 \pm 0,7 Gefäßen pro ROI auf (Abb. 19). Weder zwischen der 150M Gruppe und dem Placebo (p=0.888), noch zwischen der 300M Gruppe und dem Placebo bestanden signifikante Unterschiede (p=0.350).

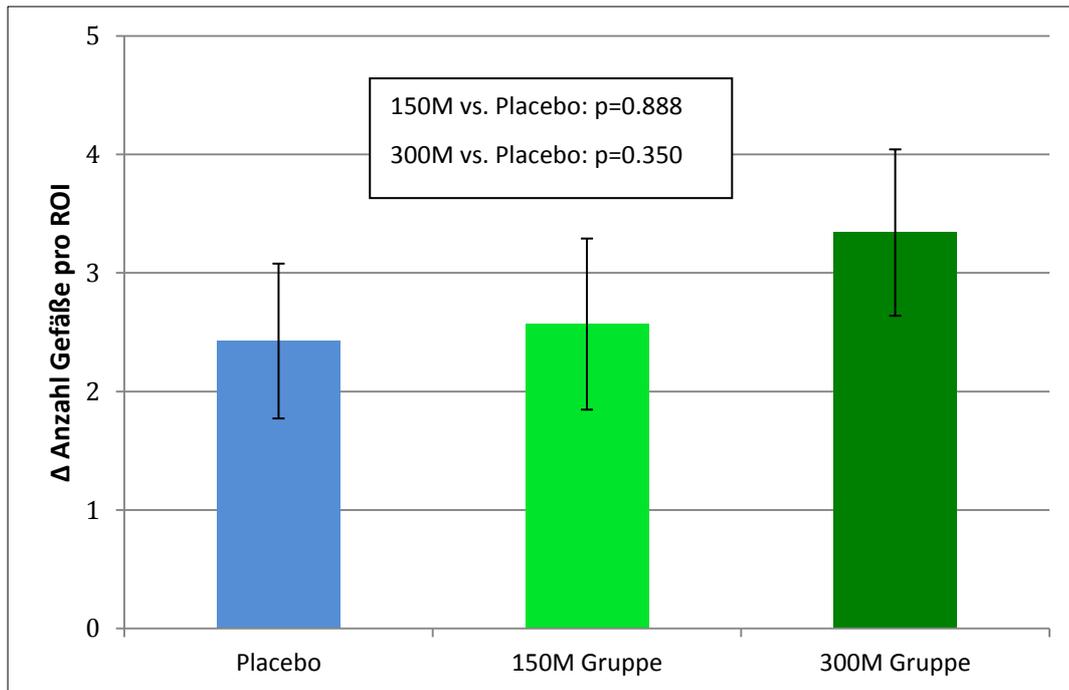


Abbildung 19: Veränderung der Gefäßdichte des GM pro ROI \pm SE von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

5.3.5 Einfluss der PLX Zellen auf die T-Lymphozyteninfiltration

In allen Gruppen kam es postoperativ zu einem Anstieg der T-Lymphozyten in den histologischen Präparaten. In der Placebogruppe stieg die Anzahl von T-Lymphozyten pro mm^2 um $+30,1 \pm 16,6$. In den Therapiegruppen war die Veränderung statistisch ohne Unterschied zur Placebogruppe (150M Gruppe: $+20,3 \pm 16,2 / \text{mm}^2$; 300M Gruppe: $+23,1 \pm 16,8 / \text{mm}^2$ (Abb. 20). Die gemessenen Lymphozyten waren dabei auffallend im Bindegewebe bzw. am Übergang zwischen Binde- und Muskelgewebe lokalisiert und als „Cluster“ formiert. Zudem zeigte sich eine verstärkte Ansammlung in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen (Abb. 21). Im Muskelgewebe selbst waren nur wenig Lymphozyten vorzufinden.

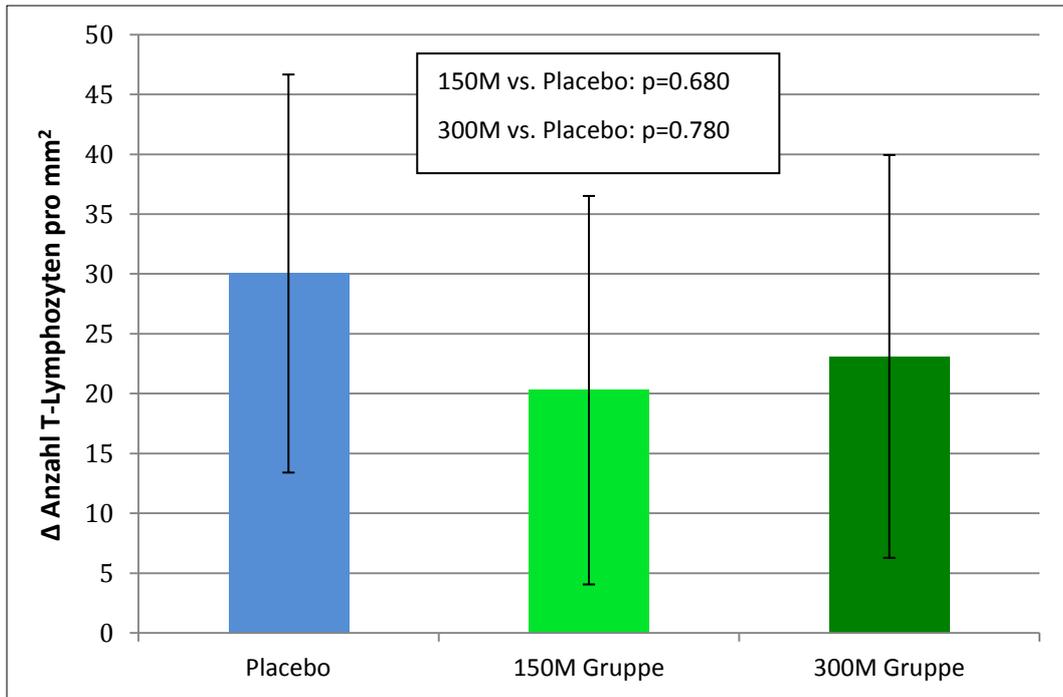


Abbildung 20: Veränderung der Anzahl der T-Lymphozyten des GM pro mm² ±SE von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

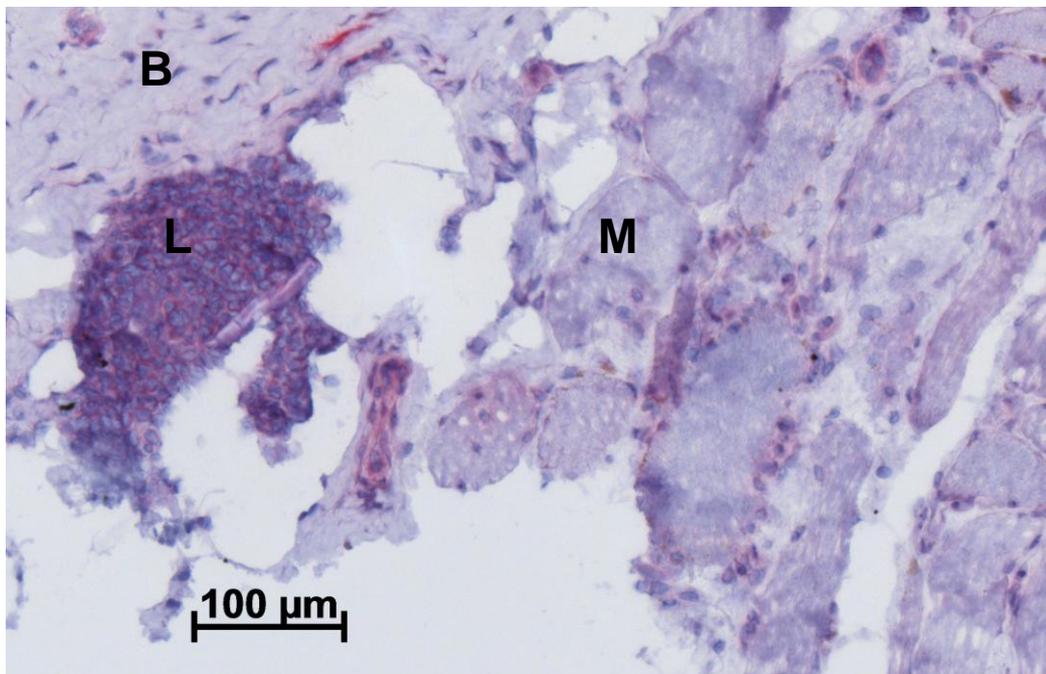


Abbildung 21: Darstellung eines Lymphozytenclusters (L) am Übergang von Bindegewebe (B) zum Muskelgewebe (M) (200fache Vergrößerung).

5.3.6 Einfluss der PLX Zellen auf die Makrophageninfiltration

12 Wochen postoperativ veränderte sich die Infiltration von Makrophagen nur geringfügig. Die Placebogruppe hatte mit $+2,8 \pm 1,2$ Makrophagen/ mm^2 den größten Anstieg. In der 150M Gruppe gab es eine Änderung von $+1,0 \pm 1,2$ Makrophagen/ mm^2 . Die 300M Gruppe lag mit $+1,9 \pm 1,2$ Makrophagen/ mm^2 zwischen den anderen untersuchten Gruppen (Abb. 22). Signifikante Unterschiede zwischen den Therapiegruppen und der Placebogruppe konnten nicht festgestellt werden (150M vs. Placebo $p=0.287$; 300M vs. Placebo $p=0.570$).

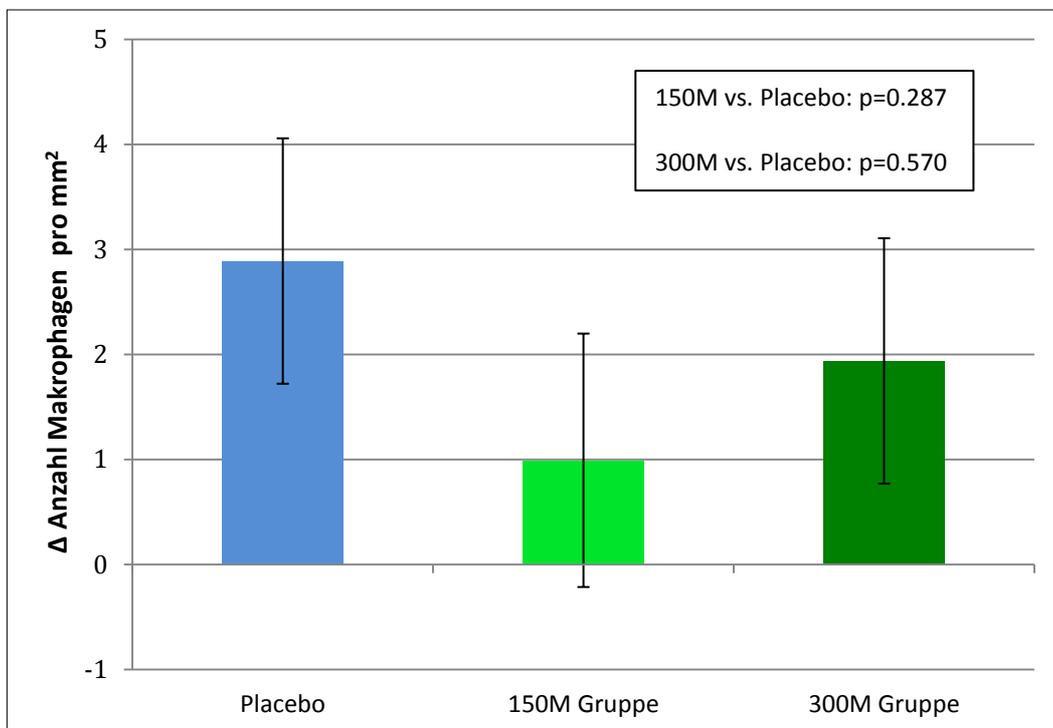


Abbildung 22: Veränderung der Anzahl der Makrophagen pro $\text{mm}^2 \pm \text{SE}$ von Tag 1 (Baseline) zur Woche 12 in der Kontroll- und den Therapiegruppen.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals in einer klinischen Studie der Einfluss von PLX Zellen auf ein Skelettmuskeltrauma anhand von morphologischen Veränderungen untersucht. Dabei konnte in der makromorphologischen Untersuchung der Muskelvolumina ein signifikanter Unterschied zwischen der Low-dose (150M) Therapiegruppe und der Placebogruppe 26 Wochen postoperativ festgestellt werden. In der 300M Gruppe konnte demgegenüber kein Unterschied zum Placebo nachgewiesen werden. Alle anderen morphologischen Parameter (Makro- und Mikrostruktur) der Therapiegruppen wiesen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Placebogruppe auf. Damit kann die Alternativhypothese nur für den Parameter Muskelvolumen und der 150M Gruppe bestätigt werden. Für alle anderen Parameter ist die Nullhypothese zu unterstützen.

6.1 Beurteilung der Makromorphologie

Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren konnte bereits in einigen Studien dargestellt werden, dass der invasive Eingriff einer HTEP zu Veränderungen der periartikulären Muskulatur führt^{1,9,124-127}. Besonders die Beurteilung des GM als wichtigster Stabilisator des Hüftgelenks ist von großer Relevanz. Vorzugsweise bei symptomatischen Patienten mit Einschränkungen des Gangbildes oder postoperativen Schmerzen finden sich hierbei Schäden im GM, die durch eine Muskelatrophie oder fettige Infiltrate gekennzeichnet sind¹¹. Um Veränderungen des kontraktiven Gewebes der Glutealmuskulatur nach einer Hüftprothesenimplantation zu evaluieren, bestimmten Müller et al.¹²⁴ in ihrer Studie die Querschnittsfläche des GM in einer definierten axialen MRT-Aufnahme im unteren Drittel der Verbindungslinie zwischen Beckenkamm und Trochanter Spitze. Anschließend verglichen sie präoperative Werte mit Aufnahmen zu den Zeitpunkten 3 Monaten und 12 Monaten postoperativ. Ziel der Studie war es, mögliche Unterschiede zwischen einem transglutealen und einem minimal-invasiven anterolateralen Zugang auf den GM zu untersuchen. Sowohl nach 3 als auch nach 12 Monaten postoperativ kam es in beiden Gruppen nur zu geringen Veränderungen der Querschnittsfläche. Zwar konnte man nach 12 Monaten beim transglutealen Zugang eine leichte Atrophie zur Baseline feststellen, diese war jedoch nicht signifikant¹²⁴.

In der vorliegenden Arbeit zur Analyse des Einflusses der PLX bei einem transglutealen Zugang untersuchten wir nicht nur die Querschnittsfläche einer einzelnen Aufnahme, sondern verwendeten alle im MRT identifizierten Querschnitte für eine Berechnung des Muskelvolumens, um die Muskelmasse zu quantifizieren. Der signifikante Zuwachs des Muskelvolumens in der 150M Gruppe nach 26 Wochen bildet die Hauptaussage der morphologischen Untersuchungen dieser Studie. Interessanterweise korrelieren diese Daten stark mit den Ergebnissen der in dieser Studie durchgeführten funktionellen Analysen (NCT01525667). Die mittels Dynamometer (Biodex 3 Pro, Biodex Medical System Inc., New York, USA) gemessene isometrische Maximalkraft des verletzten GM zeigte gleichermaßen nach 26 Wochen den größten Anstieg in der 150M Gruppe, welcher im Vergleich zum Placebo ebenfalls signifikant war. Die 300M Gruppe erreichte in der Kraftanalyse analog zur Untersuchung des Muskelvolumens Werte zwischen dem Placebo und der 150M Gruppe. Die Zunahme des Muskelvolumens unter der Zelltherapie könnte eine Erklärung für den Kraftzuwachs sein, da das Volumen ein wichtiger Faktor für die mechanische Leistung eines Muskels ist ¹²⁸. Grabowska et al. ¹¹⁴ wiesen schon 2012 in ihrem Tierexperiment darauf hin, dass MSC das Potential besitzen, die Muskelmasse verletzter Skelettmuskulatur zu steigern. In ihrem Mausmodell wurde der Musculus Gastrocnemius durch eine Cardiotoxininjektion geschädigt und anschließend 1×10^6 MSC aus humaner Nabelschnur transplantiert. Für die Kontrollgruppe wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet. Nach einem 14-tägigen Regenerationsprozess wurde der Muskel isoliert und sein Gewicht ermittelt. Übereinstimmend zu unseren Ergebnissen konnte unter der Zelltherapie eine signifikant höhere Muskelmasse festgestellt werden ¹¹⁴.

Neben der Untersuchung der Muskelvolumina lassen sich mit Hilfe hochwertiger MRT-Bilder auch Aussagen über die Binnenstruktur des GM und der fettigen Infiltration treffen. Da für die Degeneration der Hüftmuskulatur kein eigenes Klassifikationssystem existiert, nutzten viele Studien die 1994 von Goutallier ¹²⁹ etablierte Klassifikation, um den muskulären Fettgehalt zu quantifizieren ^{9,11,125,127,130}. Diese wurde ursprünglich für eine computertomographische Beurteilung der fettigen Atrophie der Rotatorenmanschette entwickelt und besteht aus folgenden Stufen: Grad 0 – Kein Fett, Grad 1 – Muskel enthält wenige Fettstreifen, Grad 2 - weniger Fett als Muskelmasse, Grad 3 – Fettige Atrophie und Muskelmasse identisch, Grad 4 – mehr fettige Atrophie als Muskelmasse ¹²⁹. Engelken et al. ¹²⁷ zeigten auch für die Anwendung auf die Glutealmuskulatur eine hohe Reliabilität dieser Methode. Die vorliegende Studie

bedient sich hingegen der Methode einer exakten prozentualen Beurteilung der fettigen Atrophie, wie nach von Roth et al. ¹ beschrieben, um präzise Daten für die Gruppenvergleiche zu erhalten. Die präoperativen Werte des gesamten Fettanteils mit 3,7% in der Placebogruppe, 6,8% in der 150M Gruppe und 3,3% in der 300M Gruppe sind vergleichbar mit den Daten von von Roth et al. ¹. In deren Studie zeigten die 15 untersuchten Patienten zur primären HTEP eine durchschnittliche fettige Atrophie des Gesamtmuskels von 3,6%. Ein postoperativer Anstieg des Fettgehalts nach 26 Wochen auf 11,5%, wie er bei von Roth et al. ¹ festgestellt wurde, konnte in unserer Studie allerdings in keiner Gruppe gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit veränderten sich die fettigen Infiltrate nur minimal, was für einen sehr guten postoperativen Verlauf spricht. Während sich der prozentuale Fettgehalt in der Placebo- und der 300M Gruppe nur um 1,8% und 2,5% erhöhte, erreichte die 150M Gruppe nach 26 Wochen fast wieder die Baseline-Werte. Zu erwähnen ist aber, dass die 150M Gruppe zum Tag 1 bereits mit einem höheren Ausgangswert von $6,8 \pm 7,2\%$ gestartet ist. Insofern erreichten alle Gruppen nach 26 Wochen ungefähr das gleiche Niveau. Betrachtet man den postoperativen prozentualen Fettgehalt in den einzelnen drei untersuchten Segmenten des GM (anterior, medius, posterior) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, so fällt auf, dass sich das iatrogene Muskeltrauma vor allem auf die vorderen beiden Segmente auswirkt (Tabelle 4). Der posteriore Anteil war meist weniger betroffen. Diese Beobachtung entspricht auch Ergebnissen der Studie von von Roth et al.¹ und Pfirrmann et al. ¹¹, bei deren Betrachtung des GM nach einer Traumatisierung durch einen transglutealen Zugang der posteriore Teil überwiegend verschont geblieben ist. Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass die nachgewiesene Volumenzunahme des GM in der 150M Gruppe ohne Anstieg des Fettgehaltes einherging und auf der Zunahme kontraktiles Muskelgewebes beruht. Die Volumenzunahme könnte somit eine Ursache für den oben beschriebenen Zuwachs in der isometrischen Maximalkraft sein und einen möglichen Wirkmechanismus der PLX Zellen darstellen.

6.2 Beurteilung der Mikromorphologie

Um die Wirkweise der PLX Zellen besser zu verstehen, ist eine vergleichende Analyse der Mikrostruktur zu den gemessenen Veränderungen auf makrostruktureller Ebene von großer Relevanz. Die mikrostrukturelle Beurteilung dient vor allem dazu,

histologische Veränderungen zu finden, die den Effekt einer Volumenzunahme erklären. Hier muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass es sich bei den Biopsien um Feinnadelbiopsien einer umschriebenen Muskelregion handelt, welche zwar als repräsentativ angesehen werden können, trotzdem aber nur einen kleinen Ausschnitt aus dem Gesamtmuskel darstellen.

Die Größe von Muskelfasern und die Position der Kerne können als Marker für regenerierende Muskelfasern verwendet werden. Während sich in der frühen Phase der Regeneration die Kerne noch zentralständig befinden, kommt es erst im weiteren Reifeprozess zu einer Wanderung in die Peripherie. Gleichzeitig nimmt die Größe der Muskelfasern während der Reifung zu³⁸. Aufgrund dieser Tatsache benutzen viele Studien dieses Phänomen, um das Regenerationspotential von MSC quantitativ zu untersuchen^{97,131-133}. In unserer Analyse 12 Wochen postoperativ zeigte sich ein mikromorphologisches Muster, welches in den Ergebnissen der Volumen- als auch der Kraftanalyse ein Korrelat fand. Die Placebogruppe wies eine Verringerung des Faserdurchmessers sowie einen Anstieg der Regeneratfasern auf. Beides sind Hinweise darauf, dass in dieser Gruppe die Regeneration der Muskulatur noch andauert. In den Therapiegruppen konnten nur marginale Unterschiede zur Baseline beobachtet werden, was mit einer bereits abgeschlossenen Regeneration erklärt werden kann. Somit könnte man annehmen, dass der Volumen- und Kraftzuwachs auf einen schneller ablaufenden Regenerationsprozess zurückführbar ist. Schon Ninagawa et al.¹³² konnten in ihrem Mausexperiment an verletzter Tibialis anterior Muskulatur eine schnellere Genesung in den morphologischen Parametern unter der Therapie mit MSC nachweisen. Anstatt von PLX Zellen wurden dagegen embryonale MSC (E-MSC) und nicht adulte MSC verwendet. In den histologischen Analysen von Ningawa et al. wurde nicht der Faserdurchmesser bestimmt, sondern als Äquivalent für die Größenentwicklung die totale Querschnittsfläche an Muskelfasern. In ihrem Experiment erreichte die mit E-MSC behandelte Muskulatur drei Wochen nach der Schädigung fast eine vollständige Erholung. Die Gesamtquerschnittsfläche stieg auf den Wert nichtgeschädigter Fasern an und auch die zentralständigen Kerne, die nach einer Woche erstmals sichtbar wurden, waren kaum noch vorhanden. In der Kontrollgruppe ohne Zelltherapie konnte in diesem Zeitraum nicht die gleiche Fasergröße und -reife erreicht werden. Sogar nach 4 Wochen zeigten die Muskelfasern keine vollständige Genesung¹³². In einer Untersuchung mehrfach verletzter Soleusmuskulatur der Ratte konnten Andrade et al.¹³³ ebenfalls eine schnellere Regeneration unter der Therapie

von BMMSK nach 4 Wochen nachweisen. Obwohl beide Studien einen abgeschlossenen Reparaturprozess bereits nach 4 Wochen feststellten, zeigte eine Studie von Natsu et al.⁹⁷, dass selbst 12 Wochen nach einem Muskeltrauma noch Fasern mit zentralständigen Kernen nachzuweisen sind. Untersucht wurde der Einfluss von BMMSK auf lazerierte Tibialis anterior Muskulatur. Besonders in den frühen Stadien begünstigten die BMMSK die Reifung von Muskelfasern, sodass nach circa einem Monat eine funktionelle Wiederherstellung der Kraftverhältnisse erreicht wurde. Histologische Untersuchungen zur Langzeitwirkung stellten in der mit BMMSK therapierten Gruppe nach 12 Wochen keine Fasern mehr mit zentralständigen Kernen fest. In den Kontrollgruppen fanden sich wiederum analog zu unseren Ergebnissen nach 12 Wochen noch Regeneratfasern⁹⁷. Vergleichende Aussagen zu anderen klinischen Studien im Humanen sind kaum möglich. Einzig Hogendoorn et al.¹³¹ beschrieben 2014 eine ähnliche Analyse von regenerierenden Fasern in einer Humanstudie. In ihrer Pilotstudie untersuchten sie die Anwendung autologer BMMSK zur Therapie partiell denervierter Bizepsmuskulatur an 9 Patienten mit unterschiedlicher Dosierung. Nach 12 Wochen kam es zu einem signifikanten Anstieg des Faserdurchmessers von 80% des Baselinewertes. Die Anzahl der Fasern mit zentralständigen Kernen stieg ebenfalls, jedoch nicht signifikant¹³¹. Gegenüber unserer Studie beruhen die Baselinewerte bei Hogendoorn et al. auf bereits atrophierte Muskulatur der Patienten und nicht auf gesunden Muskelfasern, sodass ein Vergleich der Faserentwicklungen nur bedingt aussagekräftig ist.

Allgemein können Muskelfasern histochemisch wie folgt eingeteilt werden: Typ I (langsam zuckend, „slow-twitch“) und Typ II (schnell zuckend, „fast-twitch“). In der Entwicklung von Muskelfasern wird die Ausbildung eines bestimmten Fasertypes durch die Innervation verschiedener Motoneuronen und innervationsunabhängiger Signale angeregt¹³⁴. Zudem werden die Typ-II-Fasern noch in weitere Subkategorien IIA, IIB, IIX gegliedert, basierend auf unterschiedliche Isoformen der schweren Kette des Myosins¹³⁵. Die Typ-I-Fasern sind ermüdungsresistent und besitzen eine eher geringe Kontraktionsgeschwindigkeit. Ihr Vorkommen ist ubiquitär, jedoch mit einer größeren prozentualen Verteilung in der Haltemuskulatur. Dahingegen verfügen Typ-II-Fasern über eine hohe Kontraktionsgeschwindigkeit und erreichen höhere Werte in der Maximalkraft¹³⁶. In einer Vorstudie zu dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass der Zuwachs der Maximalkraft verletzter Soleusmuskulatur unter der Therapie von BMMSK von einem Wechsel zu mehr Typ-II-Fasern 4 Wochen nach Transplantation

begleitet war ⁹³. Ein solcher Fasertypwechsel könnte ein potentieller Wirkmechanismus der MSC für den Kraftzuwachs sein. Die präoperativen Werte des Typ-II-Anteils der Patienten unserer Studie betragen 25,2% (Placebo), 34,6% (150M Gruppe) und 25,1 % (300M Gruppe). Ergebnisse einer Untersuchung von 1980 über die Fasertypverteilung der Hüftmuskulatur bei Patienten mit Koxarthrose ergaben mit 25,6% (<65 Jahre) und 26,8% (>65 Jahre) ähnliche Werte. Dabei liegen diese Prozentzahlen deutlich unter den bei jungen gesunden Probanden gemessenen Typ-II-Anteil von 54% im GM. Dafür wird die zunehmende physische Inaktivität aufgrund der Arthrose verantwortlich gemacht ¹³⁷. Entgegen der präklinischen Studie kam es in unserer Studie nach 12 Wochen in allen Gruppen nur zu minimalen Veränderungen des Faseranteils. Die oben beschriebene festgestellte höhere isometrische Maximalkraft der 150M Gruppe nach 26 Wochen lässt sich somit nicht auf Basis einer veränderten Fasertypverteilung 12 Wochen postoperativ erklären. Insgesamt ist die Veränderung der Fasertypverteilungen nach Verletzungen der Skelettmuskulatur in der Literatur kontrovers beschrieben. 2007 untersuchten Matsuura et al. ¹³⁸ die Soleusmuskulatur von Mäusen nach einem toxininduzierten Muskeltrauma ebenfalls über einen Zeitraum von 12 Wochen. Hervorzuheben ist, dass sie die Muskulatur zu mehreren Zeitpunkten (2, 4, 8, 12 Wochen) beurteilten, sodass sie konkret den Verlauf beleuchten konnten. Neben der histochemischen Einteilung in Slow-(I)- und Fast-(II)-Fasern analysierten sie auch Hybridfasern mit einer Expression beider Formen von Myosinketten. Innerhalb der 12 Wochen sank der Typ-II-Anteil von 53% auf 14% und die Typ-I-Fasern dominierten schließlich mit 79%. Der Anteil der Hybridfasern stieg innerhalb des Untersuchungszeitraumes kurzfristig, sank aber nach 12 Wochen wieder auf ein Niveau der Baseline um die 10%. Matsuura et al. vermuteten, dass die Expression des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Coactivator-1 α eine wichtige Rolle für die calciumabhängigen Signalwege spielt, die relevant sind für Genexpression von langsamen Typ-I-Fasern und somit eine Konversion der Fasertypverteilung triggern könnten. Mit dieser Auffassung überprüften sie die Expression mittels Western Blot und immunhistochemischen Färbungen in den histologischen Präparaten. Hierbei zeigte sich parallel zum Typ-I-Faseranstieg eine Zunahme des Proteins Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Coactivator-1 α ¹³⁸. Mendler et al. ¹³⁴ beobachteten hingegen einen komplett anderen Verlauf der Fasertypverteilung nach einem Muskeltrauma. Die Arbeitsgruppe analysierte 2008 gleichermaßen die Soleusmuskulatur in ihrer tierexperimentellen Studie. Dabei widmeten sie sich vor allem den Prozessen der Reinnervierung der Muskulatur.

Zunächst resezierten sie in ihrem Rattenexperiment ein 12 mm Abschnitt des N. ischiadicus, der anschließend chirurgisch rekonstruiert wurde. Nach einem Heilungsprozess von 3 Monaten induzierten sie in der reinnervierten Muskulatur mittels Noxetin ein Muskeltrauma. Vergleichbar zu der präklinischen Studie von von Roth et al.⁹³ zeigte die reinnervierte Soleusmuskulatur eine Dominanz und schnellere Genesung der Typ-II-Fasern gegenüber der Typ-I-Fasern sowohl 3 Monate nach der Reinnervierung des Ischiasnerv, als auch nach dem weiteren Beobachtungszeitraum von einem Monat. Als eine mögliche Erklärung dieses Phänomens gehen Mendler et al. davon aus, dass die Regeneration von Typ-II-Fasern schneller erfolgen kann, da ihre Genese auch innervationsunabhängig im Gegensatz zu den langsamen Typ-II-Fasern abläuft¹³⁴. Aufgrund der kontroversen Ergebnisse sind zukünftige Studien, die sich den zugrunde liegenden Mechanismen der verschiedenen Fasertypverteilungen nach einem Muskeltrauma widmen, wünschenswert. Zudem verwendeten die Studien von Matsuura et al.¹³⁸ und Mendler et al.¹³⁴ chemische Toxine zur Induktion des Traumas, was die Vergleichbarkeit zu einer mechanischen Verletzung wie in dieser Arbeit am GM zusätzlich vermindert. Daher sollten zunehmend auch gezielt mechanische Traumata untersucht werden.

Wie schon für PMSC beschrieben, ist auch bei PLX Zellen durch die Sekretion von trophischen Faktoren der parakrine Wirkmechanismus von vorrangiger Bedeutung¹⁰⁹⁻¹¹¹. Speziell der angiogene Effekt der PLX Zellen macht sie attraktiv für die Unterstützung der Geweberegeneration verschiedener Erkrankungen, da das Aussprossen neuer Gefäße entscheidend für die nutritive Versorgung des Gewebes ist⁵⁵. Sowohl in der Studie zur CLI als auch zum Myokardinfarkt resultierte eine größere Gefäßdichte nach der Zelltherapie^{115,120}. Nach der Untersuchung der Gefäßdichte in dieser Studie lässt sich zwar ein Anstieg der Gefäßdichte nach dem Muskeltrauma bestätigen, nicht aber speziell für die mit PLX Zellen therapierten Gruppen. Da keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Placebo erkennbar waren, lässt sich mit dieser Arbeit kein angiogener Effekt der PLX Zellen nachweisen. Hervorzuheben ist, dass die Sekretion des Faktors VEGF von PLX Zellen, welcher an der Angiogeneese beteiligt ist, vor allem unter hypoxischen Bedingungen verläuft^{120,122}. Da eine Inzision der Skelettmuskulatur wie in unserem Traumamodell der HTEP kein ischämisches Mikromilieu bewirkt, könnte die Art der Verletzung Grund für den fehlenden Effekt sein. Schon im Rattenmodell unserer Arbeitsgruppe ließ sich kein signifikanter Anstieg der

Gefäßdichte nach Injektion von BMSC nach einem Crushtrauma der Ratte nachweisen⁹⁵.

Für die Wirkweise der PLX Zellen sind neben der Ausschüttung von trophischen Faktoren deren immunmodulatorischen Eigenschaften von Interesse. Gerade im Hinblick auf die Makrophagen und T-Zellen, die als wichtige Zellpopulationen während der Muskelregeneration agieren, ist deren histologische Untersuchung aufschlussreich. Ein großer Vorteil der Zelltherapie mit PLX Zellen ist deren geringe Immunogenität im Empfänger. In bisherigen Arbeiten schien aufgrund der geringen Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR und der Modulation wichtiger Checkpoints der T-Zell-Aktivierung eine allogene MHC-inkompatible Nutzung ohne immunologische Reaktionen durchführbar^{115,120,139}. In der Aufarbeitung der Phase-I-Studie der Anwendung von PLX Zellen zur CLI konnte trotz des HLA-Mismatch keine T-Zell-Stimulierung durch die PLX Zellen nachgewiesen werden¹³⁹. Als mögliche Ursache könnte ein verändertes Zytokinprofil von immunologischen Zellen, wie den dendritischen Zellen oder den natürlichen Killerzellen, die Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen haben, in Frage kommen. So zeigten Consentius et al.¹³⁹ 2015 in ihrer Studie bei einer Ko-Kultur von BMSC und myeloiden dendritischen Zellen eine immunsuppressive Konstellation mit niedrigen IL-12 und IL-1b sowie hohen IL-10 und IL-1RA Spiegel. Ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil mit hohen IL-10 Spiegel konnte schon Roy et al.¹²⁰ bei einer Ko-Kultur von PLX Zellen und mononukleären Zellen in-vitro nachweisen. Außerdem konnte in selbiger Studie die Proliferation aktivierter T-Zellen in Anwesenheit von PLX Zellen in einer dosisabhängigen Weise gehemmt werden¹²⁰. In unserer Studie wurde die Anwesenheit von Makrophagen und T-Lymphozyten 12 Wochen postoperativ evaluiert. Obwohl diese Zellen vor allem das Anfangsstadium der Regeneration (Inflammation/ Degeneration) prägen, fanden wir überraschenderweise selbst nach 12 Wochen in allen Gruppen einen Anstieg der T-Lymphozyten gegenüber der Baseline. Dies spricht für ein langanhaltendes Entzündungsgeschehen nach der Traumatisierung des GM. Dass dieser Anstieg in der Placebogruppe ebenfalls vorhanden ist und es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gibt, weist darauf hin, dass es sich dabei nicht um eine Abwehrreaktion gegen die PLX Zellen handelt, sondern um ein generelles unspezifisches Entzündungsgeschehen im Rahmen der Regeneration nach der HTEP-Implantation. Zwar findet sich in der 150M und der 300M Gruppe im Vergleich zum Placebo ein etwas geringerer Anstieg, aufgrund der fehlenden Signifikanz lässt sich

dieser Unterschied aber nicht sicher den oben beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften der PLX Zellen zuordnen.

Im Unterschied zu den T-Lymphozyten kam es in der Untersuchung der Makrophagen 12 Wochen postoperativ nur zu mäßigen Veränderungen der Gewebeeinfiltration. Dennoch zeigt sich ein ähnliches Muster in den Behandlungsgruppen (Abb. 19, 21). Der größte Anstieg fand sich erneut in der Placebogruppe. Der Wert der 300M Gruppe lag ebenso zwischen dem Placebo und der 150M Gruppe. Das einheitliche Verteilungsmuster bei den T-Zellen und den Makrophagen könnte auf gegenseitige Interaktionen hinweisen, die zwischen den beiden Leukozytengruppen bestehen. So ist beispielsweise in der frühen Regenerationsphase die Aktivierung der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen noch durch Zytokine der T1-Helfer Zellen geprägt, während bei den anti-inflammatorischen M2-Makrophagen Zytokine der T2-Helfer Zellen dominierend sind ²⁷. Auch die Beobachtungen eines von Treg beeinflussten Phänotypenwechsels der Makrophagen zeigen ein komplexes Wechselspiel beider Leukozytengruppen in der Muskelregeneration ^{31,32}. Hierbei ist zu erwähnen, dass die in dieser Studie verwendete CD68-Antigen-Antikörper-Reaktion sowohl den Phänotyp M1 als auch M2 markiert, sodass keine weiteren Aussagen darüber getroffen werden können, welcher Subtyp von Makrophagen in unserer Untersuchung postoperativ dominiert. Betrachtet man die Tatsache, dass die Anzahl der Makrophagen 12 Wochen postoperativ nur geringfügig von den Baseline-Werten abweicht, könnte dies wiederum für eine fast abgeschlossene Regeneration mit Regression der Inflammation sprechen. Hierbei ist der Rückgang der lymphozytären Infiltrate anscheinend noch ausstehend.

Leider gibt es derzeit keine anderen Studien, die den Einfluss von PLX Zellen auf die Immunologie nach morphologischen Parametern in ähnlicher Form untersuchen, sodass hierzu keine vergleichenden Aussagen getroffen werden können. Jedoch existieren für andere PMSC vereinzelt tierexperimentelle Studien, die eine Inflammation unter der Zelltherapie im Muskelgewebe bei verschiedenen Krankheitsbildern histologisch analysieren ^{112,140}. Dabei wird in der Literatur bereits eine Dezimierung von Immunzellen unter PMSC-Therapie beschrieben. Bei Zhang et al. ¹¹² bewirkte die intramuskuläre Transplantation von allogenen PMSC bei einer iatrogen erzeugten Hinterlaufischämie der Maus eine signifikant verminderte Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen im Muskelgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe 72 Stunden nach Ligatur der Gefäßversorgung. Passend dazu waren auch die pro-inflammatorischen Zytokinlevel von TNF- α und IL-6 reduziert ¹¹². Zu einem späteren Zeitpunkt nach einer

Intervention untersuchten Ishikane et al.¹⁴⁰ die Infiltration von Makrophagen und T-Zellen im Herzmuskelgewebe bei Anwendung von allogenen PMSC aus dem Amnionepithel bei einer experimentell erzeugten Myokarditis der Ratte. Nachdem eine autoimmune Myokarditis durch ein spezielles Immunisierungsverfahren eingeleitet wurde, erfolgte am Tag 7 eine systemische Applikation der PMSC oder eines Placebos durch eine intravenöse Gabe und erst am Tag 21 eine histologische Analyse des Herzmuskelgewebes als zielführende Untersuchung. Unter der Zelltherapie kam es sowohl zur Reduzierung der Makrophagen- als auch der T-Zelleninfiltration¹⁴⁰. Betrachtet man die Zeitpunkte der histopathologischen Befundung in beiden beschriebenen Studien, fällt auf, dass diese im Vergleich zur vorliegenden Skelettmuskelstudie deutlich früher stattfanden. Eine Analyse wie in dieser Arbeit nach 12 Wochen ist bisher einmalig. Es ist durchaus möglich, dass die PLX Zellen in unserer Studie während der frühen Regenerationsphase nach der HTEP-Implantation in gleicher Weise eine Immunmodulation hervorgerufen haben, diese aber nach 12 Wochen kaum noch zu erkennen ist.

6.3 Beurteilung der Dosierung

Die Betrachtung der Ergebnisse wirft die Frage auf, warum die 150M Gruppe signifikante Unterschiede in der Volumenzunahme zum Placebo zeigt, die 300M Gruppe aber paradoxerweise nicht. Dieses Phänomen zeigt sich ebenso bei der funktionellen Untersuchung der isometrischen Maximalkraft, in der sich die 300M Gruppe als unterlegen erwies und Werte zwischen denen der Placebogruppe und der 150M Gruppe erreichte. Nach der Vorstudie von Winkler et al.⁹⁴ über die Dosierung von BMMSC im Crushmodell der Ratte wäre mit steigender Dosis auch ein besseres Outcome zu erwarten. Zwar beschränkt sich im Rattenmodell die maximale Dosis auf 10^7 Zellen und liegt damit unter der hier verwendeten High-Dose von 300×10^6 Zellen, ist aber in dem tierexperimentellen Setting im Bezug auf das Körpergewicht der Ratte eine relevante Hochdosis. Die 300M Gruppe erreicht in den anderen Endpunkten (Faserdurchmesser, Anzahl der Regeneratfasern, T-Lymphozyten und Makrophagen) ebenso Werte zwischen dem Placebo und der 150M Gruppe. Dies lässt vermuten, dass eine hohe Zelldosis zur Limitation der Wirksamkeit in der Regeneration führen kann. Dieser Sachverhalt wird auch in anderen Arbeiten zu Dosierungseffekten von MSC beschrieben^{110,141-143}. Als eine mögliche Ursache werden in der Literatur nutritive

Engpässe der Zellen bei hohen Zelldosen geschildert, woraus sowohl Einschränkungen für die Funktion als auch für das Zellüberleben resultieren. Schließlich müssten bei einer Erhöhung der Konzentration der Zellen um das Doppelte bei gleichem Volumen doppelt so viele Zellen versorgt werden. Andererseits könnte eine hohe Anzahl injizierter MSC zu einer übermäßigen lokalen immunologischen Reaktion führen, die mit einer Abräumung oder Deaktivierung der MSC einhergeht ¹⁴¹. Unter anderem untersuchten Saether et al. ¹⁴³ 2014 die Anwendung von allogenen BMMSC zur Therapie eines traumatisierten Ligaments der Ratte mit zwei unterschiedlichen Dosierungen (Low-dose, High-dose). Klinisch zeigte sich eine geringere Wundgröße unter der Low-dose Therapie. Zusätzlich entdeckten sie unter der Hochdosistherapie hohe Level der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-2 und Interferon (IFN)-gamma und einen Rückgang von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen, sodass sie vermuteten, dass der Nutzen der BMMSC dosisabhängig ist ¹⁴³. Als weitere Ursache einer Immunreaktion unter Hochdosistherapie von MSC befürchteten Schu et al. ¹⁴⁴ 2012, dass es trotz der bisher nachgewiesenen immunprivilegierten Eigenschaften der MSC gerade bei allogener Transplantation mit hohen Dosen zur Ausbildung von Alloantikörpern kommen kann. Die Aufarbeitung der immunologischen Daten aus den Blutproben der Studienteilnehmer unserer Studie zu den PLX Zellen zeigt diesbezüglich ebenso ein interessantes Phänomen. In der 300M Gruppe kam es 6 Wochen postoperativ zu einem späten IL-10 Anstieg, welcher möglicherweise als Gegenregulation einer anhaltenden Inflammation interpretiert werden kann. Gleichzeitig war in der ELISA-Untersuchung die IFN-gamma Sekretion von T Zellen erhöht, ein wichtiges Zytokin in der Aktivierung der zellulären Immunabwehr. Sowohl in der Placebogruppe als auch in der 150M Gruppe konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden (NCT01525667). Die Ursachen dieser komplexen Reaktionen auf das Zellprodukt sind bisher nicht geklärt. Somit sollten bei zukünftigen Anwendungen von PLX Zellen in weiteren klinischen Studien die Dosierungseffekte konkreter untersucht werden.

6.4 Methodenkritik

Das in dieser Studie angewandte Studiendesign einer randomisierten placebo-kontrollierten doppelblinden Studie weist die höchste wissenschaftliche Evidenz auf und ist besonders geeignet, um neue Behandlungsmethoden in der Medizin auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Die Wahl der Dosierung von 150 beziehungsweise 300

Millionen PLX Zellen in unserem Setting basiert auf den klinischen Studien zur CLI (NCT00951210, NCT00919958) sowie auf den vorliegenden präklinischen Versuchen. In den Human-Studien wurden Dosierungen bis zu 600×10^6 Zellen ohne schwerwiegende unerwünschte Ereignisse appliziert. Die Verwendung des Placebos für die Kontrollgruppe ist ethisch vertretbar, da aktuell kein spezifisches Therapieregime für Muskelschäden nach HTEP zur Verfügung steht. Den Patienten wurde daher keine wirksame Therapie vorenthalten.

Die größte Limitation dieser Studie ist wahrscheinlich die Größe der Studienpopulation von 20 Patienten. Da es sich bei dieser Studie primär um eine Phase I Studie (NCT01525667) handelte, war vor allem die Sicherheit der humanen Anwendung von PLX Zellen ein wesentlicher Punkt. Das rechtfertigt die Beschränkung zunächst auf eine niedrige Fallzahl. Aufgrund dieser geringen Anzahl sind aber statistische Aussagen stark eingeschränkt. Möglicherweise könnten weiterführende Studien mit größeren Fallzahlen zu weiteren signifikanten Ergebnissen kommen und die Tendenzen, die sich in dieser Studie gezeigt haben, bestätigen. Diese könnten im Vergleich zu dieser Arbeit auch multizentrisch durchgeführt werden.

Bei der Betrachtung der demographischen Charakteristika fällt auf, dass die Geschlechter in den Gruppen ungleich verteilt sind. Die Frauen sind dominierend in der Placebogruppe vertreten, die Männer in der 300M Gruppe. Diese Verteilung spiegelt sich auch analog in den Muskelvolumina zum Studienbeginn wieder (Abb. 11). Die eher männlich repräsentierte 300M Gruppe besitzt ein größeres Muskelvolumen als die anderen Gruppen. Die Imbalance der präoperativen Muskelmassen von Männern und Frauen wird als Erklärungsmodell für unterschiedliche Heilungsverläufe zwischen den Geschlechtern nach Hüftgelenkersatz benutzt. Ein intraoperativ entstandener Muskelschaden kann durch mehr Muskelmasse und bessere Hebelarmverhältnisse bei Männern besser kompensiert werden¹⁴⁵. Somit hätte man in der 300M Gruppe bessere Untersuchungsergebnisse unabhängig von der Dosierung erwarten können. Da in unserer Studie die positiven Effekte aber vor allem in der 150M Gruppe und nicht in der 300M Gruppe zu finden waren, relativiert sich dieser Bias. In anderen demographischen Parametern (Alter, BMI) finden sich kaum Unterschiede, sodass hier von homogenen Verhältnissen ausgegangen werden kann.

Die rehabilitativen Maßnahmen nach dem Gelenkersatz sind von enormer Relevanz für die funktionelle Genesung¹⁴⁶. In dieser Studie war die Frührehabilitation während des stationären Aufenthaltes und die Anschlussheilbehandlung im Medical Park

Humboldtmühle Berlin für alle Patienten standardisiert. In dieser frühen postoperativen Phase herrschten daher gleiche Bedingungen. Inwiefern die Studienteilnehmer nach der Anschlussheilbehandlung weitere Übungen zur Kraftsteigerung und Mobilisation im häuslichen Umfeld durchgeführt haben ist ungewiss. Hierzu gibt es keine vergleichende Dokumentation beziehungsweise Überprüfungen der Compliance. Individuelle Unterschiede des Trainings könnten daher die Ergebnisse speziell für die späteren Untersuchungszeitpunkte nach 12 oder 26 Wochen beeinflusst haben.

Allgemein ist die Wahl der optimalen Messzeitpunkte differenziert zu betrachten. Die für die makromorphologischen Untersuchungen verwendete MRT als nichtinvasives Verfahren ist ausgezeichnet geeignet für mehrmalige Anwendungen, sodass durch die Zeitpunkte 6, 12 und 26 Wochen postoperativ sowohl die Früh- als auch die Langzeitwirkung untersucht werden konnte. Primäre Endpunkte für die Gruppenunterschiede in dieser Arbeit waren jedoch die Langzeitergebnisse nach 26 Wochen, da diese für das Outcome die größte Relevanz haben. Für die Auswertung der Mikromorphologie verwendeten wir Stanzbiopsien die mittels bereits beschriebener Methode gewonnen wurden. Um die Belastung für die Patienten so gering wie möglich zu halten, beschränkte sich die postoperative Messung auf eine Biopsie. Die Entscheidung, den Messzeitpunkt 12 Wochen postoperativ zu wählen, ist dabei ein Kompromiss zwischen der Analyse der frühen und der späten Regenerationsphase. Ein Überblick über den Verlauf der gemessenen histologischen Parameter wäre wünschenswert, da eine Messung nur einen einzigen Moment der Regenerationsabläufe skizziert. Einerseits könnte die Vermutung einer beschleunigten Regeneration unter der Zelltherapie, basierend auf der Größe der Faserdurchmesser und der Anzahl der Regeneratfasern nach 12 Wochen, aber auch der immunmodulatorische Einfluss auf Makrophagen und T-Zellen mit früheren Messungen zusätzlich überprüft werden. Andererseits ist auch die Entwicklung der Mikrostruktur nach 26 Wochen ungeklärt. Da sich die signifikant positiven Effekte sowohl in der isometrischen Maximalkraft als auch in der Volumenanalyse erst in der Langzeituntersuchung widerspiegeln, wäre eine parallele Untersuchung des Faserdurchmessers und der Fasertypverteilung besonders aufschlussreich.

6.5 Ausblick

Derzeit stellt die Therapie verletzter Skelettmuskulatur ein noch immer ungelöstes Problem in der Orthopädie und Unfallchirurgie dar. Die Zelltherapie, speziell mit MSC, gilt als vielversprechendes Therapiekonzept. Zwar existieren bereits einige Studien, die mesenchymale Stromazellen unterschiedlicher Herkunft in tierexperimentellen Studien zu Muskelerkrankungen untersuchen, klinische Anwendungen sind indes kaum beschrieben. Insofern sind die Erkenntnisse dieser Phase I/II Studie von besonderer Relevanz, trotz der nur teilweise vorhandenen signifikanten Effekte der Zelltherapie auf die Morphologie.

Die in dieser Studie verwendeten PLX Zellen als Vertreter der MSC placentaren Ursprungs haben diverse Vorteile. Die Plazenta selbst ist eine interessante Quelle für die Gewinnung von MSC, da durch ihre Verfügbarkeit nach einer Geburt keine zusätzlichen Interventionen nötig sind. Zudem ist aufgrund der Herstellung nach kontrollierten Standards eine hohe Qualität des Zellproduktes erreichbar. Durch die Möglichkeit einer allogenen Anwendung dieses Zellproduktes entfällt bei der unmittelbaren Therapie akuter Erkrankungen eine zeitaufwendige Kultivierung und Herstellung bis zur Transplantation. Bisherige Studien beschreiben für die PLX Zellen regenerationsfördernde Eigenschaften durch parakrine und immunmodulatorische Wirkweisen bei verschiedenen Erkrankungen^{115,120,122,139}. Die morphologischen Analysen dieser Dissertation charakterisieren nun den Zuwachs kontraktiles Muskelgewebes unter der Anwendung von PLX Zellen im Muskeltrauma als mögliche weitere Wirkweise. Diese erstmalige und erfolgreiche klinische Anwendung von PLX Zellen im Bereich der Orthopädie gibt den Impuls weitere Untersuchungen anzuschließen. So ist der Einsatz von PLX Zellen bei anderen Verletzungen der Skelettmuskulatur zweifellos anzustreben. Denkbar wären Erkrankungen wie die Rotatorenmanschettenruptur der Schulter oder andere intramuskuläre Muskelrisse durch Sportverletzungen. Um das maximale Potential der Zellen zu erreichen, wäre eine zusätzliche Kombination mit verschiedenen Biomaterialien denkbar. Scaffolds, d.h. Matrices, welche mit den Zellen besiedelt werden, können das Mikromilieu von Zellen optimieren und so deren Wirkweise unterstützen¹⁴⁷. Zudem sollten zukünftige Studien zu diesem Zellprodukt die Wirkmechanismen in humanen oder tierexperimentellen Studien noch weiter vertiefen, da die in dieser Arbeit festgestellten Effekte auf die Morphologie hinsichtlich der kleinen Studienpopulation nur eingeschränkt Auskunft über die Beeinflussung der PLX Zellen

auf die komplexen Vorgänge der Regeneration geben. Nichtsdestotrotz liefert die vorliegende Arbeit mit der erstmaligen humanen Anwendung der PLX Zellen zur Muskelregeneration einen wichtigen Beitrag, um diese Form der Therapie im klinischen Alltag zu etablieren.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANCOVA	Analysis of Covariance
BMI	Body Mass Index
BMMSC	Bone marrow derived mesenchymal stromal cells
CLI	Critical Limb Ischemia
COX	Cyclooxygenase
DOMS	Delayed onset muscle soreness
ECM	Extrazelluläre Matrix
E-MSC	Embryonale mesenchymale Stromazellen
GFP	Green Fluorescent Protein
GM	Musculus Gluteus Medius
HBOT	Hyperbare Sauerstofftherapie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTEP	Hüfttotalendoprothese
IFN-gamma	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IL	Interleukin
ISCT	International Society of Cellular Therapies
M	Millionen
MRF	Myogener Regulationsfaktor
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stromazellen
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PAX7	Paired Box Transcription Factor Family 7
PLX	Placental expanded adherent stromal cell product
PBS	Phosphate buffered saline
PMSC	Placenta derived mesenchymal stromal cells
ROI	Region of Interest

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Carsten Perka und PD Dr. med. Tobias Winkler für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie deren Betreuung in den letzten drei Jahren bedanken. Beide standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Für seine Expertise im Bereich Muskelregeneration bedanke ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Tobias Winkler aufgrund seiner jahrelangen Erfahrung in diesem Gebiet.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Gisela Stoltenburg-Didinger, die sich immer Zeit nahm für hilfreiche Gespräche und Ratschläge bei Problemen in der histologischen Analyse und mich bis zur Vollendung dieser Arbeit begleitete.

Zudem möchte ich mich bei der Studienkoordinatorin Anne Zergiebel bedanken, die durch ihre hervorragende Organisation einen reibungslosen Studienablauf ermöglichte.

Eine große Unterstützung bei den histologischen Laborarbeiten im Julius-Wolff-Institut war Gabriele Korus. Für ihren unermüdlichen Einsatz möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Schließlich danke ich meinem Bruder Erik sowie meinen Eltern, Gudrun und Ingolf, die mich während des gesamten Studiums und dieser Arbeit immer voll unterstützt haben. Für ihre Geduld und immerwährende Motivation möchte ich mich von ganzem Herzen bei Janine bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Henning Plage, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Morphologische Analyse verletzter Glutealmuskulatur nach intraoperativer Transplantation von allogenen mesenchymalen Stromazellen nach transglutealer Hüftendoprothetik“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Literaturverzeichnis

1. von Roth P, Abdel MP, Wauer F, et al. Significant muscle damage after multiple revision total hip replacements through the direct lateral approach. *The bone & joint journal* 2014;96-b:1618-22.
2. Muller M, Tohtz S, Winkler T, Dewey M, Springer I, Perka C. MRI findings of gluteus minimus muscle damage in primary total hip arthroplasty and the influence on clinical outcome. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 2010;130:927-35.
3. Gejo R, Matsui H, Kawaguchi Y, Ishihara H, Tsuji H. Serial changes in trunk muscle performance after posterior lumbar surgery. *Spine* 1999;24:1023-8.
4. Taylor H, McGregor AH, Medhi-Zadeh S, et al. The impact of self-retaining retractors on the paraspinal muscles during posterior spinal surgery. *Spine* 2002;27:2758-62.
5. Mellon SJ, Liddle AD, Pandit H. Hip replacement: landmark surgery in modern medical history. *Maturitas* 2013;75:221-6.
6. Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Deutsches Arzteblatt international* 2014;111:407-16.
7. Masonis JL, Bourne RB. Surgical approach, abductor function, and total hip arthroplasty dislocation. *Clinical orthopaedics and related research* 2002:46-53.
8. Petis S, Howard JL, Lanting BL, Vasarhelyi EM. Surgical approach in primary total hip arthroplasty: anatomy, technique and clinical outcomes. *Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie* 2015;58:128-39.
9. Muller M, Tohtz S, Springer I, Dewey M, Perka C. Randomized controlled trial of abductor muscle damage in relation to the surgical approach for primary total hip replacement: minimally invasive anterolateral versus modified direct lateral approach. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 2011;131:179-89.
10. Iorio R, Healy WL, Warren PD, Appleby D. Lateral trochanteric pain following primary total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 2006;21:233-6.
11. Pfirrmann CW, Notzli HP, Dora C, Hodler J, Zanetti M. Abductor tendons and muscles assessed at MR imaging after total hip arthroplasty in asymptomatic and symptomatic patients. *Radiology* 2005;235:969-76.
12. Baker AS, Bitounis VC. Abductor function after total hip replacement. An electromyographic and clinical review. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 1989;71:47-50.
13. Demos HA, Rorabeck CH, Bourne RB, MacDonald SJ, McCalden RW. Instability in primary total hip arthroplasty with the direct lateral approach. *Clinical orthopaedics and related research* 2001:168-80.
14. Rachbauer F. [Minimally invasive total hip arthroplasty. Anterior approach]. *Der Orthopade* 2006;35:723-4, 6-9.
15. Berger RA, Duwelius PJ. The two-incision minimally invasive total hip arthroplasty: technique and results. *The Orthopedic clinics of North America* 2004;35:163-72.
16. Sculco TP, Boettner F. Minimally invasive total hip arthroplasty: the posterior approach. *Instructional course lectures* 2006;55:205-14.
17. Meneghini RM, Pagnano MW, Trousdale RT, Hozack WJ. Muscle damage during MIS total hip arthroplasty: Smith-Petersen versus posterior approach. *Clinical orthopaedics and related research* 2006;453:293-8.

18. van Oldenrijk J, Hoogland PV, Tuijthof GJ, Corveleijn R, Noordenbos TW, Schafroth MU. Soft tissue damage after minimally invasive THA. *Acta orthopaedica* 2010;81:696-702.
19. Mouilhade F, Matsoukis J, Oger P, Mandereau C, Brzakala V, Dujardin F. Component positioning in primary total hip replacement: a prospective comparative study of two anterolateral approaches, minimally invasive versus gluteus medius hemimiotomy. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR* 2011;97:14-21.
20. Bernasek TL, Lee WS, Lee HJ, Lee JS, Kim KH, Yang JJ. Minimally invasive primary THA: anterolateral intermuscular approach versus lateral transmuscular approach. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 2010;130:1349-54.
21. Woolson ST, Mow CS, Syquia JF, Lannin JV, Schurman DJ. Comparison of primary total hip replacements performed with a standard incision or a mini-incision. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2004;86-a:1353-8.
22. Graw BP, Woolson ST, Huddleston HG, Goodman SB, Huddleston JI. Minimal incision surgery as a risk factor for early failure of total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research* 2010;468:2372-6.
23. Bal BS, Haltom D, Aleto T, Barrett M. Early complications of primary total hip replacement performed with a two-incision minimally invasive technique. *Surgical technique. The Journal of bone and joint surgery American volume* 2006;88 Suppl 1 Pt 2:221-33.
24. Smith TO, Blake V, Hing CB. Minimally invasive versus conventional exposure for total hip arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of clinical and radiological outcomes. *International orthopaedics* 2011;35:173-84.
25. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine* 2005;33:745-64.
26. Smith C, Kruger M, Smith R, Myburgh K. The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury. *Sports Med* 2008;38:947-69.
27. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010;298:R1173-87.
28. Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, et al. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscular disorders : NMD* 1999;9:72-80.
29. Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *The FEBS journal* 2013;280:4118-30.
30. Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:1057-69.
31. Castiglioni A, Corna G, Rigamonti E, et al. FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PLoS one* 2015;10:e0128094.
32. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 2013;155:1282-95.
33. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1961;9:493-5.
34. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science* 2006;119:1824-32.

35. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* 2015;142:1572-81.
36. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007;129:999-1010.
37. Perry RL, Rudnick MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2000;5:D750-67.
38. Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Frontiers in physiology* 2013;4:363.
39. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2006;54:1177-91.
40. Ceafalan LC, Popescu BO, Hinescu ME. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *BioMed research international* 2014;2014:957014.
41. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology* 2007;9:255-67.
42. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of cell biology* 2002;159:123-34.
43. Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Current pharmaceutical design* 2010;16:906-14.
44. Jarvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med* 1993;15:78-89.
45. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, et al. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta orthopaedica* 2011;82:102-11.
46. Ceafalan LC, Manole E, Tanase CP, et al. Interstitial Outburst of Angiogenic Factors During Skeletal Muscle Regeneration After Acute Mechanical Trauma. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)* 2015;298:1864-79.
47. Hoier B, Nordsborg N, Andersen S, et al. Pro- and anti-angiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training. *The Journal of physiology* 2012;590:595-606.
48. Lieber RL, Ward SR. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology* 2013;305:C241-52.
49. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2003;83:1689-707.
50. Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Frontiers in pharmacology* 2015;6:87.
51. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2002;84:822-32.
52. Jarvinen TA, Jarvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, ligaments and tendons journal* 2013;3:337-45.
53. Khatkhat MJ, Ahmad T, Rehman R, Umer M, Hasan SH, Ahmed M. Muscle healing and nerve regeneration in a muscle contusion model in the rat. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 2010;92:894-9.
54. Schaser KD, Disch AC, Stover JF, Lauffer A, Bail HJ, Mittlmeier T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional

inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *The American journal of sports medicine* 2007;35:93-102.

55. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section A, Pathology* 1976;84:85-94.

56. Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2011;110:382-8.

57. Thorsson O, Lilja B, Nilsson P, Westlin N. Immediate external compression in the management of an acute muscle injury. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 1997;7:182-90.

58. Sellei RM, Hildebrand F, Pape HC. [Acute extremity compartment syndrome: current concepts in diagnostics and therapy]. *Der Unfallchirurg* 2014;117:633-49.

59. Kanhai A, Losito JM. Hyperbaric oxygen therapy for lower-extremity soft-tissue sports injuries. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 2003;93:298-306.

60. Horie M, Enomoto M, Shimoda M, Okawa A, Miyakawa S, Yagishita K. Enhancement of satellite cell differentiation and functional recovery in injured skeletal muscle by hyperbaric oxygen treatment. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2014;116:149-55.

61. Bennett M, Best TM, Babul S, Taunton J, Lepawsky M. Hyperbaric oxygen therapy for delayed onset muscle soreness and closed soft tissue injury. *The Cochrane database of systematic reviews* 2005:Cd004713.

62. Strauss MB. The effect of hyperbaric oxygen in crush injuries and skeletal muscle-compartment syndromes. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 2012;39:847-55.

63. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *The American journal of sports medicine* 1999;27:54-9.

64. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International journal of sports medicine* 2004;25:73-7.

65. Paulsen G, Egner IM, Drange M, et al. A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 2010;20:e195-207.

66. Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *The American journal of sports medicine* 1994;22:558-61.

67. Mishra DK, Friden J, Schmitz MC, Lieber RL. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1995;77:1510-9.

68. Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *The American journal of pathology* 2005;167:1105-17.

69. Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *American journal of physiology Cell physiology* 2004;287:C475-83.

70. Hakim M, Hage W, Lovering RM, Moorman CT, 3rd, Curl LA, De Deyne PG. Dexamethasone and recovery of contractile tension after a muscle injury. *Clinical orthopaedics and related research* 2005;439:235-42.
71. Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *The American journal of sports medicine* 1999;27:2-9.
72. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387:83-90.
73. Nozaki M, Ota S, Terada S, et al. Timing of the administration of suramin treatment after muscle injury. *Muscle & nerve* 2012;46:70-9.
74. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *The American journal of sports medicine* 2005;33:43-51.
75. Gharaibeh B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, et al. Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 2012;96:82-94.
76. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *The American journal of sports medicine* 2001;29:394-402.
77. Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103:789-91.
78. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *Journal of hepatology* 2001;35:376-85.
79. Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 2004;59:31-8.
80. Kobayashi T, Uehara K, Ota S, et al. The timing of administration of a clinically relevant dose of losartan influences the healing process after contusion induced muscle injury. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2013;114:262-73.
81. Bedair HS, Karthikeyan T, Quintero A, Li Y, Huard J. Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle. *The American journal of sports medicine* 2008;36:1548-54.
82. Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 2008;456:502-6.
83. Montarras D, Morgan J, Collins C, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science (New York, NY)* 2005;309:2064-7.
84. Biressi S, Rando TA. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Seminars in cell & developmental biology* 2010;21:845-54.
85. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle & nerve* 1996;19:853-60.
86. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
87. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 1999;284:143-7.
88. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science (New York, NY)* 1998;279:1528-30.

89. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
90. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
91. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *The open orthopaedics journal* 2011;5 Suppl 2:242-8.
92. Matziolis G, Winkler T, Schaser K, et al. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue engineering* 2006;12:361-7.
93. von Roth P, Winkler T, Rechenbach K, Radojewski P, Perka C, Duda GN. Improvement of contraction force in injured skeletal muscle after autologous mesenchymal stroma cell transplantation is accompanied by slow to fast fiber type shift. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2013;40:425-30.
94. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Mehta M, Perka C, Duda GN. Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats. *Tissue engineering Part A* 2009;15:487-92.
95. Winkler T, von Roth P, Radojewski P, et al. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2012;6 Suppl 3:s60-7.
96. Winkler T, von Roth P, Schuman MR, et al. In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats. *Tissue engineering Part A* 2008;14:1149-60.
97. Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue engineering* 2004;10:1093-112.
98. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* 2008;103:1204-19.
99. Sassoli C, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration. *Cells* 2012;1:832-50.
100. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine* 2013;45:e54.
101. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology letters* 2015;168:140-6.
102. Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation* 2006;38:389-90.
103. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *The Journal of cell biology* 2002;157:851-64.
104. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research* 2000;2:477-88.

105. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2004;22:1338-45.
106. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 2008;17:1095-107.
107. Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004;78:1439-48.
108. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;26:591-9.
109. Chen J, Shehadah A, Pal A, et al. Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats. *Cell transplantation* 2013;22:871-9.
110. Chen HJ, Chen CH, Chang MY, et al. Human placenta-derived adherent cells improve cardiac performance in mice with chronic heart failure. *Stem cells translational medicine* 2015;4:269-75.
111. Francki A, Labazzo K, He S, et al. Angiogenic properties of human placenta-derived adherent cells and efficacy in hindlimb ischemia. *Journal of vascular surgery* 2015.
112. Zhang B, Adesanya TM, Zhang L, et al. Delivery of placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorates ischemia induced limb injury by immunomodulation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2014;34:1998-2006.
113. Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell and tissue research* 2012;348:189-97.
114. Grabowska I, Brzoska E, Gawrysiak A, et al. Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell transplantation* 2012;21:1711-26.
115. Prather WR, Toren A, Meiron M, Ofir R, Tschöpe C, Horwitz EM. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytherapy* 2009;11:427-34.
116. Ramot Y, Meiron M, Toren A, Steiner M, Nyska A. Safety and biodistribution profile of placental-derived mesenchymal stromal cells (PLX-PAD) following intramuscular delivery. *Toxicologic pathology* 2009;37:606-16.
117. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:3290-4.
118. Chiu PP, Ivakine E, Mortin-Toth S, Danska JS. Susceptibility to lymphoid neoplasia in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice. *Cancer research* 2002;62:5828-34.
119. Varu VN, Hogg ME, Kibbe MR. Critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery* 2010;51:230-41.
120. Roy R, Brodarac A, Kukucka M, et al. Cardioprotection by placenta-derived stromal cells in a murine myocardial infarction model. *The Journal of surgical research* 2013;185:70-83.
121. Kranz A, Wagner D-C, Kamprad M, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. *Brain Research* 2010;1315:128-36.
122. Lahiani A, Zahavi E, Netzer N, et al. Human placental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor

(NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1853:422-30.

123. Potter HG, Nestor BJ, Sofka CM, Ho ST, Peters LE, Salvati EA. Magnetic resonance imaging after total hip arthroplasty: evaluation of periprosthetic soft tissue. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2004;86-a:1947-54.

124. Muller M, Tohtz S, Dewey M, Springer I, Perka C. Evidence of reduced muscle trauma through a minimally invasive anterolateral approach by means of MRI. *Clinical orthopaedics and related research* 2010;468:3192-200.

125. Bremer AK, Kalberer F, Pfirrmann CW, Dora C. Soft-tissue changes in hip abductor muscles and tendons after total hip replacement: comparison between the direct anterior and the transgluteal approaches. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 2011;93:886-9.

126. Ludemann M, Kreutner J, Haddad D, Kenn W, Rudert M, Noth U. [MRI-based measurement of muscle damage after minimally invasive hip arthroplasty]. *Der Orthopade* 2012;41:346-53.

127. Engelken F, Wassilew GI, Kohlitz T, et al. Assessment of fatty degeneration of the gluteal muscles in patients with THA using MRI: reliability and accuracy of the Goutallier and quartile classification systems. *The Journal of arthroplasty* 2014;29:149-53.

128. O'Brien TD, Reeves ND, Baltzopoulos V, Jones DA, Maganaris CN. Strong relationships exist between muscle volume, joint power and whole-body external mechanical power in adults and children. *Experimental physiology* 2009;94:731-8.

129. Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clinical orthopaedics and related research* 1994:78-83.

130. Bogunovic L, Lee SX, Haro MS, et al. Application of the Goutallier/Fuchs Rotator Cuff Classification to the Evaluation of Hip Abductor Tendon Tears and the Clinical Correlation With Outcome After Repair. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2015.

131. Hogendoorn S, Duijnisveld BJ, van Duinen SG, et al. Local injection of autologous bone marrow cells to regenerate muscle in patients with traumatic brachial plexus injury: a pilot study. *Bone & Joint Research* 2014;3:38-47.

132. Ninagawa NT, Isobe E, Hirayama Y, et al. Transplanted mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells promote muscle regeneration and accelerate functional recovery of injured skeletal muscle. *BioResearch open access* 2013;2:295-306.

133. Andrade BM, Baldanza MR, Ribeiro KC, et al. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model. *PloS one* 2015;10:e0127561.

134. Mendler L, Pinter S, Kiricsi M, Baka Z, Dux L. Regeneration of reinnervated rat soleus muscle is accompanied by fiber transition toward a faster phenotype. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2008;56:111-23.

135. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical therapy* 2001;81:1810-6.

136. Schiaffino S, Serrano A. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends in pharmacological sciences* 2002;23:569-75.

137. Sirca A, Susec-Michieli M. Selective type II fibre muscular atrophy in patients with osteoarthritis of the hip. *Journal of the neurological sciences* 1980;44:149-59.

138. Matsuura T, Li Y, Giacobino JP, Fu FH, Huard J. Skeletal muscle fiber type conversion during the repair of mouse soleus: potential implications for muscle healing after injury. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2007;25:1534-40.
139. Consentius C, Akyuz L, Schmidt-Lucke JA, et al. Mesenchymal stromal cells prevent allostimulation in vivo and control checkpoints of Th1 priming: Migration of human DC to lymph nodes and NK cell activation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2015.
140. Ishikane S, Yamahara K, Sada M, et al. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010;49:753-61.
141. Hamamoto H, Gorman JH, 3rd, Ryan LP, et al. Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *The Annals of thoracic surgery* 2009;87:794-801.
142. Shehadah A, Chen J, Pal A, et al. Human placenta-derived adherent cell treatment of experimental stroke promotes functional recovery after stroke in young adult and older rats. *PloS one* 2014;9:e86621.
143. Saether EE, Chamberlain CS, Leiferman EM, et al. Enhanced medial collateral ligament healing using mesenchymal stem cells: dosage effects on cellular response and cytokine profile. *Stem cell reviews* 2014;10:86-96.
144. Schu S, Nosov M, O'Flynn L, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012;16:2094-103.
145. Preininger B, Schmorl K, von Roth P, et al. [More muscle mass in men: explanatory model for superior outcome after total hip arthroplasty]. *Der Orthopade* 2013;42:107-13.
146. Di Monaco M, Vallero F, Tappero R, Cavanna A. Rehabilitation after total hip arthroplasty: a systematic review of controlled trials on physical exercise programs. *European journal of physical and rehabilitation medicine* 2009;45:303-17.
147. Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, Geissler S, Duda GN. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials* 2015;53:502-21.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

