

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

DISSERTATION

In vivo Visualisierung mesenchymaler Stammzellen nach  
lokaler Transplantation im schweren Skelettmuskeltrauma der  
Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp von Roth

aus Münster

Gutachter: 1. Prof. Dr.-Ing. G. N. Duda

2. Prof. Dr. med. T. Mittlmeier

3. Prof. Dr. med. F. Buttgereit

# Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	5
ABSTRACT .....	7
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1 MUSKELVERLETZUNGEN .....	9
1.2 REGENERATIONSFÄHIGKEIT DER SKELETTMUSKULATUR .....	10
1.3 BISHERIGE THERAPIEANSÄTZE.....	12
1.4 EXPERIMENTELLE VERSUCHE DER MUSKELREGENERATION .....	13
1.5 STAMMZELLEN .....	14
1.6 EXPERIMENTELLER EINSATZ VON STAMMZELLEN .....	16
1.7 MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE.....	17
1.8 ZELLULÄRE BILDGEBUNGSVERFAHREN .....	18
1.9 CHARAKTERISIERUNG DER EISENOXIDNANOPARTIKEL .....	18
1.10 ZIELSETZUNG UND HYPOTHESEN DER ARBEIT .....	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 IN VITRO .....	21
2.1.1 Zellkultur .....	21
2.1.2 Markierung der Zellen.....	22
2.1.2.1 Eisenoxidnanopartikel.....	22
2.1.2.2 Hoechst Zellkernmarkierung.....	23
2.1.3 Vitalitätsbestimmung und Proliferationsassay .....	23
2.1.4 Relaxometrie und Eisengehaltmessung .....	24
2.1.5 In vitro Visualisierung .....	24
2.2 IN VIVO.....	25
2.2.1 Untersuchte Tiere.....	25
2.2.2 Versuchstiergruppen und Versuchsablauf.....	26
2.2.3 Narkose und Schmerztherapie .....	28
2.2.4 Operative Verfahren.....	28
2.2.4.1 Biopsie .....	28
2.2.4.2 Muskeltrauma.....	29
2.2.4.3 Präparation der Zellen und deren Transplantation .....	29
2.2.4.4 Biomechanische Auswertung.....	30
2.2.4.5 Transkardiale Perfusionsfixierung .....	32
2.2.5 MRT – Untersuchungen.....	32
2.2.6 3D-Rekonstruktion.....	34
2.2.6.1 Grauwertbestimmung.....	34
2.2.6.2 Ausmessung der 3D-Modelle.....	35
2.2.6.3 Auswertung der 3D-Modelle (Volumen, Schwerpunkt, Oberfläche).....	35
2.3 EX VIVO .....	36

2.3.1	<i>Histologie</i> .....	36
2.3.2	<i>Vergleich der MRT-Aufnahmen mit den histologischen Daten</i> .....	36
2.3.3	<i>Statistische Auswertung</i> .....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>38</b>
3.1	IN VITRO .....	38
3.1.1	<i>Vitalitätsbestimmung</i> .....	38
3.1.2	<i>Proliferationsassay</i> .....	38
3.1.3	<i>Relaxometrie</i> .....	40
3.1.4	<i>Eisengehaltmessung</i> .....	40
3.1.5	<i>In vitro Visualisierung</i> .....	42
3.1.6	<i>Grauwertbestimmung</i> .....	43
3.2	IN VIVO.....	43
3.2.1	<i>Deskriptive Auswertung der MRT Daten</i> .....	43
3.2.2	<i>Volumen-, Oberflächen- und Schwerpunktberechnung</i> .....	48
3.3	EX VIVO.....	53
3.3.1	<i>Histologische Ergebnisse und deren Vergleich mit den MRT Daten</i> .....	53
3.3.2	<i>Funktionelle Ergebnisse</i> .....	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
4.1	ZELLULÄRE BILDGEBUNGSVERFAHREN .....	59
4.2	MAGNETISCHE MARKIERUNG UND VISUALISIERUNG DER MSC .....	61
4.3	REGENERATION VON TRAUMATISIERTER MUSKULATUR MIT EISENOXIDPARTIKELMARKIERTEN MSC.....	67
4.4	ANSÄTZE ZUR WEITEREN AUFKLÄRUNG DES WIRKMECHANISMUS TRANSPLANTIERTER MSC .....	68
4.5	AUSBLICK.....	69
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>70</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>76</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>78</b>
	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>79</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>80</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>82</b>

## Zusammenfassung

Im Bereich der Unfallchirurgie und Orthopädie stellen Verletzungen der Muskulatur ein häufiges und schwerwiegendes Problem dar. Unfälle und große Weichteildefekte können zum Verlust von aktiver Muskelsubstanz und zur Bildung von Fibrose führen. Die operative Behandlung der muskulären Insuffizienz ist äußerst unbefriedigend und so werden bis heute Behandlungsverfahren angewendet, die 1898 von Paul Leopold Friedrich auf Basis bakteriologischer Tierversuche entwickelt worden waren [1]. Die konservativen Maßnahmen wurden neben dem Kühlen und Hochlagern um die Applikation von nicht steroidal Antiphlogistika erweitert. Durch dieses Regime kann jedoch der entstandene Schaden nur begrenzt werden. Bemühungen, mit Wachstumsfaktoren die Regeneration von defektem Muskelgewebe zu fördern, konnten nur mäßige Erfolge vorweisen. In Vorarbeiten konnten Matziolis et al. [2] zeigen, dass durch die Transplantation von autologen mesenchymalen Stammzellen (MSC) in einen vollständig traumatisierten M. soleus, die Kraft um über 13% gegenüber einer Kontrollgruppe gesteigert werden konnte. Die Ursache für eine durch die Stammzellen verursachte Kraftzunahme konnte nur histologisch gesucht werden. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte somit retrospektiv, ex vivo und ein intra-individueller Verlauf war nicht realisierbar. Diese Hindernisse vermag die Magnetresonanztomographie (MRT) zu kompensieren. Mit dieser Technologie ist es möglich, das Verhalten der Zellen nach der Transplantation nicht invasiv im lebenden Organismus zu verfolgen. Um die Zellen verfolgen zu können, müssen diese zunächst durch ein MRT-Kontrastmittel markiert werden. Hierzu eignen sich "Very Small Iron Oxide Particles" (VSOP). Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe um Stroh et al. konnten bereits embryonale Stammzellen mittels eines Vorgängers des hier verwendeten VSOP C-200 erfolgreich markieren und nach der Transplantation der Zellen in einem Schlaganfallmodell der Maus in vivo verfolgen [3].

Die MSC wurden aus dem tibialen Knochenmark ca. 150 g schwerer Sprague Dawley Ratten gewonnen. Nach der Markierung der MSC wurde die Vitalität, Proliferation, Relaxation und die Eisenaufnahme untersucht. Die markierten Zellen wurden eine Woche nach der Applikation eines schweren Skelettmuskeltraumas des M. soleus autolog transplantiert. Die MRT Scans wurden unter der Verwendung T1-, T2- und T2\*-gewichteter Flash2D-Aufnahmen an unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Transplantation durchgeführt. Für die Berechnung des Volumens, der Oberfläche und des Schwerpunktes der Zellpools wurden die Scans dreidimensional rekonstruiert. Die funktionelle Untersuchung der MSC erfolgte durch in vivo Muskelkraftmessungen. Die Muskeln der Tiere wurden für die histologische Aufarbeitung in

Paraffin eingebettet oder nach transkardialer Perfusion mittels 2-Methylbutan kryokonserviert.

Es konnte gezeigt werden, dass die VSOP-Markierung die Proliferationsrate der Zellen nicht beeinflusste. Auch die Vitalität blieb nach der Markierung auf dem Niveau der unmarkierten Kontrollzellen. Eine Reduktion der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  in vitro von 1600 ms auf 550 ms sicherte einen guten Kontrast der MSC in vivo. Der intrazelluläre Eisengehalt stieg auf bis zu  $6.33\mu\text{g}/1 \times 10^6$ . Nach der VSOP-Markierung der MSC wurden die Zellen in den traumatisierten M. Soleus transplantiert. Die Lage des Zellpools innerhalb des Muskels konnte bei allen untersuchten Tieren auf Grund der durch die VSOP verursachten Hypointensität sicher identifiziert und bis zu 6 Wochen verfolgt werden. Während des Beobachtungszeitraumes kam es zu einer Reduktion des Zellpoolvolumens um 60-70 Prozent. Da sich der Schwerpunkt des im MRT detektierten Zellpools über den Zeitraum von 42 Tagen nicht änderte, ist davon auszugehen, dass die Zellen nach der Transplantation innerhalb des traumatisierten Muskels keinen Migrationsvorgängen unterliegen. Die wichtige und bisher nicht gelöste Frage, ob die VSOP-Markierung den Effekt der MSC auf die Muskelregeneration negativ beeinflusst hatte, konnte durch funktionelle in vivo Untersuchungen des M. soleus ausgeschlossen werden. Sowohl Ratten mit markierten Zellen als auch Tiere mit unmarkiert transplantierten Zellen entwickelten eine Muskelkraftsteigerung von 30% gegenüber den Kontrolltieren ohne MSC Transplantation. Die Lage der in den MRT Aufnahmen beobachteten Zellen korrelierte topographisch mit der in den Berliner Blau gefärbten histologischen Schnitten. Weiter konnten Fusionen zwischen den vorhandenen Muskelfasern und den transplantierten MSC beobachtet werden, womit die in den funktionellen Versuchen beobachtete Muskelkraftzunahme nach der Transplantation durch eine Vermehrung der kontraktilen Muskelsubstanz erklärt werden kann. Da eine Migration der Zellen innerhalb des Muskels nicht beobachtet werden konnte, scheinen parakrine Effekte eine Rolle zu spielen und sollten in zukünftigen Versuchen untersucht werden.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich mesenchymale Stammzellen aus der Ratte durch VSOP erfolgreich markieren und nach der autologen Transplantation der Zellen in ein schweres Skelettmuskeltrauma des M. soleus mittels eines hochauflösenden MRT in vivo verfolgen lassen.

Schlagwörter: mesenchymale Stammzellen, Muskelregeneration, MRT

## Abstract

HEADING: Functional deficiencies after severe skeletal muscle trauma remain to be a serious problem in orthopaedic and trauma surgery. Transplantation of autologous bone marrow derived stem cells improves muscle contraction force after a blunt crush trauma of the soleus muscle in the rat [2]. Until now the only possibility of retrieving information about the fate of the transplanted cells has been the histological analysis of the target tissue. The behaviour of the transplanted cells in a traumatized muscle between the transplantation and histological analysis is unknown. Stroh et al. could observe systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain using citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles (VSOP) and high-field magnetic resonance imaging (MRI) [3]. AIM: The presented study was designed to track locally administered mesenchymal stem cells (MSC) in vivo after a severe crush trauma of rat skeletal muscle using 7 Tesla MRI. METHODS: MSC were harvested by aspiration of tibial bone marrow of male Sprague Dawley rats and selected by plastic adherence. Vitality, proliferation, shortening of the transverse relaxation time and iron uptake of the cells were measured. The cells were loaded with VSOP and transplanted autologously into the traumatized soleus muscle. MRI scans were made at different time points after transplantation using T1-, T2- and Flash2D-sequences. Cell pools were 3-dimensionally reconstructed for calculating volume, surface and the centre of gravity of the noted volume. Muscles of all animals were processed for paraffin or cryo-histology and MSC-associated signal changes in MRI were compared with histological sections stained with Prussian blue for the detection of iron. After the transplantation, an in vivo analysis of the muscle force was performed. RESULTS: Labelling of the MSC at iron concentrations between 0.375 mM to 6 mM yielded vitality values of the cells of more than 95%. Proliferation assays showed that incorporation of VSOP did not lead to cytotoxic effects. The relaxometry of  $1 \times 10^6$  cells loaded with increasing concentrations of VSOP showed a decrease of the transverse relaxation time up to 62% of the control. The iron content increased up to  $6.33 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  cells. Labelled cells generating a hypointense signal within the traumatized muscle could be detected clearly in all scan modes used. The detection of the cells was possible over a period of 6 weeks. The volume of the reconstructed cell pools showed a decrease by 60-70 percent after 42 days. The centre of gravity did not change significantly over 21 days. The histologic results showed fusion events between the transplanted cells and muscle fibers. The location of the cells observed in the MRI scans corresponded with the histological results of the Prussian Blue staining. Biomechanical investigation of muscle function in vivo was used to evaluate the biological effect of VSOP labelled MSC. Rats with

iron labelled cells as well as the ones treated with unlabelled cells, developed an improvement of muscle force of 30% compared to the sham group. CONCLUSION: Since the in vitro investigations showed no changes of vitality and proliferation of the MSC after labelling, we conclude that there are no cytotoxic side effects of the VSOP. After a simple incubation procedure, the cells could be transplanted successfully and be followed up to 6 weeks via MRI. Contraction force of regenerating muscles could be improved by 30%. Fusion events between existing muscle fibers and the transplanted MSC could be observed, suggesting an increase of contractile muscle substance. No migration was observed within the traumatized muscle, indicating that further paracrine effects were supporting muscle recovery. Our results demonstrate that very small iron oxide particles can be an efficient tool for in vivo detection of mesenchymal stem cells after local transplantation into severely traumatized skeletal muscle.

Keywords: mesenchymal stem cells, muscle trauma, MRI



# 1 Einleitung

## 1.1 Muskelverletzungen

Die Skelettmuskulatur ist alltäglich enormen Belastungen ausgesetzt. So führt bereits das passive Dehnen der kontrahierten Muskulatur beim Bergauf und -ab steigen zu reversiblen Mikrotraumen [4]. Von der Muskelüberdehnung, die sich als Muskelkater bemerkbar macht, über die deutlich schmerzhaftere Muskelzerrung, kann es zu ernsthaften Zerreißungen der Muskelfasern kommen. Die häufigsten Sportverletzungen gehen auf eine Überschreitung der Muskeldehnbarkeit sowie auf Kontusionen zurück [5]. Stich-, Schuss- und Schnittwunden unterbrechen die Muskelkontinuität teilweise oder sogar ganz. Auch eine ausgeprägte, stumpfe Gewalteinwirkung nach Unfällen kann zur Kontinuitätsunterbrechung führen. Besonders die Kontusionsverletzungen bergen durch die posttraumatische Ödembildung die Gefahr der Entwicklung eines Kompartmentsyndroms. Hierbei steigt durch das Ödem der intramuskuläre Druck über den bestehenden Kapillardruck. Die daraus resultierende Minderdurchblutung des betroffenen Areals verschlechtert nicht nur die Situation des schon traumatisierten Areals sondern kann auch zum Untergang von bisher ungeschädigtem Muskelgewebe führen. Im schlimmsten Fall wird die Blutversorgung der distal gelegenen Gebiete komplett unterbunden, was eine Amputation der Extremität zur Folge haben kann [6].

Darüber hinaus ist der Untergang von Muskelgewebe nach wie vor ein ungelöstes Problem bei Operationen, wobei Verletzungen der Muskulatur besonders in der Orthopädie bei Wirbelsäuleneingriffen oder in der Endoprothetik vorkommen. Durch eine stark gestiegene Lebenserwartung der Patienten und eine Optimierung der operativen Möglichkeiten, wird in letzter Zeit beispielsweise die Indikation zu einer Hüftendoprothese immer früher gestellt. Dadurch ist aber auch die Zahl der Revisionseingriffe stark angestiegen. Trotz atraumatischer Zugangswege ist die Schädigung der das Gelenk umgebenden Hüftmuskulatur eine mit jedem Eingriff mögliche, schwerwiegendere Begleiterscheinung. Die Schädigung der Muskulatur führt auch zu einer verminderten Knochendichte, was die Lebensdauer der Prothese herabsetzt und damit wiederum einen Revisionseingriff erfordert [7]. Im Bereich der Unfallchirurgie ist neben einer suffizienten Gefäßversorgung die Muskelregeneration Basis für eine schnelle Heilung des Knochens nach der Wiederherstellung von Frakturen. [8]. Dramatische Schädigungen treten bei Tumorsektionen auf: Die Entfernung invasiv wachsender Tumore, insbesondere mesenchymalen Ursprungs, führt neben dem bereits durch den Tumor zerstörten Gewebe, durch die erweiterte Tumorsektion zu einem weiteren Verlust von Muskelmasse [9]. Neben den durch ein Trauma verursachten Muskelinsuffizienzen kann auch eine Ischämie

zu einem muskulären Funktionsdefizit führen. Hierbei kommen neben arteriellen Verschlüssen iatrogen verursachte perioperative Blutsperrern in Betracht [10]. Aber auch neurologische Störungen des ZNS oder des peripheren Nervensystems beeinträchtigen die Integrität der Muskulatur. Spinale Muskelatrophien, als Beispiel neuronaler Erkrankungen, bei denen es zum Muskelschwund aufgrund einer progressiven Degeneration von motorischen Nervenfasern kommt, können genetisch bedingt oder durch Traumata verursacht sein [11].

Die genannten Verletzungen und Erkrankungen führen zu einer muskulären Dysfunktion, die vom Körper nur teilweise oder gar nicht kompensiert werden kann. Der Untergang von Muskulatur kann die Immobilisierung des Patienten zur Folge haben. Das Risiko auf eine Infektion, wie beispielsweise einer Pneumonie, die Entstehung von Thrombosen bzw. Embolien wird dadurch deutlich erhöht und kann zum Tod des Patienten führen [12]. Diese Risiken können nur durch die Mobilisierung der Patienten reduziert werden, wofür eine suffiziente Muskulatur essentiell ist.

## **1.2 Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur**

Der Skelettmuskel ist eines der Gewebe des menschlichen Körpers, das die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu regenerieren. Die Zellkerne der Skelettmuskelfasern können sich, da sie sich in einem postmitotischen Stadium befinden, nicht mehr replizieren. Dadurch kann von ihnen keine Regeneration mehr ausgehen. Es konnte schon 1961 nachgewiesen werden, dass in der Skelettmuskulatur noch so genannte Satellitenzellen zu identifizieren sind [13]. Unter diesem Zelltyp versteht man myogene Vorläuferzellen, die einer Muskelfaser anliegen und von der Basallamina der Faser umgeben werden. Ein Kubikzentimeter Muskelmasse enthält  $10^5$  Satellitenzellen [4]. Aus einer aktivierten Satellitenzelle gehen ein Myoblast und wieder eine Satellitenzelle hervor. Da die Satellitenzelle die Fähigkeit besitzt, sich weiter teilen zu können, wird gewährleistet, dass das Zellreservoir nicht zur Neige geht. Neben den Satellitenzellen konnten so genannte muscle derived stem cells (MDSC) identifiziert werden, die nach einem Trauma aktiviert werden und durch Proliferation und die Differenzierung in Muskelgewebe dazu beitragen, die Muskelintegrität wieder herzustellen bzw. den bestehenden Schaden zu minimieren [14]. Die Regeneration der Muskulatur geht somit primär von diesen Zellen aus [15, 16]. Der Heilungsprozess nach einer Muskelverletzung läuft in drei Phasen ab [17, 18]:

1. Destruktions- und Entzündungsphase: In den ersten Tagen nach dem Trauma sterben Muskelfaseranteile ab und es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Der Regenerationsprozess

wird bereits initiiert, ist jedoch zunächst noch durch die Ausbildung eines intra- und extramuskulären Hämatoms behindert. Darüber hinaus fördert das Hämatom die Bildung von ungewollten Bindegewebsnarben.

2. Reparationsphase: In den anschließenden 7-10 Tagen werden die untergegangenen Muskelfaseranteile von Makrophagen abgeräumt und die Regeneration der Muskulatur beginnt. Die Satellitenzellen wandern in die geschädigte Muskelfaser ein oder formieren sich zu neuen Fasern. Darüber hinaus kommt es zur Einsprossung von Kapillaren. Der Regenerationsprozess hat ungefähr am 14. posttraumatischen Tag seinen Höhepunkt.

3. Wiederherstellungsphase: Diese Phase verläuft überschneidend zur vorangegangenen und dauert bis zu vier Wochen. Ein normaler Faserdurchmesser und die vollständige Differenzierung der Fasertypen wird durch eine nun stattfindende Reinnervation des regenerierenden Gewebes erreicht.

Der natürliche Heilungsprozess der Muskulatur setzt nach der Verletzung innerhalb weniger Stunden ein, wobei die Wiederherstellung einer Muskelfaser durch die Fusion der Satellitenzellen mit der zerstörten Muskelfaser oder der Neubildung von Fasern aus den Myoblasten realisiert wird [19, 20]. Nach Wernig und Irintchev formieren sich dabei die Myoblasten zu einem Muskelschlauch, um dann zu fusionieren und durch eine anschließende Differenzierung in myofibrilläre Strukturen die neue Muskelfaser zu bilden [4, 21]. Der Regenerationsfähigkeit der Muskulatur sind jedoch Grenzen gesetzt. Nach einer Reihe von Teilungen kommt es zur Überalterung der Muskelzellen und schließlich sistiert die Zellteilung. In diesem Fall wird davon ausgegangen, dass unter anderem vom Knochenmark abstammende, im Blutstrom zirkulierende, mesenchymale Stammzellen (MSC) die Regeneration unterstützen [22 - 26]. Brazelton et al. zerstörten das Knochenmark bei gesunden Mäusen durch eine radioaktive Bestrahlung und transplantierten Stammzellen die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (GFP, green fluorescent protein) markiert worden waren in die Schwanzvene. Anschließend wurde die Muskulatur der Tiere histologisch aufgearbeitet. Im Panniculus carnosus, einem Hautmuskel aus quergestreifter Muskulatur bei Mäusen, konnte die höchste Integrationsrate der applizierten Zellen in die gesunden Muskelfasern nachgewiesen werden. Die Beteiligung der transplantierten Zellen war mit 5% nur sehr gering und erreichte in den restlichen untersuchten Muskeln einen Wert von lediglich einem Prozent [27]. Dies unterstreicht zwar die prinzipielle Beteiligung des Knochenmarks an der Regeneration von Muskulatur, zeigt aber auch, dass ein Trauma für die Aktivierung dieses Regenerationsweges vonnöten ist. Palermo et al. verglichen das Homing von Stammzellen ("Einwandern" der Zellen aus dem Knochenmark in

ein bestimmtes Gebiet) an Hand von zwei unterschiedlichen Traumamodellen. Auch hier wurde vor einer systemischen Transplantation das Knochenmark der Tiere durch eine Bestrahlung eliminiert, um es dann durch GFP markierte Stammzellen zu ersetzen. Die Transplantation der Zellen erfolgte drei Monate vor einem Trauma des M. tibialis anterior. Sowohl nach einem experimentell, in der Natur nicht vorkommenden Trauma durch die intramuskuläre Applikation eines Zellgiftes (Notexin) als auch nach einem physiologisch vorkommenden Mikrotrauma der Muskulatur durch ständiges Bergabgehen konnte eine verstärkte Aktivität von GFP markierten Stammzellen im traumatisierten Areal festgestellt werden [28].

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich im Blut zirkulierende Stammzellen an der Regeneration der Muskulatur beteiligen. Neben konservativen Maßnahmen, die unterstützend in die Regeneration eingreifen sollten, wurde durch Applikation von Wachstumsfaktoren versucht, die Regeneration durch die physiologisch vorhandenen Stammzellen zu verstärken. Mit der systemischen Transplantation von Stammzellen, die in der Zellkultur angezüchtet worden waren, sollte die Regeneration weiter verbessert werden.

### **1.3 Bisherige Therapieansätze**

Die bis heute zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten vermögen einen muskulären Schaden nur zu begrenzen und können bestenfalls nur im geringen Maße unterstützend in die Regeneration eingreifen. So wird bei einfachen Muskelzerrungen und Faserrissen meist eine konservative Versorgung nach dem RICE Schema (Rest, Ice, Compress, Elevation) angewendet. Hierbei soll möglichst schnell nach dem Trauma mit der Ruhigstellung, der Kühlung, der Kompression und dem Hochlagern der betroffenen Extremität begonnen werden [18, 29, 30]. Dabei wurde bis heute nicht geklärt, ob die Anwendung des RICE Schemas tatsächlich zu einem besseren Outcome führt. Besonders die Anwendung einer Kompressionsbehandlung scheint im Hinblick auf die mögliche Entwicklung eines Kompartmentsyndroms äußerst fragwürdig. Während Johannsen et al. [31] den Wirkungserfolg der Kühlung in Frage stellten, konnten Schaser et al. [32] einen positiven Einfluss auf die Regeneration auf molekularbiologischer Ebene nachweisen. Obwohl mittlerweile klar ist, dass die alleinige Anwendung des RICE Schemas nicht effektiv genug ist, um die Kontraktionskraft der Muskulatur wiederherzustellen, können die Autoren keine Alternative zum bisherigen Vorgehen geben.

Sobald das Trauma eine ausgedehnte Kontusion oder einen Weichteildefekt verursacht, bilden sich Bindegewebe und ektopische Kalzifikationen. Am Ende besteht weiterhin der Funktions-

verlust und die Regeneration bleibt unvollständig. Zwar erlangen die Patienten mit einem fibrosierten Muskel einen Teil ihrer Kontraktionskraft wieder, doch kann das fibrosierte Gewebe selbst keine Kraft entwickeln, sondern die erzeugte Kraft nur übertragen [33]. Für ein optimales funktionelles Ergebnis ist eine schnelle Entscheidung zur operativen Behandlung nach dem Trauma nötig. Järvinen et al. forderten allerdings, die Indikation zur operativen Versorgung nur äußerst vorsichtig zu stellen und sich an dem Dogma "Muskeln heilen konservativ" zu orientieren [18]. Die operative Versorgung ist auf jeden Fall bei einer kompletten Muskelruptur indiziert [5]. Große und komplexe Weichteiltraumen werden nach den Prinzipien der Friedrich'schen Wundsanierung exzidiert, die besagt, kontusioniertes, verschmutztes und kontaminiertes Gewebe „en bloc“ zu entfernen [34]. Bei großen Muskeldefekten stellt die Transplantation von gefäßgestielten Muskellappen die letzte Möglichkeit der Therapie dar. Die Funktion der Muskulatur kann hierdurch jedoch nur bedingt wiederhergestellt werden und der operative Eingriff ist mit einer hohen Entnahmemorbidity verbunden [35].

#### **1.4 Experimentelle Versuche der Muskelregeneration**

Viele Wachstumsfaktoren stimulieren das Wachstum und die Proteinsekretion von muskulären Vorläuferzellen. In in vitro Versuchen konnte die Proliferation von Satellitenzellen durch die Inkubation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 (Insulin like growth factor 1) und FGF (fibroblast growth factor) gesteigert werden [36 - 38]. Mit dem Wissen dieser Ergebnisse wurde versucht, durch die Verabreichung von IGF-1 die Satellitenzellen in vivo zu aktivieren, um so die Muskelregeneration zu fördern. Zdanowicz et al. verwendeten hierfür ein Mausmodell mit muskulärer Dystrophie Typ Duchenne. Durch den Defekt eines Gens können die Mäuse kein Dystrophin bilden, das sie für die Quervernetzung und den Zusammenhalt der Muskelfasern benötigen [39]. Ohne diese Quervernetzungen kann die Muskulatur nicht normal funktionieren. Die vierwöchige Verabreichung von rekombinantem humanem IGF-1 führte zu einer Verminderung des Proteinabbaus, der Steigerung des Proteingehaltes der Muskulatur, der Senkung von Kaliberschwankungen der Muskelfasern und zu einer häufigeren Benutzung der hinteren Gliedmaßen.

Weiter versuchte man die Bildung von funktionsbeeinträchtigendem Bindegewebe zu verhindern wobei durch die Applikation von Interferon-Gamma nach einem Schnittmuskeltrauma die Bildung von Fibrose reduziert und die Heilung des Muskels gefördert wurde [40]. Chan et al. konnten mit der Verabreichung von Suramin, einem TGF-1 Inhibitor, die Fibroblastenproliferation reduzieren und so das funktionale Outcome des Muskels verbessern [41]. Mit Rela-

xin, einem IGF-Abkömmling, wurden ähnliche Ergebnisse im Bezug auf die Reduktion des fibrotischen Gewebes und der Kraftsteigerung erzielt [42]. Durch die Applikation von autologem und mit Wachstumsfaktoren konditioniertem Serum konnte die Gruppe um Wright-Carpenter die Satellitenzellaktivität steigern und den Muskelfaserdurchmesser vergrößern [43].

## **1.5 Stammzellen**

Stammzellen werden in embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Zellen, die 5-7 Tage nach der Befruchtung aus dem Inneren der Blastozyste geerntet werden können, werden als embryonal bezeichnet. Höher entwickelte Zellen gelten als adult. Eine weitere Einteilung erfolgt durch die Klassifizierung der Stammzellen in toti-, pluri- und multipotent. Während totipotente Stammzellen sich noch in jegliche Zelle des späteren Organismus entwickeln können, nimmt die Differenzierungsfähigkeit bei pluri- und multipotenten Stammzellen weiter ab. Pluripotente Zellen können zwar noch zu jeder Zellart des Organismus differenzieren, jedoch können sie sich nicht zurück zu embryonalem Gewebe entwickeln und so keinen neuen Organismus bilden. Entsprechend sind multipotente Zellen noch weiter in der Entwicklung fortgeschritten und können nur noch zu einem begrenzten Teil der Körperzellen werden. Während embryonale Stammzellen als totipotent gelten, können adulte Stammzellen lediglich pluri- oder multipotent sein. Neueste Studien konnten jedoch die Möglichkeit einer "Rückentwicklung" von Zellen zeigen, die bisher als determiniert angesehen wurden [44]. Es werden drei Hauptgruppen von adulten Stammzellen unterschieden [45]:

### 1. Epiblasten ähnliche Stammzellen (epiblast-like stem cells, ELSC)

Sie gehen aus Epiblasten, den Vorläufern aller drei Keimblätter, hervor und können aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften zu allen Zellen des Körpers differenzieren

### 2. Stammzellen der drei Keimblätter (germ layer stem cells)

Diese Zellen können entweder dem mesenchymalen, ektodermalen oder endodermalen Keimblatt zugeordnet werden. Ihre Differenzierungsfähigkeit ist durch ihr ursprüngliches Keimblatt festgelegt und somit gelten sie als multipotent.

### 3. Progenitorzellen bzw. Vorläuferzellen

Dieser Zelltyp gilt als determiniert d.h. sie sind bereits gewebsspezifisch. So können beispielsweise aus Chondroblasten Knorpelzellen, aus Osteoblasten Knochenzellen oder aus Myoblasten Muskelzellen entstehen.

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind multipotent und werden dem mesodermalen Keimblatt zugeordnet. Diese 1966 von Friedenstein et al. erstmals im Knochenmark von Ratten beschriebene Zellpopulation, konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden [46]. Sie besitzen ein hohes Differenzierungspotential und so können aus ihnen Knochen-, Knorpel-, Sehnen-, Muskel- und Bindegewebe hervorgehen [47]. MSC machen etwa 0,0001-0,01% aller Knochenmarkszellen aus [48, 49]. Etwas Verwirrung beim Umgang mit den MSC entsteht durch die, je nach Autor, unterschiedlich verwendete Bezeichnung dieses Zelltyps. So werden sie als mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells; MSC), mesodermale Progenitorzellen (mesodermal progenitor cells; MPC), adulte Knochenmarksstroma-Stammzellen (adult bone marrow stromal stem cells, BMSSC) oder stromale Knochenmarkszellen (marrow stromal cells, MSC) bezeichnet. Da in der aktuellen Literatur jedoch oftmals der Ausdruck "mesenchymale Stammzelle" bzw. MSC verwendet wird, wird im Folgenden dieser Begriff benutzt. Die MSC stellen eine Mischpopulation von unterschiedlichen Zellen dar, die durch verschiedene Oberflächenmarker unterschieden werden können, jedoch einige gemeinsame Marker aufweisen [50]. Die Analyse der hier verwendeten Zellen zeigte das charakteristische Muster dieser Oberflächenproteine (CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>). Die Differenzierungsfähigkeit konnte nachgewiesen werden.

## 1.6 Experimenteller Einsatz von Stammzellen

Durch die Fähigkeit der adulten Stammzellen, in verschiedenste Zellen zu differenzieren, werden sie heute in einigen medizinischen Gebieten für die Heilung von Krankheiten eingesetzt [50]. In erfolgsversprechenden Versuchen konnte die Kontraktionskraft der Herzmuskulatur nach einem Infarkt verbessert werden [51 - 61]. Weiter wurde der Einfluss einer Stammzelltherapie auf genetische Krankheiten wie Thalassämien oder lysosomale Speicherkrankheiten [62] und neurologische Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson [63], untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Transplantation von Stammzellen in der Rheumatologie zur Therapie von Knorpeldefekten bei rheumatoider Arthritis [64] und bei Leukämien [65].

Die Idee, die Regeneration zerstörter Skelettmuskulatur durch die Transplantation von Zellen wiederherzustellen, nahm seinen Anfang in Versuchen, bei denen Myoblasten in einem Mausmodell der Muskeldystrophie Typ Duchenne in den Skelettmuskel injiziert wurden. Die Myoblastentransplantation führte zu einer Dystrophinexpression in einem Teil der Muskelfasern. Irintchev et al. applizierten 1997 an Soleus Muskeln ein Kältetrauma und konnten durch die Transplantation von  $10^6$  Myoblasten die Kraft gegenüber der untransplantierten Kontrollgruppe deutlich steigern [21].

Im Bereich der Unfallchirurgie und der Orthopädie finden Stammzellen besonders großes Interesse in der Anwendung zur Regeneration von zerstörtem Knorpel [66], sowie in der Rekonstruktion von Frakturen [67] und Sehnen [68]. Für die Regeneration von Muskulatur transplantierten Ferrari et al. beta-Gal markierte Knochenmarkszellen in immunsupprimierte Mäuse. Eine chemische Traumasimulation wurde 24 Stunden vor der Transplantation durch die Applikation des Muskelgiftes Kardiotoxin hervorgerufen. Die Gruppe konnte zeigen, dass es zu einer Integration der applizierten Zellen in die Muskelfasern kam. In weiteren Studien wurden Mäusen mit einem Defekt im Dystrophingen allogene Stammzellen transplantiert. Nach der Transplantation konnten immunhistochemisch dystrophinexprimierende Fasern identifiziert werden [25]. Natsu et al. ahmten 2004 ein Trauma bei Ratten durch eine Schnittverletzung des M. tibialis anterior nach. Direkt nach dem Trauma transplantierten sie mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markierte und in einem Kollagenetz fixierte MSC in den Muskel. Durch die Behandlung mit den MSC war die Kraft der Tiere nach einem Monat, im Vergleich zur gesunden Gegenseite, mit 99% nahezu komplett wieder hergestellt. Auf die Kritik an der Art der Traumatisierung und der Auswertung der Ergebnisse wird in der Diskussion eingegangen [33].



Der Transplantationszeitpunkt der Stammzellen nach dem Trauma wird bisher unterschiedlich diskutiert. Wie oben beschrieben, wurden die Zellen bisher direkt nach dem Trauma [33] und 24 Stunden [23] danach transplantiert. Nach Huard et al. führt der Untergang der Skelettmuskulatur nach einem Trauma initial zu einer bis zu zwei Wochen dauernden Inflammationsphase, die fließend in eine Phase der Regeneration übergeht. Da die Aktivierung der Myoblasten und Satellitenzellen in der Regenerationsphase erfolgt, scheint der Zeitpunkt der Transplantation in diese Phase am sinnvollsten [2, 17].

Systemische Applikationswege der Stammzellen wurden in tierexperimentellen Versuchen vor allem im Bereich der Kardiologie und Neurologie untersucht. Neben intravenösen (V. femoralis [69], V. portae [70], Schwanzvene [71]) und intraperitonealen [69] kamen auch intraventrikuläre [71, 72] und intraarterielle (A. renalis [70], A. femoralis [69]) Zugangswege zum Einsatz. Natsu et al. transplantierten die Zellen nach deren Einbettung in einen Fibrin Block lokal in den zuvor traumatisierten M. tibialis anterior [33]. Matziolis et al. injizierten die MSC, nachdem die Zellen in 20 µl NaCl gelöst worden waren, lokal in den traumatisierten M. Soleus [2].

## **1.7 Magnetresonanztomographie**

Die mittels eines MRT erzeugten Schnittbilder lassen eine hervorragende Beurteilung der Organe und Organveränderungen des menschlichen oder tierischen Körpers zu. Da für die Bilderzeugung ein magnetisches Feld und keine Röntgenstrahlen genutzt werden, sind die untersuchten Individuen keiner Strahlung ausgesetzt. Bei der MRT nutzt man die Eigenschaft von Protonen, einen Eigendrehimpuls (Spin) zu besitzen, wodurch die Atomkerne als magnetische Kreisel angesehen werden können. Wird ein solcher Kreisel in ein Magnetfeld gebracht, richtet er sich nach diesem aus und verharrt in dieser Position. Sendet man nun einen Radiowellenimpuls auf den Atomkern, wird dieser aus der starren Position gelöst und beginnt zu taumeln. Die kreiselnden Atome stellen Dipole dar, die Radioenergie abstrahlen, während sie sich wieder in die ursprüngliche, starre Position zurück bewegen. Das entstehende Radiosignal kann außerhalb des Körpers registriert und von einem Computer in ein Bild umgerechnet werden. Die Zeit, die die Protonen benötigen, um wieder in ihre Ausgangsposition zurück zu kehren, wird Relaxationszeit genannt. Die unterschiedlichen Gewebe weisen hierbei unterschiedliche Relaxationszeiten auf und können so später voneinander differenziert werden [73].

Das hier verwendete 7-Tesla MRT erlaubt enorm hohe Auflösungen, die mit den entsprechenden Scan Sequenzen die Darstellung von Strukturen auf Zellgröße erlauben.

## **1.8 Zelluläre Bildgebungsverfahren**

Obwohl die Stammzelltherapie schon heute in der Praxis eingesetzt wird, ist bislang wenig über das Verhalten der Zellen nach der Transplantation bekannt. Die Therapiemöglichkeiten erfordern neue Techniken zur Verfolgung der transplantierten Zellen. Bisherige Versuche einzelne Zellen zu visualisieren, konzentrierten sich auf die Szintigraphie [74], Positronen-Emissions-Tomographie (PET) [75] und Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) [76]. Die MRT lässt sowohl im Menschen als auch im Kleintiermodell eine hohe Ortsauflösung zu. So können in dem hier verwendetet 7-Tesla Kleintier-MRT maximale Auflösungen bis zu 30  $\mu\text{m}$  realisiert werden. In diesem Bereich bewegt man sich nur knapp über dem Durchmesser einer Stammzelle (ca. 20  $\mu\text{m}$ ), womit eine zelluläre Darstellung im MRT möglich ist. Für eine gute Detektion ist allerdings eine effiziente magnetische Markierung erforderlich. Die bislang beste Möglichkeit stellt die Markierung von Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln dar, um Zellen im MRT nachweisen zu können [77 - 80]. Der Eisenoxidkern hat ein eigenes lokales Magnetfeld und verursacht dadurch im Magnetfeld des MRT Inhomogenitäten. Nach einem Anregungsimpuls durch Radiowellen kommt es zu einer schnelleren Rückkehr der den Eisenkern umgebenden Protonen (Dephasierung). Dies resultiert in einer Reduktion der Relaxationszeit und somit zum Signalverlust in den Bildern. Dieser Signalverlust stellt sich in den verschiedenen Gewichtungen dunkel dar.

## **1.9 Charakterisierung der Eisenoxidnanopartikel**

Die verschiedenen Typen der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel unterscheiden sich zum einen in der Größe ihres Eisenkerns, zum anderen in der den Kern umgebenden Hülle. Während der Kern letztendlich für die Bildgebung der entscheidende Parameter ist, dient die Hüllstruktur der Abgrenzung der Partikel gegenüber dem Zytosol und verhindert deren Agglutination. Darüber hinaus kann über die Größe und Ladung der Hüllstruktur die Inkorporation in die Zelle und das Abbauverhalten der Partikel beeinflusst werden. Die Verwendung von Monomeren als Umhüllung erlaubt die Herstellung äußerst kleiner Eisenpartikel. Herkömmliche USPIO (ultra small superparamagnetic particles of iron oxide) mit einer polymeren Dextranhülle und einer daraus resultierenden Partikelgröße von 30 – 150 nm sind deutlich

größer als die hier verwendeten, mit Citrat ummantelten VSOP (very small superparamagnetic iron oxide particles) C-200 (Ferropharm, Teltow, Deutschland). Sie bestehen aus einem 5 nm durchmessenden Eisenoxidkern und einer den Kern umgebenden Zitrahülle. Der resultierende Gesamtdurchmesser beträgt 9 nm, wobei das Konstrukt eine saure Oberflächenladung aufweist [81]. Die Hülle der Partikel kann in der Blutbahn abgebaut und der Eisenkern dem Körpereisenpool zugeführt werden [82]. Des Weiteren ist die Markierungseffizienz der VSOP jenen der USPIO überlegen [83].

Eine mögliche toxische Wirkung von Eisenpartikeln wurde an mehreren verschiedenen Zellarten untersucht. Weder bei hämatopoetischen Vorläuferzellen [84], T-Zellen [85], noch bei Fibroblasten [86] oder embryonalen Rattenstammzellen [3, 87] konnte eine Einschränkung der Vitalität und Proliferation gefunden werden.

In der neurologischen Forschung finden Eisenoxid-basierte Nanopartikel zur Darstellung von Migrationsvorgängen im Gehirn nach einem Schlaganfall Verwendung. Hoehn et al. transplantierten Mäusen zwei Wochen nach einer zentralen Ischämie eisenmarkierte embryonale Stammzellen und konnten eine Migration entlang des Corpus callosum in das Infarktareal der kontralateralen Hemisphäre beschreiben [88]. Die Anreicherung von systemisch injizierten Stammzellen aus dem Knochenmark konnte in einem Modell einer kortikalen Läsion mit der MRT visualisiert und deren Migrationsgeschwindigkeit registriert werden [89, 90]. In der Klinik dienen die Eisenpartikel in Endorem® (Guerbet, Sulzach, Deutschland) und Resovist® (Bayer Schering Health Care, Berlin, Deutschland) als Kontrastmittel zum Nachweis fokaler Leberläsionen und der Darstellung der Milz in der MRT [91]. Im Bereich der Lymphknoten-diagnostik und der Knochenmarksdiagnostik werden Eisenpartikel für das Tumorstaging eingesetzt [84, 92]. Ein weiteres großes Einsatzgebiet stellt die MR-Angiographie und die Thrombosedagnostik mit den Partikeln als Kontrastmittel dar [93]. Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel werden experimentell für die Markierung von Makrophagen [83], das Zelltracking in der Schlaganfallforschung [3] sowie als angiographisches Kontrastmittel [94] effektiv eingesetzt. Schnorr et al. haben die Eisenpartikel zur Detektierbarkeit von fokalen Leberläsionen an Hasen untersucht [95]. Die hier angewandten Partikel waren in der Identifikation der Leberläsionen dem bereits seit 1988 in der Praxis verwendeten Kontrastmittel Magnevist® (Bayer Schering Health Care, Berlin, Deutschland) deutlich überlegen. Dieses Gadolinium-basierte Kontrastmittel ist das am häufigsten verwendete Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie [96]. Der Partikel C-200 hat bereits klinische Phase I Studien erfolgreich abgeschlossen [97].

## **1.10 Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob mittels Magnetresonanztomographie lokal transplantierte, durch Eisenoxidnanopartikel markierte, mesenchymale Rattenstammzellen in einem standardisierten Skelettmuskeltrauma der Ratte *in vivo* visualisiert werden können.

In Vorarbeiten konnte die Gruppe um Matziolis et al. die Kraft des M. soleus bei Ratten nach einem schweren Quetschtrauma durch eine lokale Transplantation von autologen MSC um 14% verbessern [2]. Dieser Arbeit waren methodische Grenzen gesetzt. Zur Beurteilung der Muskelregeneration standen durch die alleinige histologische Auswertung lediglich Momentaufnahmen zur Verfügung, die nur *ex vivo*, *post mortem* und retrospektiv bewertet werden konnten. Ein intra-individueller Verlauf war hierbei nicht darstellbar, d.h. es konnten nur die Ergebnisse unterschiedlicher Individuen und nicht das Verhalten der transplantierten Zellen in einem einzelnen Tier über die Zeit beurteilt werden. Das Verhalten und der Verbleib der Stammzellen nach der Transplantation waren somit nach wie vor unklar und es musste nach einem Verfahren gesucht werden, durch das diesen Fragen weiter nachgegangen werden konnte. Da bisher mesenchymale Rattenstammzellen noch nicht mit dem Eisenpartikel C-200 inkubiert und transplantiert wurden, hatte die vorliegende Arbeit folgende aufeinander aufbauende Ziele:

1. Die prinzipielle Durchführung einer Markierung von mesenchymalen Rattenstammzellen mit dem Eisenoxidpartikel C-200.
2. Der Einfluss der VSOP auf die Biologie der MSC bzw. die Toxizität der VSOP in vitro.
3. Die Identifikation der idealen VSOP-Beladungskonzentration der MSC (= minimale Beladungskonzentration bei maximaler Relaxationszeit).
4. Die Detektion der markierten Zellen in vitro und in vivo im MRT.
5. Das Verhalten und der Verbleib der Zellen nach der Transplantation.
6. Der Einfluss markierter MSC vs. unmarkierter MSC auf die Kraftentwicklung zur Bewertung des Einflusses der VSOP-Markierung auf die Funktion der MSC in vivo.

Aus diesen Zielen wurden die nachstehenden drei Hypothesen formuliert:

1. *Mesenchymale Stammzellen der Ratte können durch Eisenoxidpartikel (VSOP) markiert und in vitro im MRT detektiert werden.*
2. *Die Markierung hat keinen Einfluss auf die Vitalität, Proliferation und Funktion der Zellen.*
3. *Die Markierung erlaubt die in vivo-Darstellung der Zellen nach Transplantation im Zeitverlauf.*

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 In vitro**

#### **2.1.1 Zellkultur**

Das durch eine Knochenmarksbiopsie gewonnene Material wurde zunächst bei 1500 Umdrehungen pro Minute (RPM) für 4 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus-Sepatech, Osterode, Deutschland), in 10 ml Medium resuspendiert, in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und auf 30 ml mit 10% fetalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) und 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) versetzten DMEM-Medium aufgefüllt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> für 21 Tage kultiviert. Nicht adhärente Blutbestandteile wurden durch die anschließenden Mediumwechsel ausgewaschen. Die Zellen wurden anschließend einer FACS Analyse unterzogen (FACSCalibur™, BD Biosciences, Franklin Lakes,

USA). Hierzu wurden die Maus Antikörper  $\alpha$ -rat CD44 (Serotec, Oxford, United Kingdom),  $\alpha$ -rat CD45,  $\alpha$ -rat CD90 (beide Acris Antibodies, Herford, Deutschland),  $\alpha$ -rat CD73 und  $\alpha$ -mouse IgG (beide BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet. Weiter wurde die Differenzierungsfähigkeit in Zellen mesenchymaler Gewebe durch eine Kultivierung der MSC in adipogenem und osteogenem Medium überprüft. Während das osteogene Medium mit

200  $\mu$ M Ascorbinsäure, 7 mM  $\beta$ -glycerophosphate und 0,01  $\mu$ M Dexamethason versetzt wurde, enthielt das adipogene Medium zusätzlich 1  $\mu$ M Dexamethason, 2  $\mu$ M Insulin, 200  $\mu$ M Indomethazin und 500  $\mu$ M Isobutylmethylxanthin (alle Substanzen BD Biosciences, Deutschland). Die Passage der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 60% durchgeführt, um die Proliferationsrate hoch und die Differenzierungswahrscheinlichkeit gering zu halten. Bei Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, 2 mal mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gespült. Anschließend wurden pro 175cm<sup>2</sup> Flasche 5 ml 0,25% Trypsin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben, um die adhärenen Zellen zu lösen. Nach 5 Minuten Inkubation der Zellen bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Reaktion mit 10 ml Medium abgestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1500 RPM zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 300cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät.

## 2.1.2 Markierung der Zellen

### 2.1.2.1 Eisenoxidnanopartikel

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transplantation für die Markierung vorbereitet, indem sie wie oben beschrieben, geerntet und in 50 ml Tubes (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA) überführt wurden. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS, um eine mit verbliebenem Trypsin verunreinigte Transplantation von Zellen zu verhindern. Die Vitalität der Zellen wurde jedes Mal vor der Markierung in einer Neubauer Zählkammer (Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland) bestimmt. Anschließend wurden  $10 \times 10^6$  Zellen separiert. Für die darauf folgende Inkubation wurde je nach Versuchsaufbau eine Zell-VSOP-Konzentration von 0,375 mM bis 6 mM gewählt und die Inkubation für 90 Minuten durchgeführt, wobei alle 30 Minuten die Lösung resuspendiert wurde. Nun wurde erneut drei Mal mit PBS gewaschen und die Vitalität der Zellen bestimmt. Je nach Versuchsgruppe wurde die gewünschte Zellzahl von 2,5, 3 oder  $5 \times 10^6$  hierauf in ein 15 ml Tube überführt und in 2 ml DMEM-Medium gelöst.

### 2.1.2.2 Hoechst Zellkernmarkierung

Die Zellen von zwei Tieren wurden neben der Eisenmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 markiert, der bereits routinemäßig für die Verfolgung von transplantierten Zellen angewandt wird und den Zellkern spezifisch markiert [98 - 100]. Hierzu wurde der Farbstoff mit einem Integra Mikrofilter (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland) sterilisiert und im Anschluss an die Markierung der Zellen mit den Eisenoxidnanopartikel für fünf Minuten in einer Konzentration von 7,5 µg/ml auf die Zellen gegeben.

### 2.1.3 Vitalitätsbestimmung und Proliferationsassay

Für die Erfassung der Vitalität wurden die MSC mit Trypanblau (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Apoptotische Zellen können den Farbstoff Trypanblau nicht mehr aus der Zelle transportieren und färben sich somit blau an. Unter Zuhilfenahme einer Neubauer – Zählkammer konnten so avitale von vitalen Zellen unterschieden und quantifiziert werden. Die Bestimmung wurde während des gesamten Versuchszeitraumes vor und nach jeder Inkubation durchgeführt. Die Färbelösung enthielt 100 µl 0,4% Trypanblau und 90 µl DMEM Medium.

Des Weiteren wurde die Auswirkung der Markierung auf das Proliferationsverhalten der Zellen *in vitro* über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Die Behandlung der Zellen von Biopsie bis zur Aussaat der Zellen auf die Proliferationsplatten, erfolgte hierbei nach dem gleichen Protokoll, welches auch später bei den *in vivo* Versuchen Anwendung fand. Die Zellen von sechs Ratten wurden hierzu mit einer Eisenpartikelbeladungskonzentration von 1,5 mM nach dem oben beschriebenen Protokoll markiert und auf zwei 96-Loch (Well)-Platten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. In jedes Well wurden  $3 \times 10^3$  in 250 µl Medium suspendierte Zellen pipetiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und Zellen jeder Ratte wurden ausgezählt (je Ratte 8 wells/ Zählung) (CASY cell counter, Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland). Hierzu wurden die Zellen mit 250 µl 0,25% Trypsin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) abgelöst und resuspendiert.

#### 2.1.4 Relaxometrie und Eisengehaltmessung

Die Inkubation der Zellen erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die Beladungskonzentrationen der Suspensionen waren aufsteigend von 0,375 bis 6 mM gewählt worden.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Medium gelöst und die Zellsuspension in ein ventiliertes 14 ml Gefäß (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA) überführt. Im Relaxometer (Minispec, Bruker, Ettlingen) wurde die transversale Relaxationszeit ( $T_2$ -Zeit) der Zellen bei 0,49 Tesla gemessen. Neben einer Kontroll-Probe, die nur 1 ml Medium enthielt, wurden auch  $1 \times 10^6$  unmarkierte Zellen gemessen. Für die Messung standen die Zellsuspensionen jeweils in zweifacher Ausführung zur Verfügung.

Nach der Bestimmung der Relaxometriezeiten wurden die Zellen durch Zufügen von 1 ml  $\text{HNO}_3$  (Merck, Darmstadt) und 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck) lysiert. Die Firma Ferropharm (Teltow, Deutschland) filtrierte die Zellsuspension und quantifizierte den Eisengehalt durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) (Solaar, Unicam, Cambridge, UK).

#### 2.1.5 In vitro Visualisierung

Da ein Modell für die Markierung und anschließende Darstellung von mesenchymalen Rattenstammzellen im MRT bisher nicht existiert, musste die prinzipielle Durchführbarkeit zunächst mittels in Gel gegossener, VSOP markierter Zellen überprüft werden (Gelphantom). Für die Präparation eines solchen Gelphantoms wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE – Puffer (beide Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) gelöst. Neben dem Kontroll – Phantom mit unmarkierten Zellen, wurden Phantome mit 1,5 mM und 3 mM VSOP-Beladungskonzentration angefertigt (Abb. 1). Die Zellen wurden schichtweise in das Gel eingebettet. Hierzu wurden 20 ml der 1,5% Agarose-TBE-Lösung in ein 50 ml Falcon gefüllt und daraufhin bei 3000 RPM für 4 Minuten zentrifugiert. Nach der Markierung der Zellen wurden die Zellen separiert und in 50  $\mu\text{l}$  Medium resuspendiert.



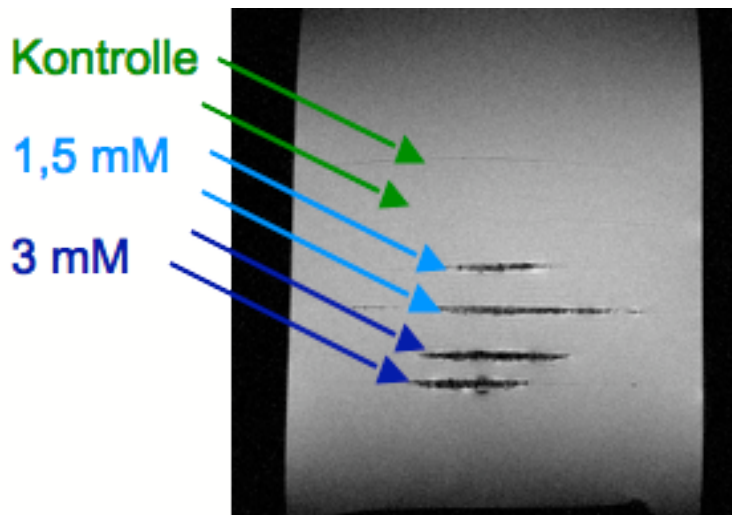


Abbildung 1: Sagittale Flash2D Aufnahme eines Gelphantoms in das je  $1 \times 10^6$  VSOP markierte Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen eingebettet waren.

Dieser Zell-Medium-Suspension wurde 50  $\mu$ l Agarose beigemischt, danach auf die ausgehärtete Gelschicht im 50 ml Falcon pipetiert und sofort für 4 Minuten bei 3000 RPM zentrifugiert. Nach dem Abkühlen der Agarose-Zellsuspension wurde durch das Einbringen von weiteren 20  $\mu$ l Agarose die nächste Schicht gegossen auf die wieder eine Zellschicht folgte.

Die Phantome wurden in das MRT eingebracht und mit denselben Scan-Sequenzen untersucht, die auch später bei den in vivo Versuchen Verwendung fanden.

Die Grauwerte der markierten Zellen wurden wie bei den in vivo Versuchen durch das Programm ImageJ (Version 1.38i, NIH, USA) analysiert und der Zellpool mittels Amira (Version 3.1.1, Mercury Computer Systems) dreidimensional rekonstruiert (siehe Kapitel 2.2.6).

## 2.2 In vivo

### 2.2.1 Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Studie wurden 42 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht 140-160 g) von Charles River Company in Massachusetts/USA verwendet. Die Versuchsreihen unterlagen der Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach §2, sowie §8 des Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt von Berlin für Gesundheit und Soziales genehmigt (Antragsnummer G 234/03). Die Versuche wurden von August 2005 bis April 2007 durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur 27°C, Luftfeuchtigkeit ca. 60%) in Standardkäfigen zunächst in der Tierversuchsanstalt der Charite in der Tucholskystrasse.

Für die MRT–Untersuchungen wurden die Tiere in die Tierversuchseinrichtung des neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité verlegt. Die Tiere erhielten Wasser ad libitum und Standardnahrung (Altromin Pellets, Altromin-GmbH, Lage, Deutschland). Alle Tiere hatten einen regelmäßigen, 12-stündlich wechselnden, Tages-Nacht-Rhythmus. Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren eine Akklimatisationszeit an die neue Umgebung von 7 Tagen gewährt.

### 2.2.2 Versuchstiergruppen und Versuchsablauf

Die 42 Ratten wurden in 7 Gruppen aufgeteilt (Tab. 1)

	<b>Tierzahl</b>	<b>Transplantation</b>	<b>Beladungskonzentration mit VSOP</b>
<b>Pilot</b>	2	$3 \times 10^6$ Zellen	3 und 1,5 mM
<b>MRT I</b>	3	$2.5 \times 10^6$ Zellen	1,5 mM
<b>MRT II</b>	3	$5 \times 10^6$ Zellen	1,5 mM
<b>MRT III</b>	2	NaCl	---
<b>Muskelkraft A</b>	10	$1 \times 10^6$	1,5 mM
<b>Muskelkraft B</b>	10	$1 \times 10^6$	---
<b>Muskelkraft C</b>	10	NaCl	---

*Tabelle 1: Verteilung der Ratten auf die einzelnen Versuchstiergruppen mit Angabe der Zellzahl der transplantierten Zellen und der VSOP-Beladungskonzentration.*

Aus den in vitro Versuchen kamen zunächst zwei Partikelkonzentrationen für die ersten in vivo Versuche in Betracht und so wurden den zwei Pilottieren je  $3 \times 10^6$  Zellen mit verschiedenen VSOP–Beladungskonzentrationen von 1,5 und 3 mM transplantiert. Nachdem durch das Pilottier mit 1,5 mM die geeignete Inkubationskonzentration der VSOP gefunden worden war, wurde diese in den folgenden Versuchstiergruppen eingesetzt. Während den Tieren der MRT-Gruppe I  $2,5 \times 10^6$  mit VSOP markierte Zellen transplantiert wurden, erhielt die MRT-Gruppe II die doppelte Anzahl markierter Zellen ( $5 \times 10^6$ ). Die Tiere der MRT-Gruppe III bekamen 20 µl Kochsalzlösung in den M. soleus gespritzt.

Die Muskelkraftgruppen dienten der funktionellen Überprüfung der markierten Zellen in vivo. Die Muskelkraftgruppen wurden in Gruppe A, B und C unterteilt, die je 10 Tiere enthielten. Muskelkraftgruppe A erhielt  $1 \times 10^6$  markierte Zellen. Die Tiere der Gruppe B bekamen die gleiche Anzahl unmarkierter Zellen transplantiert. Den Tieren der Gruppe C, die als Kontroll-

gruppe gegenüber A und B fungierte, wurde 20 µl physiologische Kochsalzlösung in den M. soleus injiziert.

Die Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf des Versuches.

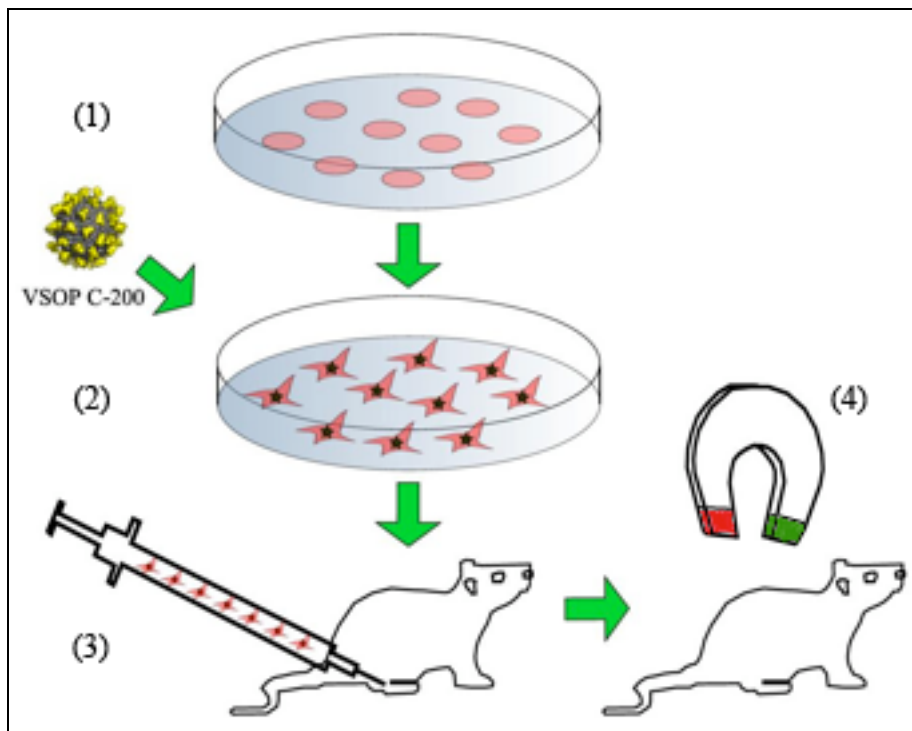


Abbildung 2: Nach der Kultivierung der MSC (1) wurden diese mit dem VSOP C-200 markiert (2) und daraufhin lokal in den M. Soleus einer Ratte transplantiert (3). Anschließend konnten die Zellen mittels eines MRTs verfolgt werden (4) (Adaptiert aus [101])

Die Dauer des Versuchs erstreckte sich über einen Zeitraum von 6 Wochen (Tab. 2). Am ersten Tag erfolgte die Biopsie des Knochenmarks, welches für 3 Wochen kultiviert wurde. Am Tag 14 nach der Biopsie wurde das Trauma gesetzt. Neben dem Start der MRT-Untersuchungen mit der praeoperativen Kontrollaufnahme am Tag 20 erfolgte die Markierung der Zellen mit den VSOP, die am Tag 21 transplantiert wurden. Die Kraftmessungen des behandelten und des kontralateralen M. soleus wurde 3 Wochen nach der Transplantation durchgeführt.

Tag 0	Tag 14	Tag 20	Tag 21	Tag 42
Biopsie	Trauma	Zellmarkierung Start MRT	Transplantation	Funktionelle und histolog. Auswertung

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf der Versuche

### 2.2.3 Narkose und Schmerztherapie

Die Injektionsnarkose bestand aus einer Mischung von Ketamin (Ursotamin, 100mg/ml, Serum-Werk Bernburg AG) und Xylazin (Rompun, 20mg/ml, Bayer HealthCare) in einem Verhältnis von 5:1. Den Ratten wurden 0,15 ml dieser Lösung subkutan verabreicht. Dadurch war eine suffiziente Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation gewährleistet. Bei den MRT – Untersuchungen wurde eine inhalative Narkose mit Isofluran/O<sub>2</sub> durchgeführt.

Zur postoperativen Schmerztherapie wurde 5mg/kg KG Rimadyl (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Applikation erfolgte direkt nach den Operationen und wurde 24 Stunden später wiederholt.

### 2.2.4 Operative Verfahren

#### 2.2.4.1 *Biopsie*

Die Beine wurden mit einer Schermaschine (Favorita II, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) rasiert und das Tier auf dem Rücken gelagert. Das OP-Gebiet wurde mit der antiseptischen Lösung Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert und zirkulär abgedeckt. Nach Aufsuchen des Lig. patellae und der Tuberositas tibiae, erfolgte eine Inzision circa 1 mm medial des Lig. Patellae über eine Schnittlänge von circa 5 mm. Anschließend wurde das Lig. patellae dargestellt, das Periost nach medial abgetragen und mit NaCl gespült. Es folgte das Aufsetzen eines 1 mm Handbohrers (Krick, Knittlingen, Deutschland) auf der Tibia medial der Tuberositas tibiae. Unter moderatem Druck wurde die mediale Corticalis durchbohrt. Nach Einführen einer 18 G Nadel an einer 5 ml Spritze ins Bohrloch wurde vorsichtig aspiriert bis Knochenmark in der Spritze erschien. Die Spritze wurde unter Aspiration und Wahrung der Sterilität herausgezogen und der Inhalt in ein mit 10 ml Medium (DMEM, 10% FCS, PS) gefülltes 50 ml Falcon–Tube (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA) überführt. Die Wunde wurde abermals mit NaCl gespült. Die Haut wurde mit einer fortlaufenden Naht spannungsfrei verschlossen. Die analgetische Therapie erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3).

#### *2.2.4.2 Muskeltrauma*

Die Vorbereitung der Ratte zur Operation erfolgte wie bei der Biopsie (siehe Kapitel 2.2.4.1). Mit einem Skalpell der Größe 15 erfolgte ein Hautschnitt 3 mm kranial des Calcaneus und lateral des Tendo calcaneo über ca. 1,5cm entlang des lateralen Randes des Bauches des M. gastrocnemius. Anschließend wurde die Haut über dem Hautmuskel präpariert und auf der gesamten Schnittlänge durchtrennt. Der Hautmuskel wurde von den darunter liegenden muskulären Strukturen getrennt. Nach Identifizierung des M. gastrocnemius, wurde der Muskel, unter Erhaltung des Gefäß-Nerven-Bündels gegenüber dem M. soleus separiert. Der M. soleus wurde sorgfältig von der tiefer liegenden Peronealmuskulatur gelöst. Knapp über dem Beginn des Tendo calcaneo wurde der M. soleus von medial mit der Schere stumpf unterminiert und eine mit einem Polyethylenschlauch ummantelte krumme Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) von medial über dem Beginn des Tendo calcaneo eingeführt. Die Ummantelung diente dem Schutz der Muskelfaszie. Das erste Trauma wurde knapp über dem Beginn des Tendo calcaneo gesetzt. Das zweite und dritte Trauma wurde kranial des jeweils vorangegangenen Traumas appliziert. Die vierte und fünfte Traumasimulation wurde kranial des Gefäß-Nerven-Bündels wiederholt. Nach einer Spülung mit NaCl wurde der Hautmuskel mit 3 Einzelknopfnähten spannungsfrei verschlossen. Die Spülung wurde hier nochmals wiederholt, um Infektionen vorzubeugen. Anschließend erfolgte der spannungsfreie Verschluss der Haut mit einer fortlaufenden Naht. Die Schmerztherapie wurde wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben durchgeführt.

#### *2.2.4.3 Präparation der Zellen und deren Transplantation*

Die Transplantation der Zellen erfolgte am Tag 21. Zellen, die mit VSOP beladen worden waren, wurden direkt nach der Markierung transplantiert. Hierfür wurde die Ratten narkotisiert, nach Erlöschen der Schutzreflexe rasiert und auf dem Bauch gelagert. Die Narbe der Trauma-Applikation wurde zunächst auf einer Schnittlänge von circa 1cm wieder eröffnet. Wieder folgte die Präparation des Hautmuskels, dessen Durchtrennung auf gesamter Schnittlänge und anschließender Darstellung des M. gastrocnemius und M. soleus.

Währenddessen wurden die vorbereiteten 15 ml Tubes mit den Zellen für 10 Minuten bei 1500 RPM zentrifugiert, das Medium verworfen und die MSC in 20 µl 0,9% NaCl gelöst. Es folgte die Aspiration der Zellen in den Konus einer Tuberkulin Spritze (25 G, Norm-Ject, HSW, Tuttlingen Germany). Die Nadel wurde knapp über dem Beginn des Tendo calcaneo im Verlauf des M. soleus eingeführt und die Zellen transplantiert.

Anschließend wurde die Nadel langsam entfernt, zunächst der Hautmuskel mit Einzelkopfnähten und dann die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

Die Kontrolltiere der MRT Gruppe erhielten in gleicher Weise 20 µl einer 0,9% NaCl-Lösung ohne Zellen. Die Tiere der Muskelkraftgruppen erhielten in gleicher Weise  $1 \times 10^6$  Zellen bzw. die Kontrolltiere 20 µl Kochsalzlösung.

#### 2.2.4.4 *Biomechanische Auswertung*

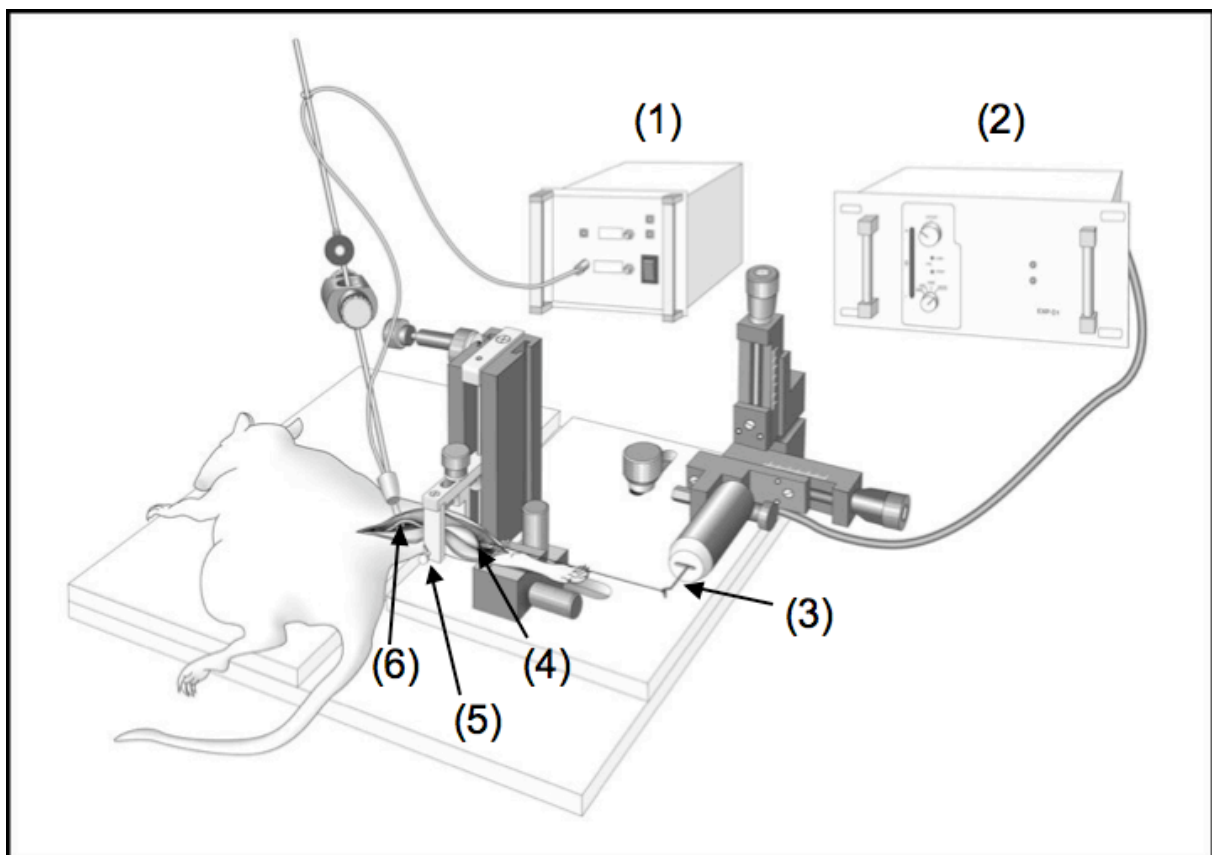
##### 2.2.4.4.1 Präparation des M. soleus und des N. ischiadicus

Nach der Narkotisierung wurden erneut beide Beine der Ratten rasiert. Zu Beginn wurde das rechte Bein der Ratte für die Messung vorbereitet. Nach Lagerung der Ratte auf dem Bauch wurde der Hautschnitt vom Calcaneus auf dem M. gastrocnemius und der Ischio-Crural-Muskulatur bis hinauf zum Os sacrum gesetzt. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des Hautmuskels einer stumpfen Präparationsschere (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) ohne darunter liegende vaskuläre Strukturen zu verletzen. Nach Darstellung des N. ischiadicus wurde der Hautmuskel in Richtung des Os Sacrum weiter eingeschnitten. Anschließend erfolgte die Präparation des Hautmuskels nach distal zum Calcaneus. Hierauf wurde der M. soleus komplett unter Erhaltung des Gefäß-Nerven-Bündels dargestellt. Das Tendo Calcaneus wurde in seine Anteile des M. soleus und des M. gastrocnemius separiert. M. soleus wurde direkt am Calcaneus abgetrennt. Die Vorbereitung des Muskels für den Anschluss an die Messanlage gelang unter der Verwendung von Vicryl-Nahtmaterial der Stärke 4-0 (Johnson & Johnson Medical, Schweiz). Hierzu wurde das Ende des Tendo calcaneus je einmal in koronarer und sagittaler Ebene durchstoßen und durch einen Knoten gesichert. Anschließend erfolgte die Kraftmessung und darauf folgend die Präparation und Messung der Gegenseite.

##### 2.2.4.4.2 Die Messeinrichtung für die funktionelle Auswertung

Die funktionellen Ergebnisse wurden durch eine computergestützte Messanlage erfasst [102, 103] (Experimetria, Budapest, Ungarn). Über eine Elektrode wurde der N. ischiadicus elektrisch gereizt, was zu einer konsekutiven Kontraktion des M. soleus führte. Die Kraftentwicklung in Newton wurde aufgezeichnet. Neben einem Modus für die tetanische Kontraktion stand ein Modus für Fast Twitch Kontraktionen zur Verfügung, die in unserer Arbeitsgruppe für diese Anwendung programmiert (Visual Basic, Version 8, Microsoft, Redmond, Washington, USA) worden waren.

Während unter einer tetanischen Kontraktion eine lang andauernde Maximalkontraktion verstanden wurde, zeichnete sich eine Fast Twitch Kontraktion durch kurz andauernde Maximalkontraktionen aus. Beide Modi waren fest programmiert und ließen sich durch den Untersucher nicht beeinflussen. Im Fast Twitch Modus wurde der N. ischiadicus fünf mal mit einer Stromstärke von 9 mA und 75 Hz (bipolar) für 0,1 Sekunden stimuliert, wobei 8 Durchgänge mit einem Pausenintervall von 5 Sekunden durchgeführt wurden. Der tetanische Stimulationsmodus Stromstärke war bei gleicher Stromstärke und Frequenz 3 Sekunden lang. Die Pausenintervalle zwischen den Stimulationsphasen betragen 5 Sekunden.



*Abbildung 3: Schematische Zeichnung der Muskelkraft-Messanlage während einer Messung des rechten M. soleus. Im Hintergrund: Der Impulsgeber (1) und das Gerät zur Kraftaufzeichnung (2), vorne der Abnehmer für die Kraftentwicklung (3), der präparierte M. soleus (4), die Fixierung der zu messenden Extremität auf Höhe des Knies (5) und der frei liegende N. ischiadicus (6).*

Die Ratte wurde ähnlich der Abbildung 3 auf den Untersuchungstisch der Messanlage gelegt, der N. ischiadicus an die Elektrode angeschlossen, die zu messende Extremität auf Höhe des Knies fixiert und der M. soleus über den angeknüpften Vicryl-Faden mit dem Kraftabnehmer fest verbunden. Mittels eines an die Anlage angeschlossenen Notebooks (Acer, Taipeh, Tai-

wan) wurde die Messung gestartet. Nachdem die beiden genannten Modi durchgelaufen waren, wurde das linke Bein nach dem oben beschriebenen Protokoll präpariert und ebenfalls gemessen. Anschließend wurde der M. soleus explantiert und sowohl die Muskeln als auch die Ratten gewogen. Die Muskeln der wurden für die weiterführenden histologischen Untersuchungen in 4% Formaldehyd fixiert. Am Ende der Untersuchung wurden die Ratten euthanasiert.

#### *2.2.4.5 Transkardiale Perfusionsfixierung*

Für die histologischen Kryo-Schnitte der Muskeln wurden die Ratten 3 und 7 transkardial perfundiert. Nach der Narkoseapplikation wurde der ventrale Thorax und die Bauchwand rasiert. Es folgte die Eröffnung des Thorax und die Präparation des Herzens. Nach Einführen eines Venenverweilkatheters (Braunüle 20G, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in den linken Ventrikel wurde für den Ausgleich des Perfusionsdruckes das rechte Atrium eröffnet. Zunächst wurde über einen Perfusor (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit 100 ml PBS vorgespült. Anschließend erfolgte die Perfusion der Ratten bei konstantem Perfusionsdruck mit 200 ml einer 4% PBS gepufferten Glutaraldehydlösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

#### 2.2.5 MRT – Untersuchungen

Die MRT-Untersuchungen erfolgten an einem Magnetresonanztomographen für Kleintiere bei 7 Tesla (Bruker Pharmascan, Ettlingen) in einer 68 mm Spule (Abb. 4). Hierzu wurden die Ratten mit Isofluran und medizinischem Sauerstoff als Trägergas sediert und relaxiert. Während den Messungen lagen die Ratten auf einem Wärmebett mit einer Temperatur von 37° C. Mittel einer Monitorisierungseinheit (Bruker Bio-Trig, Bruker, Ettlingen) konnte durch Messung der Herz- und Atemfrequenz die Narkosetiefe überwacht werden.



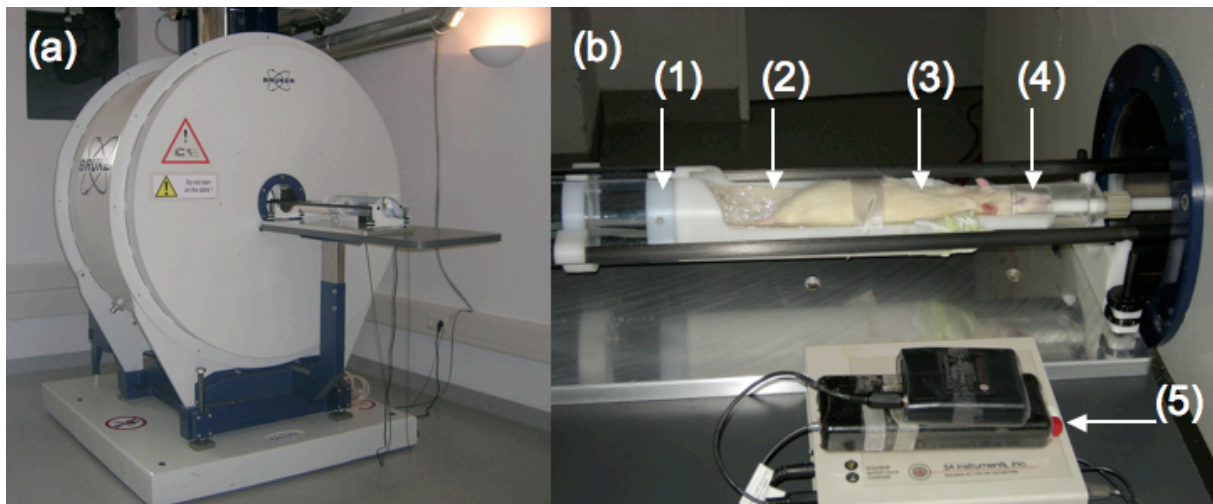


Abbildung 4: Das Kleintier MRT mit einer Magnetfeldstärke von 7 Tesla im neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité (a). Rechts (b) ist der Schlitten (1) zu sehen, auf dem die Ratte (3) in die MRT Spule geschoben wird. Die Ratte liegt dabei auf einem Wärmepad bei 37 Grad (2) und wird über die Beatmungsmaske (4) mit Isofluran narkotisiert. Im Vordergrund ist die Monitorisierungseinheit (5) für Atmung und EKG zu sehen.

Mehrere MRT Sequenzen wurden angewandt (Tab. 3). Um einen besseren Kontrast für die partikelmarkierten Zellen zu haben, wurde eine spezielle, T2\* gewichtete, Gradientenechosequenz (Flash2D) entwickelt. Bei den T1 und T2 Sequenzen wurden 35 Bilder in einem Durchgang akquiriert, so dass bei der gewählten Schichtdicke von 50 µm die Hälfte des M. soleus gemessen wurde. Daher wurden die proximalen und der distalen Anteile des Muskels in zwei Durchgängen gescannt. Um einen Informationsverlust zwischen den proximalen und distalen Sichtfenstern zu vermeiden, wurde auf eine Überschneidung der beiden Fenster geachtet. Die Flash2D Sequenz bot die Möglichkeit den Unterschenkel der Ratten mit 70 Bildern in einem Scan aufzunehmen.

Sequenzen	Auflösung	Schichtdicke	Bildanzahl	Flip Angle	Number of Averages	Repetition Time (ms)	Echo Time (ms)
BodyFisp	176x176 µm	500 µm	25	90	2	6	3
T1 axial	176x176 µm	500 µm	35	180	6	1000	10,6
T2 axial	176x176 µm	500 µm	35	0	4	6351,6	75,6
Flash2D axial	176x176 µm	500 µm	70	30	2	1500	6
Flash2D sag	176x176 µm	500 µm	35	30	2	1500	6

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sequenzen mit den jeweiligen spezifischen Parametern

Die erste Messung erfolgte einen Tag vor der Transplantation der MSC. Das Standardprotokoll ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tag	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
MRT	X		X			X			X							X							X

*Tabelle 4: Darstellung des Standard MRT Protokolls über 3 Wochen. Die Untersuchungszeitpunkte sind mit einem „X“ markiert*

Neben dem Standardprotokoll wurden die Messzeiten bei der Ratte 6 modifiziert, um genauere Erkenntnisse über die Entwicklung des Zellpools speziell in der ersten Woche nach der Transplantation zu bekommen. Für die Überprüfung einer Langzeitnachweisbarkeit der eisenmarkierten Zellen wurde der modifizierte Messzyklus auf 42 Tage ausgedehnt.

Das abgewandelte MRT Protokoll ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tag	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28	35	42
MRT	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

*Tabelle 5: Darstellung des modifizierten MRT-Protokolls der Ratte 6. Die Untersuchungszeitpunkte sind mit einem „X“ markiert.*

## 2.2.6 3D-Rekonstruktion

Die dreidimensionale (3D) Rekonstruktion der MRT-Daten wurde mit dem Programm Amira (Version 3.1.1, Mercury Computer Systems) durchgeführt. Durch die Definition des Grauwertes (Voxelvalue) in ImageJ (Version 1.38i, NIH, USA) ließen sich die Areale mit markierten Zellen in Amira darstellen und dreidimensional rekonstruieren. Aus den erhobenen Daten konnten die Veränderung der Oberfläche, des Volumens und des Schwerpunktes des Zellpools über die Zeit und seine Veränderung im Raum berechnet werden.

### 2.2.6.1 Grauwertbestimmung

Die Beladung der MSC mit Eisenoxidpartikeln führt auf den magnetresonanztomographischen Schnittbildern in den angewandten Gewichtungen T1, T2 und Flash2D zu einem Signalverlust. Areale mit eisenbeladenen Zellen stellen sich dunkler als die traumatisierte Muskulatur dar. Ähnlich den Houndsfieldeinheiten in der Computertomographie konnten die unterschiedlichen schwarz-weiß-Abstufungen der Voxel in Zahlenwerten von 0 (schwarz) bis

32766 (weiß) ausgedrückt werden. Hierzu wurden die zu untersuchenden Areale in ImageJ umrandet (ROI, Region Of Interest) und die darin enthaltenen minimalen und maximalen Pixelgrauwerte extrahiert. Die Grauwerte der Zellareale wurden intraindividuell für jede Ratte vor der 3D-Markierung erfasst.

#### *2.2.6.2 Ausmessung der 3D-Modelle*

Die Ausmessung des rekonstruierten Zellpools in axialer, sagittaler und koronarer Ebene wurde ebenfalls mittels des Programms Amira durchgeführt. Um ein normiertes Ergebnis zu erhalten mussten die Zellpools der einzelnen Messzeitpunkte auf ein einheitliches Koordinatensystem transformiert werden. Dazu wurde zunächst die Oberfläche des Knochens des ersten Messzeitpunktes analysiert. Nach der Analyse der Knochenoberfläche des zweiten Messzeitpunktes konnte die Oberfläche des zweiten über die des ersten Tages gelegt werden. Die Veränderung der Koordinaten bei der Überlagerung der Knochenoberfläche des zweiten Messzeitpunktes in seinem Koordinatensystem wurde registriert und abgespeichert. Dann wurden die Zellpools des ersten und zweiten postoperativen Tages rekonstruiert. Mit dem Befehl „multTransform“ und der anschließenden Eingabe der zuvor errechneten Koordinatenveränderung konnte der Zellpool des zweiten postoperativen Tages direkt in das Koordinatensystem des ersten post-OP Tages transformiert werden. Das Modul „Lineprobe“ errechnete dann die Distanzen der maximalen Endpunkte der 3 Ebenen. Dieser Prozess wurde für alle Messzeitpunkte intraindividuell durchgeführt wobei die Position des Zellpools des ersten post-OP Tages jeweils die Referenz darstellte.

Aus den Daten der axialen Distanzmessung konnte das Wachstum der Ratten im Versuchszeitraum gemessen werden. Hierzu wurde die maximale Distanz der Artikulation der Fibula auf Höhe des Kniegelenkes und der Insertion über dem Sprunggelenk des prae-OP und letzten post-OP Tages gemessen.

#### *2.2.6.3 Auswertung der 3D-Modelle (Volumen, Schwerpunkt, Oberfläche)*

Durch die festen Referenzwerte nach der Grauwertbestimmung mit ImageJ konnten die Zellareale in den axialen Schnitten der Flash2D Sequenzen markiert und in dreidimensionale Modelle exportiert werden. Die Schnittdicke der MRT-Scans von 500 µm ließ eine detaillierte dreidimensionale Rekonstruktion zu. Unter Verwendung des Amira-Moduls „Tissuestatistics“ konnten neben dem Volumen auch die Koordinaten des Schwerpunktes ermittelt werden. Die

Oberflächenveränderung des 3D-Modells über die Zeit wurde mit dem Modul „Surfacearea“ erfasst. Die Berechnungen wurden für alle Messzeitpunkte durchgeführt.

## **2.3 Ex Vivo**

### **2.3.1 Histologie**

Nach der Muskelkraftmessung wurden die Ratten euthanasiert und die Muskeln des linken und rechten Unterschenkels für die histologische Auswertung entnommen. Die Muskeln wurden nach der Entnahme in einer 0,4% Formalinlösung konserviert und nach Dehydrierung in Paraffin fixiert. Neben einer Hämatoxylin/Eosin Färbung wurde an den histologischen Schnitten eine Berliner Blau Färbung für den spezifischen Nachweis von bivalentem Eisen durchgeführt. Aus den Paraffinblöcken wurden für die HE- und Eisen-Färbung 6 µm dicke longitudinale Schnitte des Muskels hergestellt. Für die Lösung wurden 5g Siriusrot in 500 ml Pikrinsäure (Fluka, Seelze, Germany) gelöst. Für die Eisenfärbung wurden die Schnitte ebenfalls von Paraffin gereinigt, dehydriert und für 30 Minuten mit einer Kaliumhexacyanoferrat 2% und HCL 2%-Lösung (Verhältnis 1:1) (Merck, Darmstadt, Germany) inkubiert und mit einer Kernechtrot Färbung gefärbt. Zwei Ratten (Ratte 3 und 7) wurden transkardial perfundiert, die Muskeln entnommen, in flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan für zwei Minuten kryokonserviert und anschließend 10 µm dicke Gefrierschnitte mit einem Jung Kryostaten (Leica, Bensheim, Deutschland) für immunhistochemische Untersuchungen angefertigt. Eine Eisenfärbung wurden nach dem oben genannten Protokoll durchgeführt. Die Schnitte der mit dem Hoechst 33342 Farbstoff markierten Zellen, wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB Mikroskop, Leica, Deutschland) mit den Wellenlängen 365 und 420 nm für die Detektion der transplantierten Zellen verwendet. Schnitte, die eisenpositive Zellen enthielten wurden mit dem Makrophagen spezifischen Antikörper ED-1 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gefärbt.

### **2.3.2 Vergleich der MRT-Aufnahmen mit den histologischen Daten**

Von den eisenmarkierten histologischen Schnitten wurden mittels eines Leica DMRB Lichtmikroskopes (Leica, Deutschland) Bilder in 10 facher Vergrößerung angefertigt. Diese Bilder wurden mit den MRT-Aufnahmen der Muskeln durch das Programm Axio Vision (Version 4.4, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) abgeglichen.

### 2.3.3 Statistische Auswertung

Bei den intraindividuellen Ergebnisvergleichen wurde der Wilcoxon Test für abhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben verwendet. Für den Vergleich der Kontrollgruppe mit den nativ und eisenmarkierten transplantierten Gruppen kam der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben zum Einsatz. Die deskriptive Statistik für absolute und relative Häufigkeiten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Bewertung der Untersuchungsergebnisse wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  angegeben. Ein Testergebnis wurde bei  $p < 0,05$  als signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In vitro

##### 3.1.1 Vitalitätsbestimmung

Die Beladungskonzentration der Eisenpartikel wurde von 0,375 bis 6 mM variiert. Unabhängig von der gewählten Beladungskonzentration waren nach der Inkubation noch über 95% der Zellen vital. (Abb. 5)

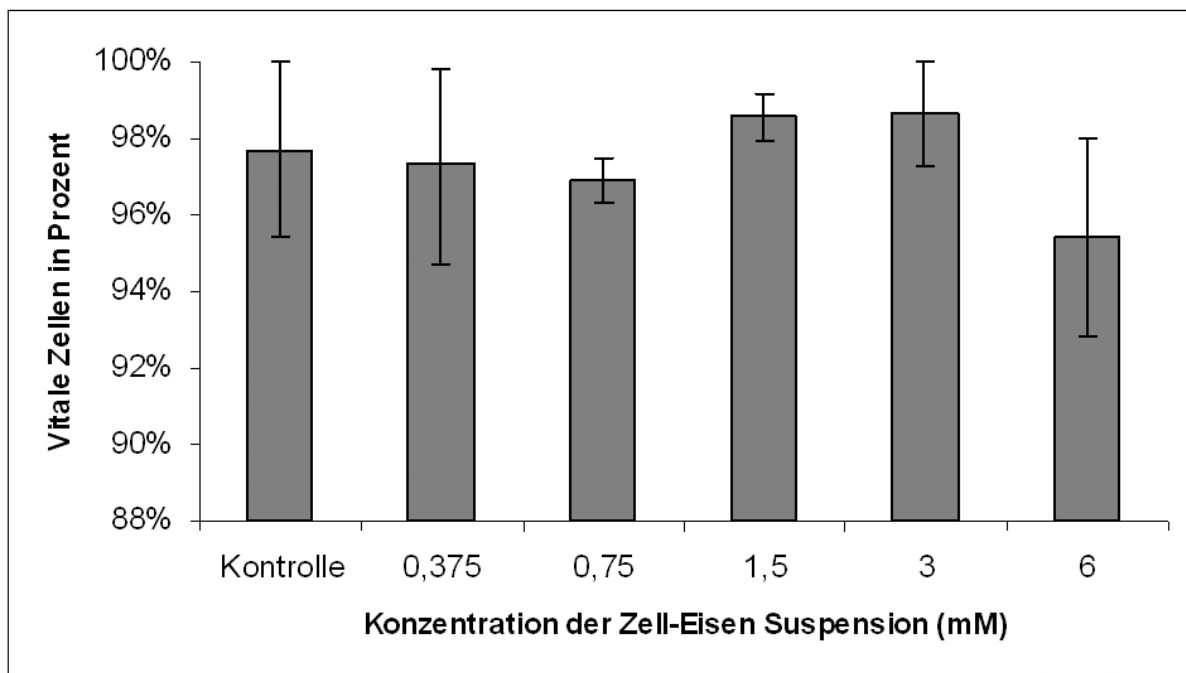


Abbildung 5: Darstellung der vitalen MSC in Prozent in Abhängigkeit von der VSOP – Beladungskonzentration.

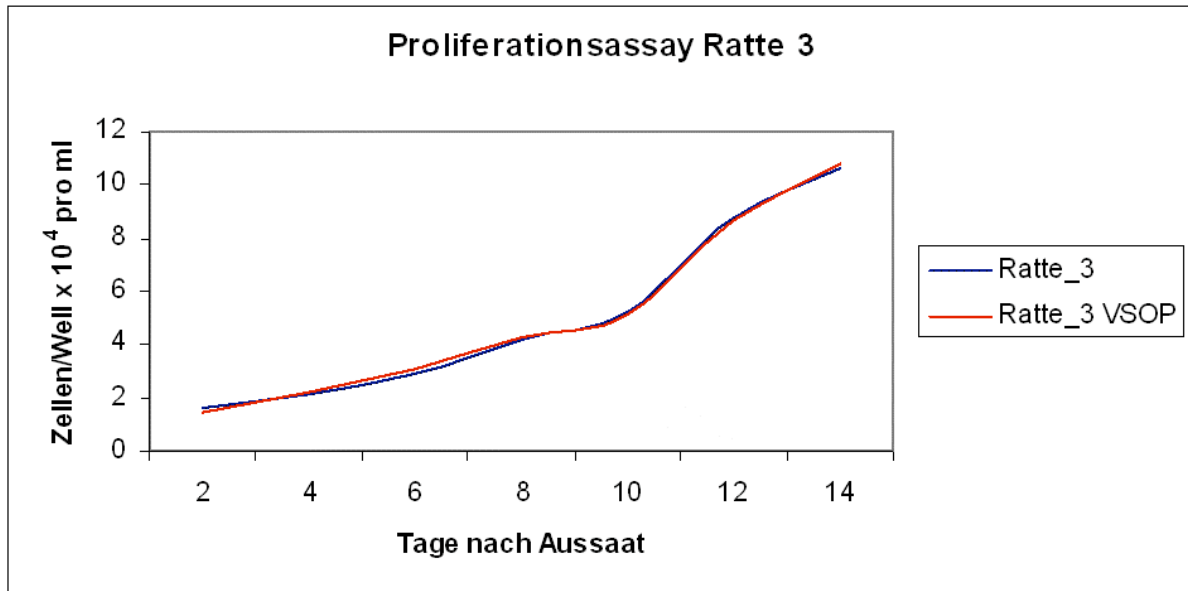
##### 3.1.2 Proliferationsassay

Um die Entwicklung der Zellen nach der Vitalitätsbestimmung über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Drei Wochen nach der Biopsie wurden die Zellen von sechs Ratten mit einer VSOP-Konzentration von 1,5 mM nach dem bereits beschriebenen Protokoll inkubiert

Wie die Abbildungen 6 a und b zeigen, wiesen die Wachstumskurven der markierten und unmarkierten Zellen der Ratten 3 und 4 im Verlauf von 14 Tagen nahezu keinen Unterschied auf. Nach Anlage einer Ausgleichskurve ließ sich die Wachstumskurve der nicht inkubierten Zel-

len der Ratte 3 durch die Gleichung  $y = 0,24x^2 - 0,37x + 1,83$  (Bestimmtheitsmaß:  $R^2 = 0,99$ ) und die Kurve der mit Eisen beladenen durch  $y = 0,23x^2 - 0,32x + 1,76$  (Bestimmtheitsmaß:  $R^2 = 0,99$ ) beschreiben. Fast identisch verhielten sich auch die Wachstumskurven der anderen Ratten.

a)



b)

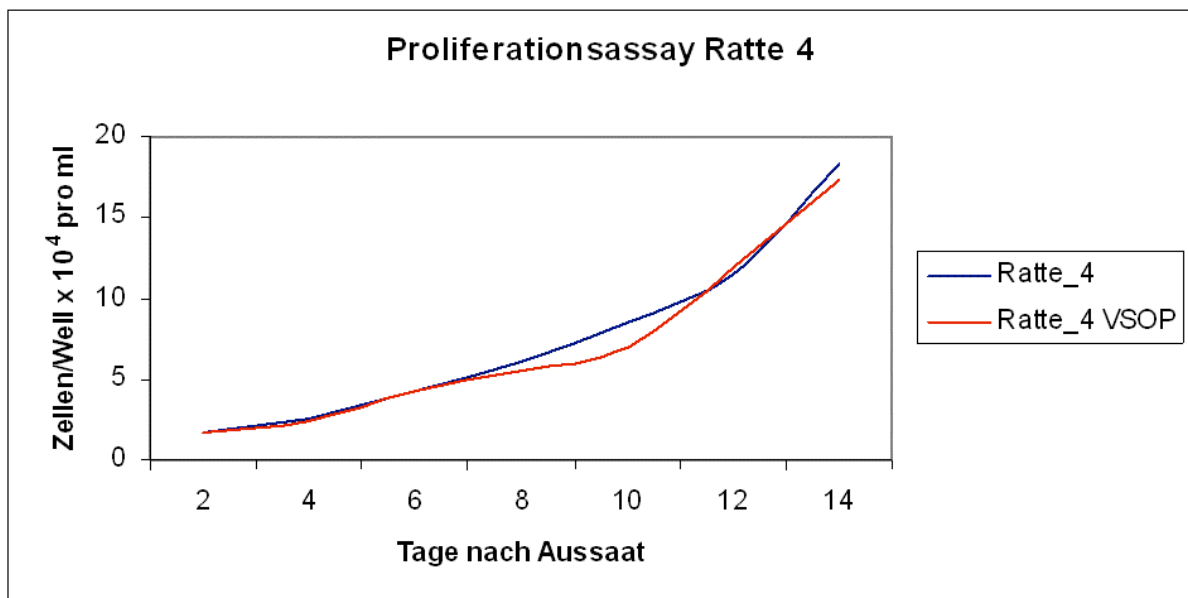


Abbildung 6: Wachstumskurven von markierten (rot) und unmarkierten (blau) Zellen der Ratte 3 (a) und 4 (b) im Zeitverlauf über 14 Tagen.

### 3.1.3 Relaxometrie

Um den Erfolg der magnetischen Markierung zu erfassen, wurde die transversale Relaxationszeit (T2-Zeit) gemessen. Aus der Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Wasserstoffatome des Mediums knapp 1600 ms benötigten um nach dem Radiowellenimpuls wieder in ihren Ausgangszustand zurück zu kehren. Eine Beladung der Zellen mit 1,5 mM führt zu einer Relaxationszeit von knapp 564 ms was, verglichen mit  $1 \times 10^6$  unmarkierten Kontrollzellen, einer Reduktion der Relaxationszeit um 62% entspricht.

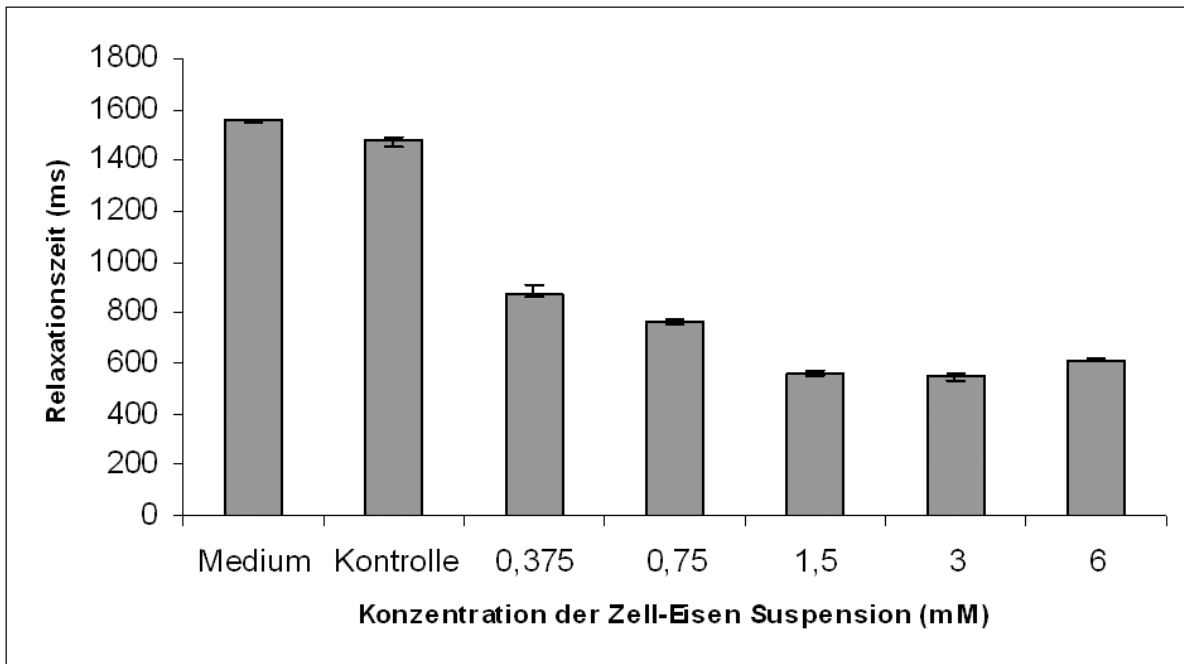


Abbildung 7: Abhängigkeit der Relaxationszeit ( $y$ -Achse) der Zellen von der Beladungskonzentration der VSOP ( $x$ -Achse).

### 3.1.4 Eisengehaltmessung

Die Eisengehaltmessung gibt Aufschluss darüber, wie viele Eisenpartikel tatsächlich während der Inkubation von den Stammzellen inkorporiert worden sind. Da die präparierten Zellen der relaxometrischen Untersuchungen für die Eisengehaltmessung verwendet wurden, konnte die Menge an aufgenommenen Eisen abermals für die fünf bereits verwendeten Beladungskonzentrationen von 0,375 bis 6 mM ermittelt werden. Die Eisengehaltmessung wurde mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) durchgeführt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen standardisiert.



Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, war die Aufnahme der Eisenpartikel in die Zellen konzentrationsabhängig.

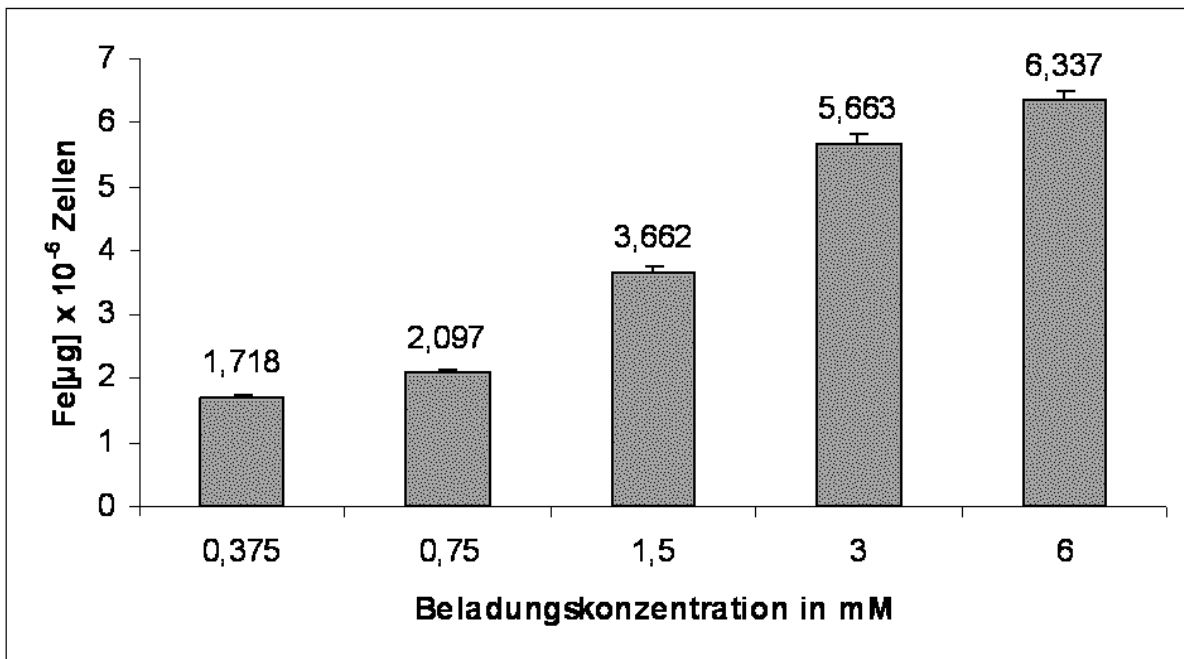


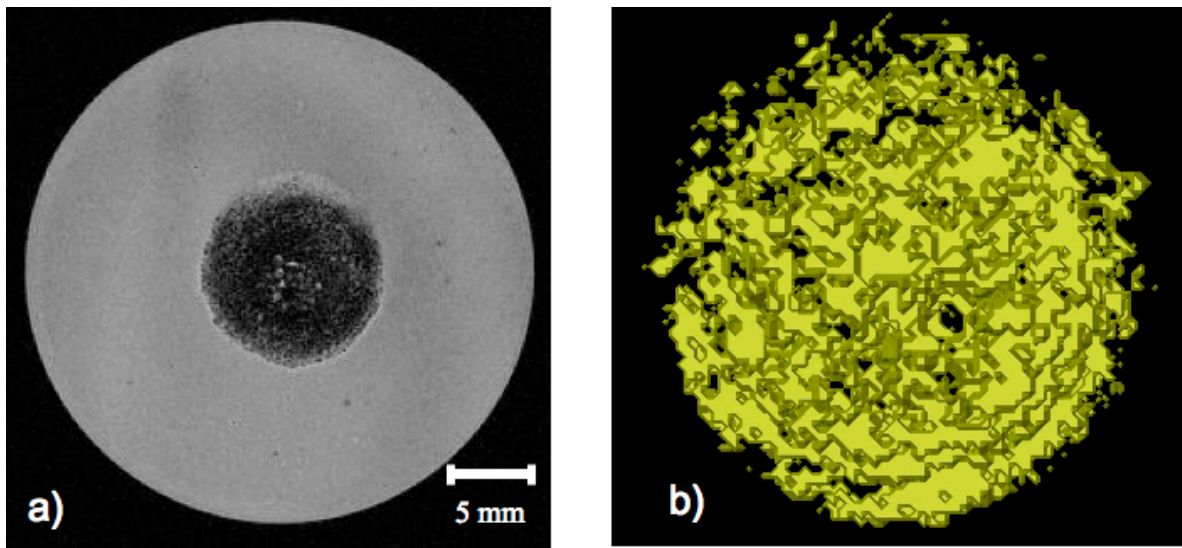
Abbildung 8: Darstellung der von den Stammzellen inkorporierten Eisenpartikel in  $\mu\text{g}$  (y-Achse) bei ansteigenden Beladungskonzentrationen (x-Achse). Eine höhere Beladungskonzentration führte zu einer erhöhten Eisenpartikelaufnahme in die Zellen.

Nach einer 90 minütigen Inkubation der Zellen mit den VSOP bei 0,375 mM enthielten  $1 \times 10^6$  Zellen  $1,7 \mu\text{g}$  Eisen. Der deutlichste Eisengehaltanstieg konnte nach der Steigerung der Partikelkonzentration von 0,75 mM auf 1,5 mM gemessen werden. Die anschließende histologische Aufarbeitung der markierten MSC durch einer Berliner Blau Färbung zeigte eine homogene Verteilung der Partikel in den Zellen.

### 3.1.5 In vitro Visualisierung

Um die Durchführbarkeit der VSOP Markierung und Darstellung der beladenen Zellen zu erproben, wurden Aufnahmen von einem mit Agarose ausgefüllten 50 ml Falcon-Tube angefertigt (Gelphantom).

Das Agarose Gel stellte sich im gesamten Tube homogen dar. Die markierten Zellen führten zu deutlichen Signalverlusten, die sich schwarz darstellten und konnten somit gegenüber dem Gel abgegrenzt werden (Abb.: 9 a).



*Abbildung 9: Axiale Flash2D-Aufnahme (a) eines mit Agarose Gel gefüllten 50 ml Falcon Tubes in das  $1 \times 10^6$  VSOP markierte MSC gebettet worden waren und (b) die 2,5x vergrößerte, dreidimensionale Rekonstruktion des Zellpools (VSOP- Beladungskonzentration 1,5 mM). Das kreisrunde, schwarze Areal in der Mitte des Bildes links stellt die markierten Zellen dar. Die beladenen Zellen sind durch ihren Signalverlust klar gegenüber dem umgebenden Agarose Gel (hell) abzugrenzen.*

Je dunkler sich ein Areal im MRT-Bild darstellt, desto niedriger ist sein Grauwert (Voxelvalue). Die Grauwertbestimmung des hellen Agarose Gels durch das Programm ImageJ ergab einen Grauwert von über 20000 während das Voxelvalue der markierten Zellen einen Wert von maximal  $9317 \pm 457$  aufwies. Dadurch waren für die Rekonstruktion des Zellpools Grenzen definiert: Alle Grauwerte von 0 (tiefschwarz) bis 9000 (dunkelgrau) wurden als Areale definiert, die markierte Zellen enthielten. Die Rekonstruktion der VSOP markierten Zellen des Gelphantoms zeigt Abbildung 9 b.

### 3.1.6 Grauwertbestimmung

Die Pixel der traumatisierten Muskulatur waren deutlich heller als die Pixel des Zellpools und nahmen Grauwerteinheiten zwischen 11593 und 22903 an. Die eisenmarkierten Zellen erzeugten auf den MRT-Bildern Areale aus dunklen Pixeln, die einen Grauwert zwischen 249 und 8075 aufwiesen. Die Betrachtung der minimalen Grauwerte der traumatisierten Muskulatur und des maximalen Grauwertes der hypointensen Zellareale lieferte eine Differenz von stets über 30%. So war eine Unterscheidung zwischen Zellareal und Muskel problemlos möglich (Tab. 6).

Ratte	Zell Pool		Muskel vor Transplantation	
	GW Min	GW Max	GW Min	GW Max
1	945	8075	11593	22903
2	249	6459	12161	22373
3	277	6274	12199	20117
4	365	6185	14867	23322
6	376	7910	11892	18620
7	331	7033	12757	22585

*Tabelle 6: Die Grauwerte (GW) der einzelnen Pixel der MRT Scans reichten von 0 (maximale Hypointensität bzw. schwarz) bis 32000 (maximale Hyperintensität bzw. weiß). Die maximalen Grauwerte des Zellpools wurden mit den minimalen Grauwerte der traumatisierten Muskulatur vor der Transplantation verglichen. Die Differenz zwischen dem maximalen Zellpoolgrauwertes und dem minimalen Grauwert der traumatisierten Muskulatur betrug in allen Tieren stets mindestens 30%, was eine sichere Unterscheidung zwischen Zellpool und umgebener Muskulatur ermöglichte. GW: Grauwert; Min: minimal; Max: maximal*

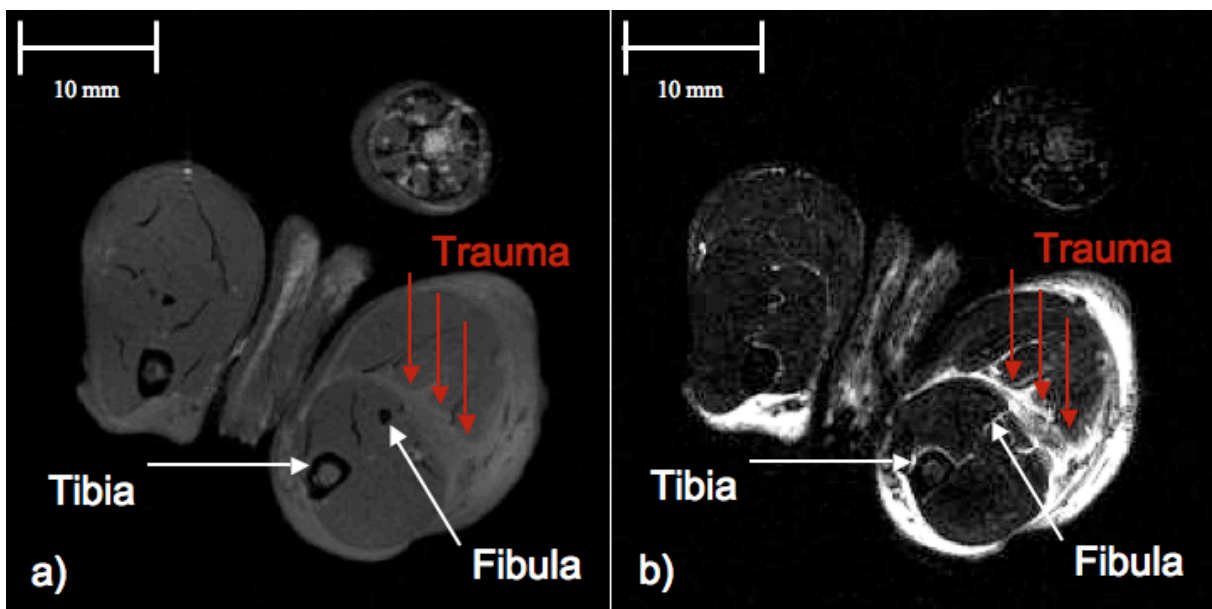
## 3.2 In vivo

### 3.2.1 Deskriptive Auswertung der MRT Daten

Die ersten Bilder traumatisierter Muskeln wurden eine Woche nach der Traumaapplikation bzw. einen Tag vor der Transplantation aufgenommen. Die anatomischen Strukturen des Unterschenkels der Ratten ließen sich in den T1 gewichteten Aufnahmen gut voneinander abgrenzen. Zur ersten Orientierung wurden zunächst die Tibia und die Fibula aufgesucht. In den Scans am Tag vor der Transplantation stellte sich der traumatisierte Muskel im Vergleich zum

kontralateralen gesunden M. soleus und gegenüber dem umgebenden Gewebe hyperintens dar. Der zerstörte Muskel war durch die posttraumatische Ödembildung leicht vergrößert und konnte klar vom benachbarten M. gastrocnemius und dem M. peroneus differenziert werden (Abb. 10a).

Am besten ließ sich das Trauma durch den erhöhten Wassergehalt des Ödems in den T2 gewichteten Bildern verfolgen (Abb. 10b). Auf den T2 Bildern stellten sich die nicht traumatisierten Weichteile homogen dar und zeigten keine Schwankungen in der Signalintensität. Der Grauwert der hypointensen, nicht traumatisierten Muskeln betrug in den T2 Bildern  $1506 \pm 1414$  Einheiten während sich die zerstörten Areale mit einem Wert von über 10000 Einheiten deutlich hyperintens darstellten. Eine Ödembildung konnte ebenfalls im Bereich der Naht und des subkutanen Fettgewebes beobachtet werden.



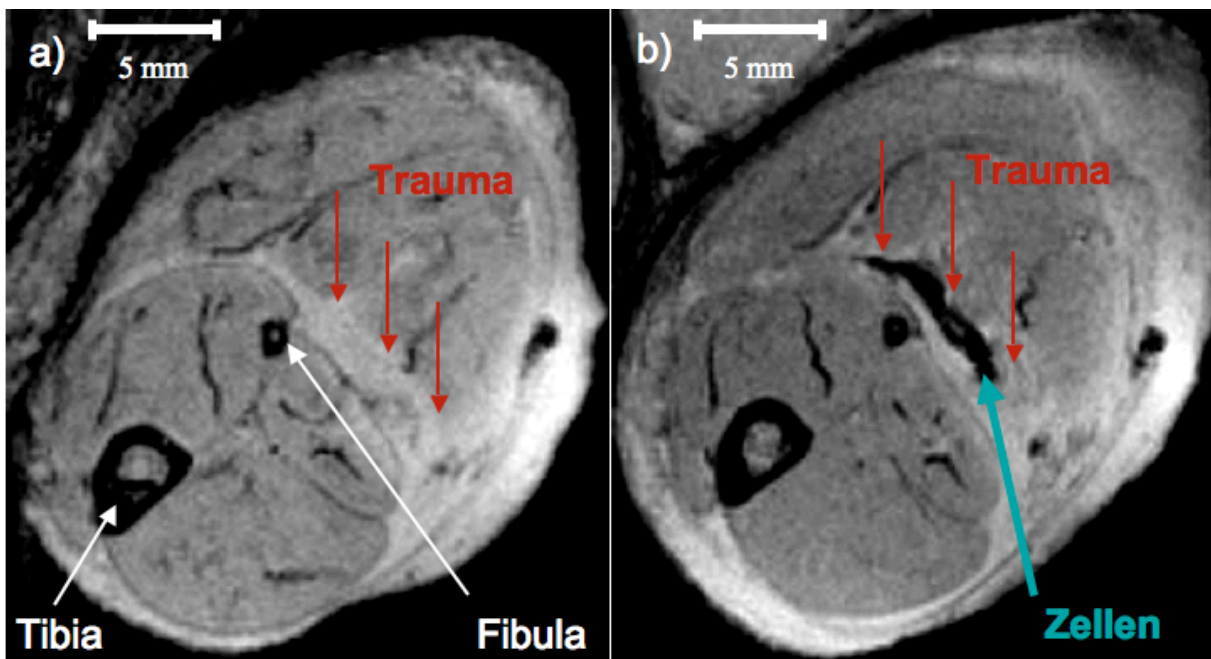
*Abbildung 10: Die axialen Bilder zeigen eine T1 gewichtete Aufnahme (a) und eine T2 gewichtete (b) auf identischer Schnitthöhe vor der Transplantation. Jeweils links im Bild ist der rechte Unterschenkel der Ratte 7 zu sehen, weiß beschriftet sind Tibia und Fibula zu erkennen. Der traumatisierte M. soleus hebt sich durch seine Hyperintensität vom umgebenden Gewebe ab. Am deutlichsten wird dies im T2 gewichteten Bild rechts.*

Auch in der partikelspezifischen Flash2D-Sequenz waren die Strukturen des Unterschenkel gut zu differenzieren. Eine hyperintense Demarkierung des M. soleus war bis zu 6 Wochen nach dem Trauma zu erkennen.

Die Transplantation von drei Millionen mit 3 mM inkubierten Zellen in den M. soleus der Ratte Pilot 1 konnte durch den Signalverlust, der das Zellareal dunkel (hypointens) erscheinen

ließ, in allen akquirierten Sequenzen identifiziert werden. In den Schnittbildern der unterschiedlichen Sequenzen konnte ein zentral im M. soleus gelegenes, hypointenses Zellareal beschrieben werden. Die kranio-kaudale Ausdehnung des Zellpools betrug einen Tag nach der Transplantation 6,1 mm und die maximale Breite maß 5,2 mm. Am letzten Tag der MRT Untersuchungen hatte sich der Zellpool auf 4,2 mm in der Breite reduziert und in der Länge um 0,2 mm auf 6,3 mm vergrößert.

In den folgenden MRT-Untersuchungen wurde die Beladungskonzentration der Eisenpartikel von 3 mM auf 1,5 mM reduziert. Die hypointensen Areale im M. soleus der Tiere 1-4,6 und 7 waren auf Höhe der distalen Fibula lokalisiert und konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 3 (Ratte 1-4,7) bzw. 6 Wochen (Ratte 6) verfolgt werden. Die transplantierten Zellen demarkierten sich durch die Hypointensität stark von dem umgebenden Gewebe und konnten somit ohne Schwierigkeiten identifiziert werden. Eine Fehlinterpretation von Hypointensitäten, die durch bindegewebige Strukturen wie Muskelfaszien oder Narbengewebe verursacht wurden, konnten mittels vor der Transplantation angefertigter MRT Scans ausgeschlossen werden (Abb. 11a, b).



*Abbildung 11: Die vergrößerten Ausschnitte der axialen Flash2D-Aufnahmen zeigen den linken Unterschenkel der Ratte 6 vor (a) und 24 Stunden (b) nach der Transplantation von VSOP markierten MSC. In dem traumatisierten und daher hyperintens erscheinenden M. soleus kann nach der Transplantation ein hypointenses Areal identifiziert werden, welches durch die VSOP markierten Zellen verursacht wird.*

Eine Distanzbestimmung des Zellareals (Amira, Flash2D Sequenz) der Ratte 6 ergab am ersten Tag nach der Transplantation in der kranio-kaudalen Ausdehnung einen Wert von 9,5 mm und in der medio-lateral eine Länge von 6,6 mm. Nach einer Woche breitete sich das Zellgebiet kranio-kaudal über 7,5 mm aus und blieb in der medio-lateralen Ausprägung nahezu konstant bei 6,7 mm. Nach angrenzend gleich bleibenden Längenverhältnissen zeigte sich erst am 42. postoperativen Tag eine kranio-kaudale Längenabnahme von 1,1 mm und eine medio-laterale Zunahme um 1,2 mm. Die Auswertung der anderen untersuchten Tiere ergab ähnliche Werte, wobei sich die kranio-kaudale Distanz der Zellareale im Durchschnitt um 37,5% verringerte. Die medio-laterale Ausdehnung blieb auch den restlichen Tieren nahezu konstant. Die Zellpools der Tiere der MRT Gruppe II ( $5 \times 10^6$ , 1,5 mM) wiesen in der Distanzbestimmung keinen größeren Zellpool als die Tiere der MRT Gruppe I ( $2,5 \times 10^6$ , 1,5 mM) auf. Die Darstellung der Zellareale war über einen Zeitraum von 42 Tagen problemlos möglich. Die Abbildung 12 zeigt Ausschnitte von Flash2D Aufnahmen im Zeitverlauf von 6 Wochen.

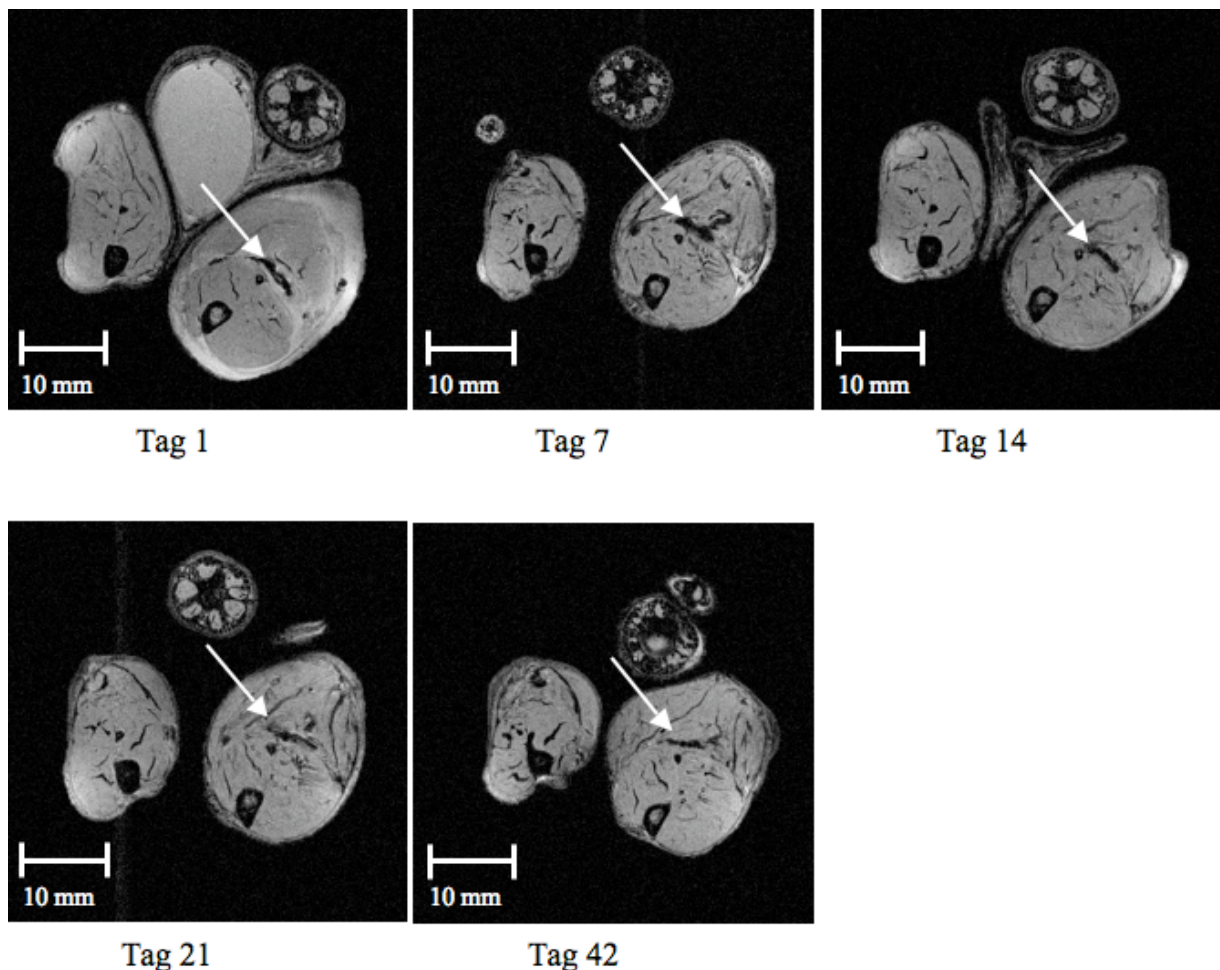


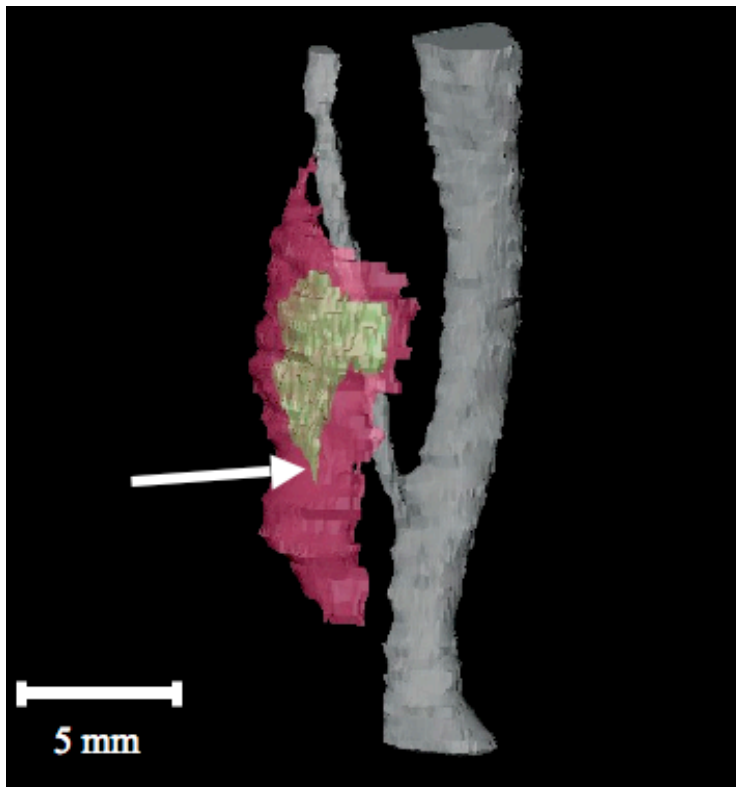
Abbildung 12: Flash2D Aufnahmen des linken M. soleus (Ratte 6). Zu allen Messzeitpunkten lassen sich die Zellen (Pfeil) gut im Muskel identifizieren.

Die MRT Daten der Ratte 5 zeigten einen fehltransplantierten Zellpool im Bereich des Peronealmuskels. Ein paar einzelne hypointense Areale konnten auch hier im M. soleus nachgewiesen werden, jedoch ist diese Tatsache wohl auf den während der Transplantation entstandenen Stichkanal zurückzuführen. Vom proximalen Ursprung am Tibiaplateau bis zum distalen Ende des Muskelbauches des langen Peronealmuskels auf Höhe der Fibulainsertion in die Tibia konnte der durch die Nanopartikel verursachte Signalverlust nachgewiesen werden.

Den Kontrolltieren der MRT Gruppe III wurde das gleiche Volumen Kochsalzlösung (20  $\mu$ l) jedoch ohne Zellen injiziert. Die anatomischen Strukturen waren in allen Bildern gut zu erkennen. Auf den verwendeten MRT Sequenzen war nach der Transplantation eine Flüssigkeitsansammlung in Form einer hyperintensiven Signalveränderung innerhalb des M. soleus zu registrieren, die auf die injizierte Kochsalzlösung zurückzuführen war. Eine hypointense Veränderung innerhalb des Muskels konnte nicht beobachtet werden.

### 3.2.2 Volumen-, Oberflächen- und Schwerpunktberechnung

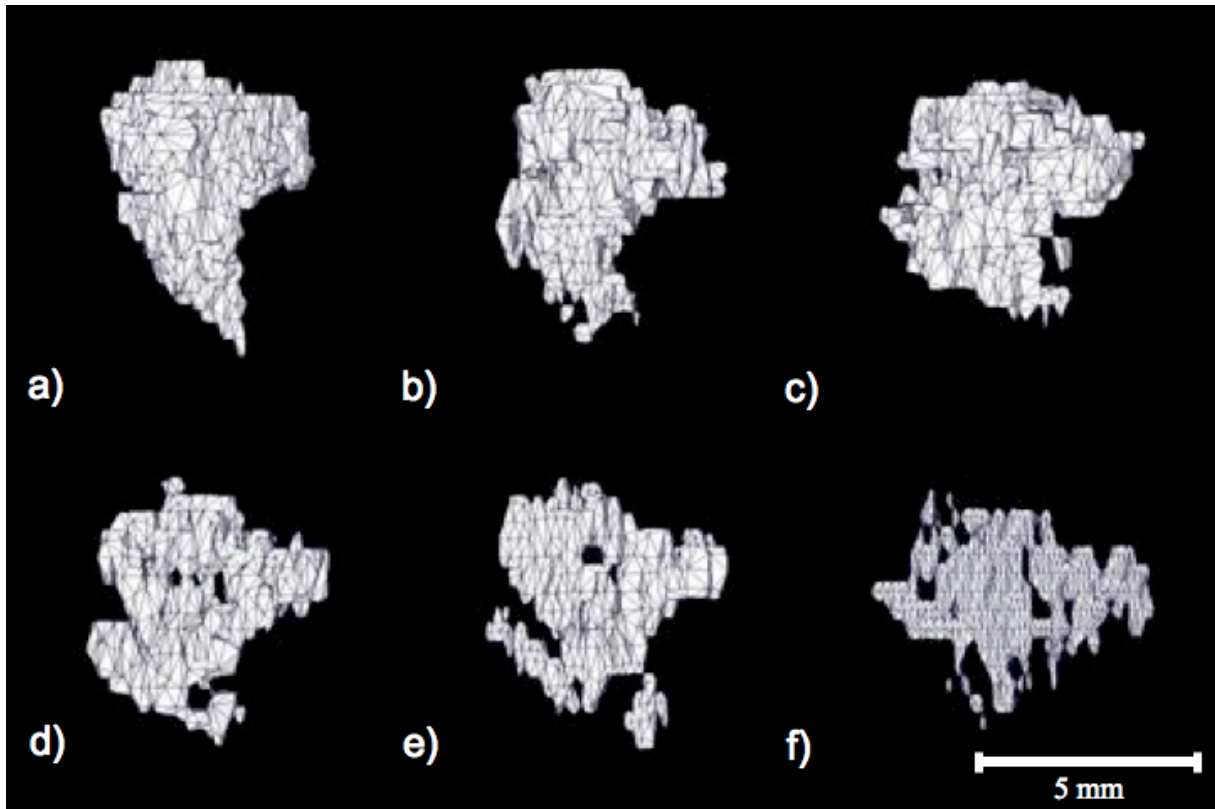
Nachdem die markierten Zellen schon in den nativen MRT Bildern sehr gut zu verfolgen waren, konnten nach der dreidimensionalen Rekonstruktion der Zellfelder Berechnungen zum Volumen, Oberfläche und Schwerpunkt im Zeitverlauf durchgeführt werden. Die Rekonstruktion von Tibia und Fibula ermöglichte eine gute räumliche Vorstellung der anatomischen Gegebenheiten im Unterschenkel der Ratte (Abb. 13).



*Abbildung 13: 3D – Modell der Flash2D Sequenzen der Tibia und Fibula (weiß) sowie des M. soleus (rot) und den darin befindlichen partikelmarkierten MSC (grün) der Ratte 6 einen Tag nach der Transplantation. Im distalen Bereich des Zellpools ist noch der dünn auslaufende Stichkanal zu erkennen (Pfeil).*



Das erste 3D-Modell des Zellareals der Ratte 6 nach der Transplantation wies eine etwa trianguläre Form auf (Abb. 14). Neben einer eher flächigen Ausrichtung des Zellpools im Verlauf des M. soleus am 14. Tag nach der Transplantation (Abb. 14c) fiel eine deutlich sichtbare Volumenreduktion am 21. postoperativen Tag (Abb. 14d) auf. Die fortschreitende Volumenreduktion konnte an den folgenden Messzeitpunkten beobachtet werden (Abb. 14 e und f).



*Abbildung 14: Darstellung der dreidimensional rekonstruierten Zellpools der Ratte 6 in der Ansicht von dorsal vom ersten Tag nach der Transplantation (a) bis zum letzten Tag des 42-tägigen Untersuchungszeitraumes (f).*

Es konnte keine Korrelation zwischen der transplantierten Zellzahl, der Oberflächen und dem Volumen festgestellt werden (Tab. 7).

Ratte	MSC ( $\times 10^6$ )	Volumen in $\text{mm}^3$			Oberfläche in $\text{mm}^2$		
		Tage nach Transplantation			Tage nach Transplantation		
		1	7	21	1	7	21
1	2,5	5,31	4,68	3,86	32,21	31,79	27,03
2	2,5	1,59	1,59	1,45	12,55	14,01	12,82
3	2,5	1,56	1,18	0,70	56,26	52,43	37,30
4	5	13,90	4,80	2,00	55,70	32,32	16,99
6	5	24,82	18,05	13,98	102,04	80,96	86,95
7	5	3,48	2,61	1,50	19,84	15,67	12,56

Tabelle 7: Darstellung der transplantierten Zellzahl (MSC), des Volumen und der Oberfläche der untersuchten Ratten.

Das Volumen des Zellpools der Ratte 6 zeigt (Abb. 15).

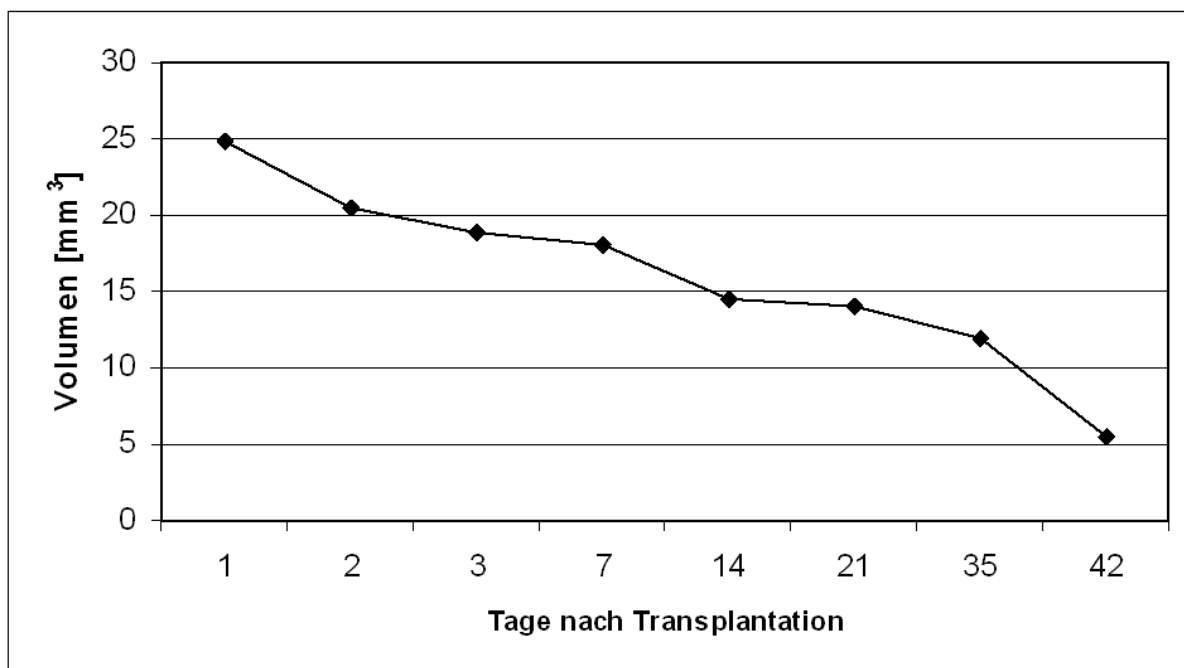


Abbildung 15: Das Diagramm stellt exemplarisch das Volumen des dreidimensional rekonstruierten Zellpools der Ratte 6 während des Untersuchungszeitraums dar. Nach 6 Wochen waren noch ca. 20% des ursprünglichen Zellpoolvolumens am Transplantationsort im MRT sichtbar.

Die Oberfläche des Zellpools der Ratte 6 hatte nach der Transplantation ein Ausmaß von knapp  $102 \text{ mm}^2$ . In den ersten drei Tagen kam es zu einer Reduktion der Oberfläche auf  $80,96 \text{ mm}^2$ . In der letzten Woche sank die Oberfläche auf  $55 \text{ mm}^2$  (Abb. 16).

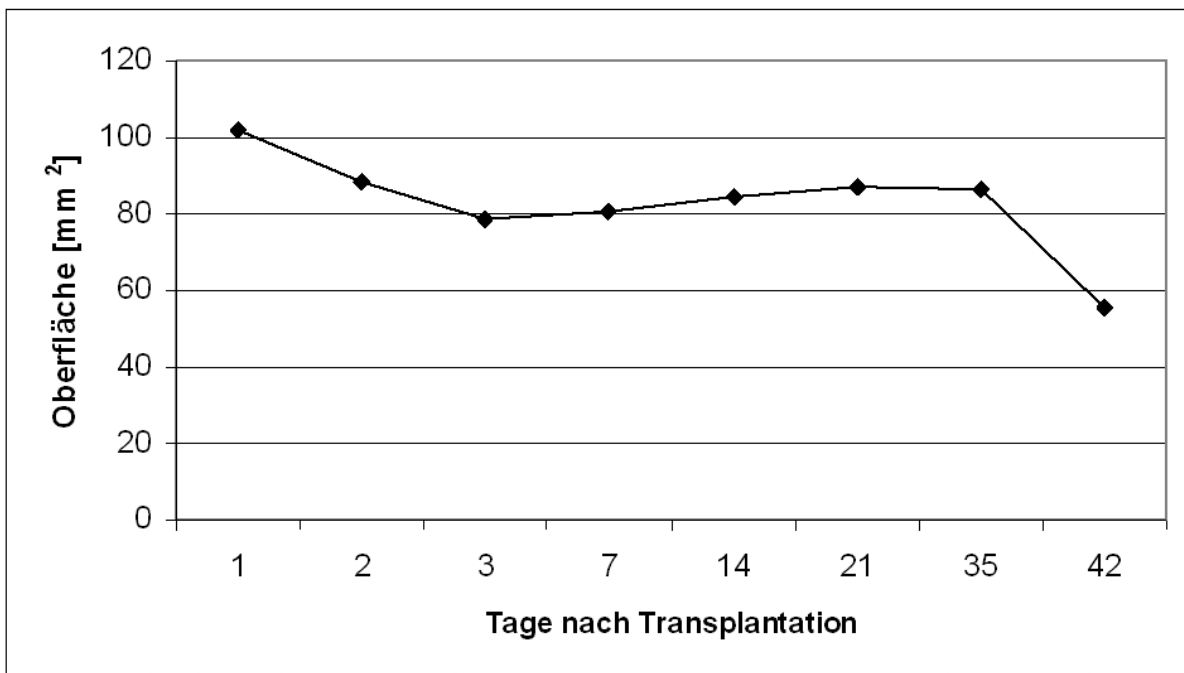
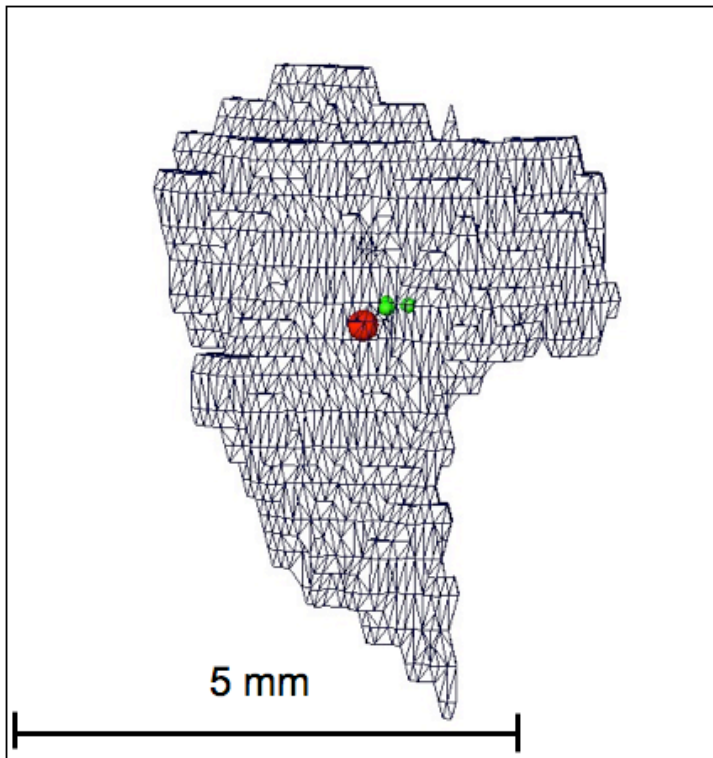


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der Oberfläche des Zellpools der Ratte 6 in einem Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Am Ende der Messperiode betrug die Oberfläche des Modells noch 55% des Ausgangswertes.

Mit den Schwerpunktsberechnungen sollte eine eventuell vorhandene Migration des Zellpools im M. soleus visualisiert werden. Die Koordinaten der Schwerpunkte der einzelnen Untersuchungszeitpunkte wurden für die Berechnung des Schwerpunktes in das Koordinatensystem des ersten postoperativen Zellpools transformiert. Die Abbildung 17 zeigt den rekonstruierten Zellpool der Ratte 6 einen Tag nach der Transplantation. Während der rote Punkt den Schwerpunkt des Zellpools des ersten postoperativen Tages darstellt, sind in grün die Schwerpunkte nach 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tagen zu sehen. Die Schwerpunkte der rekonstruierten Zellpools änderten ihre Lage während des Beobachtungszeitraums nur minimal. Die Auswertung der übrigen untersuchten Ratten lieferten die gleichen Ergebnisse.



*Abbildung 17: 3D – Modell des Zellpools der Ratte 6 mit der Visualisierung des Schwerpunktes einen Tag nach der Transplantation (rot) und der folgenden Messzeitpunkte (grün) im Verlauf von 6 Wochen.*

### 3.3 Ex vivo

#### 3.3.1 Histologische Ergebnisse und deren Vergleich mit den MRT Daten

Der Vergleich der MRT-Daten mit den Berliner Blau gefärbten Schnitten wies eine gute topographische Korrelation der Zellpools auf (Abb. 18). Durch die MRT Scans konnte die intramuskuläre Lage der Zellen identifiziert und so die histologischen Schnitte gezielt so aufgearbeitet werden, dass die Proben sicher eisenmarkierte Zellen enthielten.

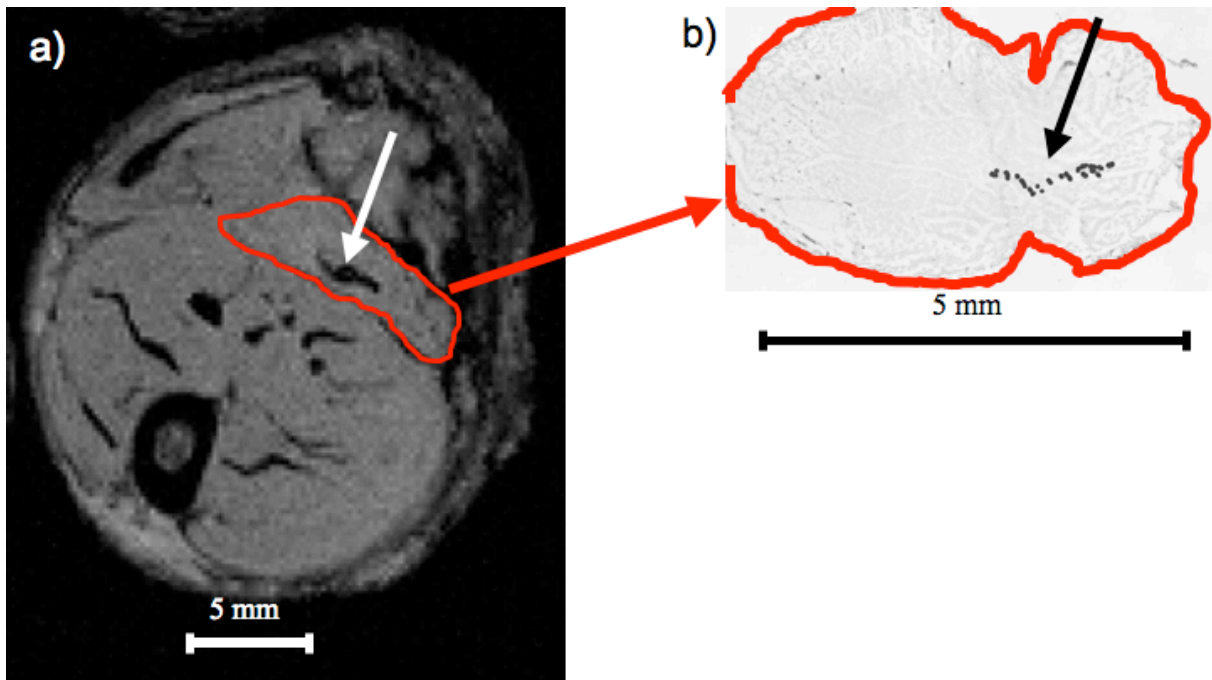
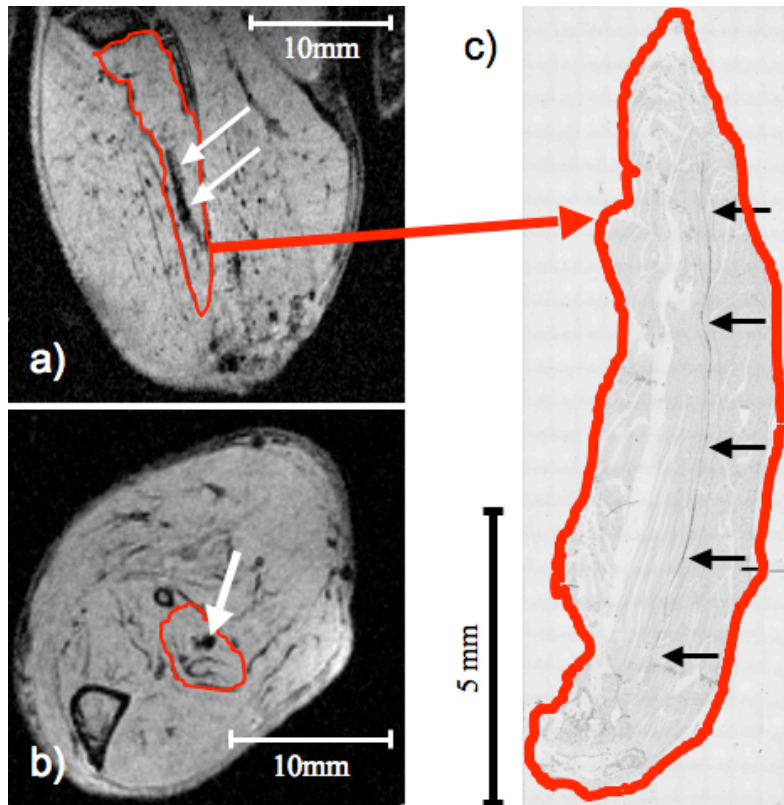


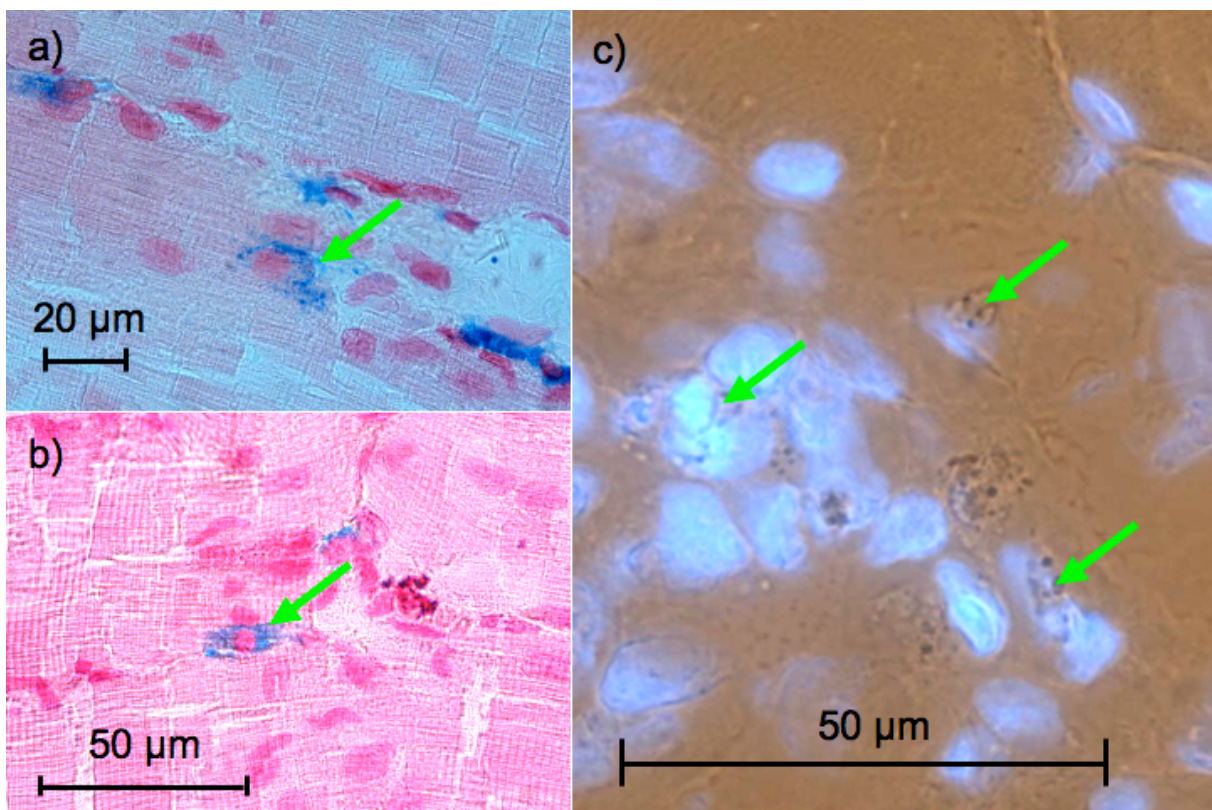
Abbildung 18: Bild (a): Die durch die VSOP markierten Zellen verursachte Hypointensität (weißer Pfeil) innerhalb des M. soleus (rot), findet in dem Berliner Blau gefärbten Kryoschnitt (b) das entsprechende Korrelat (schwarzer Pfeil).

Auch mit der Auswertung der Ratte 5 konnte eine Korrelation der in vivo und den histologischen ex vivo Daten nachgewiesen werden. Die eisenmarkierten Zellen konnten in den longitudinalen Paraffin-Schnitten und den MRT-Scans an topografisch gleicher Stelle identifiziert werden (Abb.: 19).



*Abbildung 19: Die sagittal geschnittenen histologischen Proben (c) zeigten eine Verteilung der eisenmarkierten und Berliner Blau gefärbten Zellen im Verlauf des M. peroneus (rot), die sowohl in den sagittalen (a) als auch in den axialen Flash2D Aufnahmen (b) identifiziert werden konnten.*

In den Tieren, deren Zellen eine Doppelmarkierung mit den C-200 Partikeln und dem Hoechst 33342 Kernfarbstoff erhalten hatten, konnten die eisen- und fluoreszenzmarkierten Zellen sowohl im Interstitium als auch innerhalb der Muskelfasern nachgewiesen werden. Hierbei konnten die Zellen als zentrale Nuklei in regenerierenden und direkt unter des Sarkolemmms bei reifen Muskelfasern registriert werden. Weiter wurden Fusionsereignisse zwischen eisenmarkierten Zellen und vorhandenen Muskelfasern beobachtet (Abb. 20a, b). Diese Ereignisse zeigten sich bei subsarcolemmal liegenden Zellkernen, die von Eisenpartikeln umgeben waren und sich somit im Begriff der Fusion mit der Muskelfaser befanden. Die erfolgreiche Doppelmarkierung der MSC mit VSOP und dem Fluoreszenzfarbstoff in vitro zeigt Abbildung 20c.



*Abbildung 20: Auf den HE-Schnitten (a) und (b) konnten Fusionsereignisse zwischen vorhandenen Muskelfasern und den mit Eisenpartikel markierten Zellen identifiziert werden. Nach einer Berliner Blau Färbung stellten sich die VSOP blau dar. Das Bild rechts (c) zeigt die Doppelmarkierung der Zellen mit VSOP und dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342. Neben den leuchtenden Zellkernen zeigten sich die dunklen Eisenpartikel.*

### 3.3.2 Funktionelle Ergebnisse

Nach Abschluss der *in vitro* Versuche, die zum Ziel hatten, Wissen über den Einfluss der Eisenoxidpartikel auf die Vitalität und Proliferation der Zellen zu erlangen, wurde das Verhalten der VSOP markierten Zellen *in vivo* untersucht. Hierzu wurde eine Muskelkraftmessung drei Wochen nach der Transplantation der MSC durchgeführt.

Der Abbildung 21 sind die Werte der Kraftentwicklung der verletzten Muskeln normalisiert auf den gesunden rechten Kontrollmuskel im Fast Twitch- und Tetanie-Modus zu entnehmen. Die Kraft der traumatisierten und nur mit NaCl behandelten Kontrollmuskeln der Ratten erreichten im Fast Twitch Modus eine Wiederherstellung von  $34\% \pm 14,7$  der Normalkraft. Demgegenüber konnte die Kraft durch die Transplantation von einer Million unmarkierten MSC um 27,8% auf  $61,8\% \pm 22,4$  der Kraft des gesunden Kontrollmuskels gesteigert werden. Eine Transplantation von einer Million markierten MSC führte mit  $61,1 \pm 29\%$  zu einer fast identischen Muskelkraft. Die rechte Säule (VSOP 1) in der Abbildung 21a demonstriert die wiederhergestellte Muskelkraft bei Ratten, denen eine Million VSOP markierte Zellen transplantiert worden waren.



a)



b)

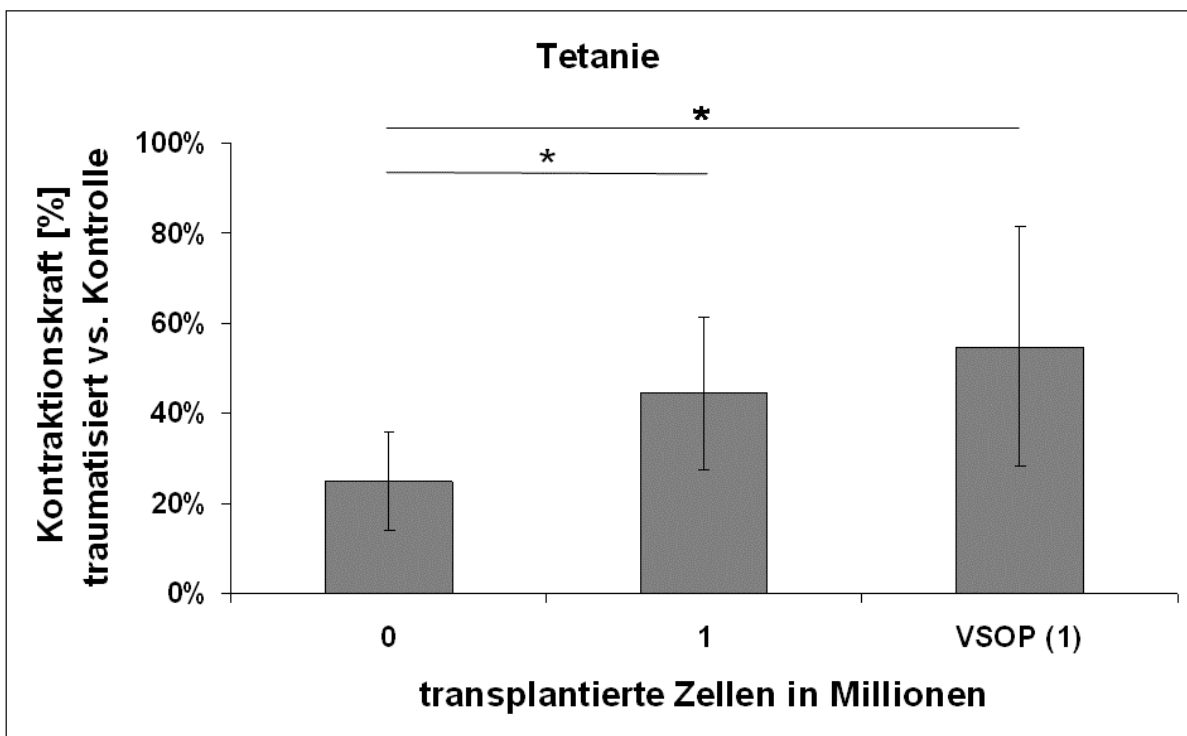


Abbildung 21: Maximale Kraftentwicklung des traumatisierten, linken *M. soleus* bei mehreren kurz aufeinander folgenden Kontraktionen (a) (Fast Twitch Modus) und lang anhaltender Kontraktion (b) (Tetanie), normiert jeweils auf die Kontraktionskraft des gesunden rechten *M. soleus*.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Daten der tetanischen Muskelkraftmessung (Abb. 21b). Die mit NaCl behandelten Muskeln entwickelten  $24,9\% \pm 10,9$  der ursprünglichen Kontraktionskraft. Durch die Transplantation von  $1 \times 10^6$  unmarkierten Zellen wurden  $44,5\% \pm 16,8$  der Kraft des gesunden Muskels wiederhergestellt. Die markierten Zellen führten zu einer Regeneration der Kraft von  $54,9\% \pm 26,8$ . Die Kontraktionskraft der Muskeln konnte somit sowohl durch die Transplantation von unmarkierten als auch markierten MSC gegenüber den unbehandelten Tieren um über 30% gesteigert werden.

## 4 Diskussion

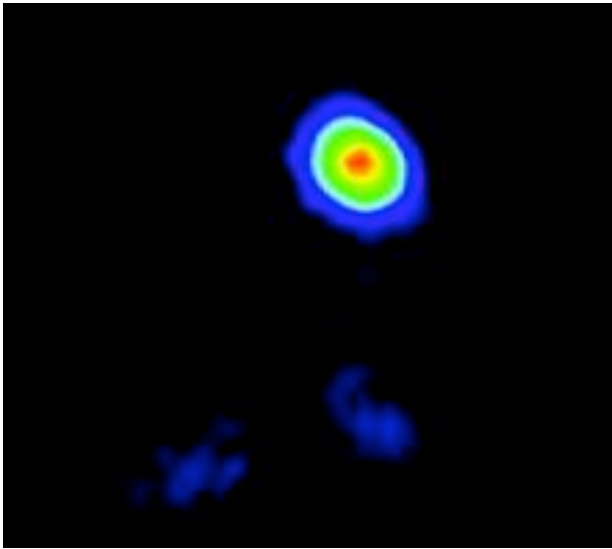
Mit der vorliegenden Arbeit konnten die zu Beginn genannten Ziele und Hypothesen bestätigt werden (siehe Kap. 1.10). So wurde die prinzipielle Möglichkeit einer Markierung mesenchymaler Stammzellen der Ratte und deren Detektion im MRT realisiert. Durch die in vitro Versuche konnte die ideale Beladungskonzentration bei 1,5 mM gefunden und die Zellen im Gelphantom dargestellt werden.

Die zweite Hypothese wurde durch Vitalitäts- und Proliferationsexperimente untersucht. Die Markierung der Zellen hatte keinen negativen Einfluss auf die evaluierten Parameter. Insbesondere konnte erstmals durch eine biomechanische Kraftmessung eine funktionelle Einschränkung der Zellen durch die Markierung in vivo ausgeschlossen werden.

Durch die Verlaufsbeobachtung der Ratten im MRT über bis zu sechs Wochen konnte die dritte Hypothese bestätigt werden. Auch nach 42 Tagen konnten die markierten Zellen innerhalb des traumatisierten Muskels identifiziert werden. Eine Migration innerhalb des Muskels konnte nicht beobachtet werden.

### 4.1 Zelluläre Bildgebungsverfahren

Die in vivo Visualisierung von Zellen ist seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Bisherige Versuche konzentrierten sich auf bildgebende Verfahren der Nuklearmedizin wie Szintigraphie, PET und SPECT. Ein Vorteil dieser Methoden stellt die hohe Sensitivität dar: Die radioaktiv markierten Zellen geben ein positives Signal ab und können so sehr einfach detektiert werden. Die Tatsache, dass bei diesen Verfahren radioaktive Substanzen verwendet werden birgt jedoch einen hohen Aufwand für die Markierung. Als ein weiterer negativer Punkt muss die schlechte örtliche Auflösung nuklearmedizinischer Verfahren genannt werden. Die Gruppe um Zhou hatte 2005 embryonale Kardiomyoblasten mit der radioaktiven Substanz Indium markiert um sie in vivo verfolgen zu können. Auf der Abbildung 22 ist ein axiales Schnittbild des Thorax nach einem Lungeninfarkt zu sehen. Die Aufnahme zeigt „Regionen der Lunge und des Thorax“ [76]. Diese Aussage des Autors weist auf die Ungenauigkeit des Verfahrens hin. Aufgrund der niedrigen Auflösung und des weit über die Größe der Zellen hinaus strahlenden Indiums, ist eine solche Methode für eine in vivo Visualisierung von Stammzellen und deren Identifikation im anatomischen Verbund nur bedingt einsetzbar.



*Abbildung 22: SPECT Aufnahme eines axialen Scans des Thorax einer Ratte nach der Transplantation von radioaktiv markierten MSC. Die Identifikation der farbig leuchtenden Zellen gelingt zwar schnell, doch kann keine exakte Ortsbestimmung durchgeführt werden. Bild entnommen aus [76]*

Diese Nachteile vermag die Magnetresonanztomographie zu kompensieren. Die Beladung der Zellen mit den hier verwendeten Eisenoxidpartikeln erfolgt durch eine einfache Inkubation der Zellen mit den VSOP. Für die Markierung werden keine besonderen Anforderungen an das Labor im Bezug auf Mitarbeiterschutz oder Abschirmung gegen radioaktive Strahlung gestellt. Mit dem hier verwendeten 7-Tesla Kleintier MRT kann die enorme Auflösung von  $30 \times 30 \mu\text{m}$  erzielt werden. Somit ist die MRT auch in diesem Punkt den bisherigen Verfahren deutlich überlegen. Die Zellen können darüber hinaus in Schnittbildern aller Ebenen im anatomischen Verbund genau analysiert werden. Für die Darstellung der Zellen wurde eine  $T_2^*$  gewichtete Sequenz verwendet (Flash2D-Sequenz). Diese spezielle Sequenz ermöglicht eine besonders gute Detektion der eisenbeladenen Zellen.

Ein Kritikpunkt der nicht invasiven Methode ist das negative Signal der magnetisch markierten Zellen auf den Schnittbildern. Neben lokalem, natürlich vorkommendem Gewebe wie Blutgefäßen und Bändern zeigen auch Muskelfasziën ein negatives MRT Signal, was zu einer Reduktion der Spezifität der Methode führt. Dieser Fehler wurde durch MRT Scans, die direkt vor der Transplantation jeder Ratte angefertigt wurden, auf ein Minimum reduziert. Die post transplantationem angefertigten Scans konnten mit den Bildern vor der Transplantation verglichen, so vorbestehende negative MRT Signale identifiziert und nicht mehr fälschlicherweise als Zellareale markiert werden. Um eine noch höhere Spezifität des MRT Signals für VSOP

zu erreichen, müssten Scan Sequenzen entwickelt werden, die nur die Eisenoxidpartikel darstellen.

Weiter muss erwähnt werden, dass die Nanopartikel nicht spezifisch für Stammzellen sind und so auch Makrophagen, die exkorporierte Eisenpartikel aufgenommen hatten, ein negatives Signal verursachen hätten können. Die Hoechst Kern-Färbung bot neben der Berliner Blau Färbung die Möglichkeit einer Doppelmarkierung, wodurch die MRT Daten validiert werden konnten. Die ex vivo Daten zeigten durch die histologisch nachgewiesenen Fusionsereignisse eine Beteiligung der transplantierten MSC an der Regeneration der Muskelfasern.

## **4.2 Magnetische Markierung und Visualisierung der MSC**

Schon seit mehreren Jahren wird die Markierung von Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln für die MRT untersucht. Dabei erfolgte die Beladung der Zellen mit Nanopartikeln, die sich in Größe, Form, Hüllstruktur und Ladung unterscheiden. Die magnetischen Eigenschaften von den bis zu 150 nm großen USPIO und den hier verwendeten VSOP C-200 mit einem Durchmesser von 9 nm wurden dahingehend untersucht. Die in der Klinik bereits verwendeten, auf Gadolinium basierten, zellulären Kontrastmittel bieten zwar einen hervorragenden paramagnetischen Kontrast, allerdings ist die Relaxivität (Wiederausrichtung im Magnetfeld) weit geringer als die der VSOP. Vorangegangene Studien zeigten eine deutlich höhere Eisenaufnahme der hier verwendeten, kleineren Eisenpartikeln und eine dadurch frühere und genauere Detektion der Zellen im MRT [83]. Bulte bezeichnet die Verwendung von VSOP gar als das Mittel der Wahl in der Zellmarkierung für das MRT [86]. Die Annahme, dass der Eisenkern der VSOP die oxidative Belastung der Zellen erhöhen und dadurch die zelluläre Integrität und Plastizität kompromittieren würde, konnte durch Stroh et al. widerlegt werden. Zwar wurde nach der Inkubation ein signifikanter Anstieg des oxidativen Stresses der Zellen gemessen, doch war dieser nach 24 Stunden nicht mehr feststellbar [104].

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die Möglichkeit einer Markierung von MSC der Ratte mit Eisenoxidnanopartikeln. Stroh et al. [3] haben unterschiedliche Zelltypen mit den Eisenoxidpartikeln inkubiert und deren Verhalten nach der Markierung beobachtet. Hinsichtlich der Menge der Inkorporation der Eisenpartikel wiesen die untersuchten Zellen große Unterschiede auf. Embryonale Stammzellen und Makrophagen zeigten eine ähnliche Eisenaufnahme, wohingegen fetale Mittelhirnzellen eine deutlich höhere Eisenkonzentration benötigten um ein gleiches Inkorporationsvolumen zu erreichen. Daher forderten Stroh et al. vor

einer in vivo Verwendung der Partikel die Auswirkungen der Markierung für jede Zellart genau zu untersuchen.

Die Vitalität wurde für ansteigende Beladungskonzentrationen von 0,375 mM bis 6 mM untersucht. Die Rattenstammzellen zeigten bis zu einer Konzentration von 6 mM keine Einschränkung der Vitalität. Um eine eventuelle Schädigung der Zellen durch die Markierung auch im Langzeit Follow up auszuschließen, wurde die Proliferation der MSC im Verlauf von 14 Tagen registriert. Während des Untersuchungszeitraumes wiesen die Replikationsraten der unmarkierten und der mit eisenbeladenen Zelllinien der 6 untersuchten Ratten keinen Unterschied auf. Diese Resultate gliedern sich sehr gut in die Toxizitätsuntersuchungen anderer Autoren ein. Im Hinblick auf eine mögliche negative Beeinflussung des Differenzierungspotentials der Zellen durch die Nanopartikel wurden zuvor entsprechende Untersuchungen durchgeführt. Es konnte kein negativer Einfluss der VSOP auf die neuronale Differenzierung in vitro erkannt werden [3]. Der entscheidende Parameter für die Toxizität der Partikel für die Zellen ist nicht die Hüllstruktur, sondern der Eisenkern, wobei die Hülle der bisher in der Forschung verwendeten Partikel meist aus physiologisch vorkommendem Dextran besteht. Dalrup-Link et al. konnten nach der Markierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen mittels dextranummüllter, im Durchmesser 120-180 nm großer Eisenpartikel, keine verminderte Zellvitalität feststellen [84]. Gleiches konnten auch Dodd et al. an T-Zellen [85] und Bulte et al. [86] an Fibroblasten zeigen. Die Gruppe um Walter untersuchte den Einfluss von Eisenoxidpartikel auf das myogene Differenzierungspotential von muscle derived stem cells der Maus. Sie verwendeten hierbei sowohl immortalisierte Maus-Myoblasten (Typ c2c12) als auch muscle derived stem cells der Maus vom Typ mc13. Ziel der Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln um myogene Zellen nach deren intramuskulären Injektion im Zeitverlauf verfolgen zu können. Hierzu setzten sie ein Mausmodell mit der Duchenne/Becker-Muskelystrophie ein (mdx-Maus) und transplantierten die markierten Zellen. In den vorangegangenen in vitro Versuchen konnten Walter et al. keinerlei Unterschiede im Bezug auf die myogene Differenzierung zwischen markierten und unmarkierten c2c12- und mc13-Zellen feststellen. Die entstandenen Muskelfasern enthielten die Eisenpartikeln auch nach der Ausdifferenzierung und konnten morphologisch nicht von den umarkiert ausdifferenzierten Muskelfasern unterschieden werden. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass die Vitalität der markierten Zellen nicht negativ beeinflusst wurde und die Wachstumsrate identisch denen der unmarkierten war [105]. Bulte untersuchte den Einfluss einer paramagnetischen Markierung auf die chondrogene Differenzierungsfähigkeit von MSC. Im Gegensatz zur allgemein vorherrschenden Meinung der Unschädlichkeit der Markierung von Stammzellen mit Eisenparti-

keln, hat der Autor bei extrem hohen Eisenbeladungskonzentrationen eine Einschränkung der Differenzierung, jedoch nur in chondrogene Richtung, festgestellt. Die Vitalität, Proliferation und die Differenzierung in adipöses oder osteogenes Gewebe blieben unauffällig [106]. Arbab et al. schrieben auf Bultes Veröffentlichung, keine Einschränkung des chondrogenen Differenzierungspotentials nach der Markierung von Stammzellen mit Eisenoxidpartikeln festgestellt zu haben. Arbab et al. führten den Verlust des Differenzierungspotenzials in Bultes Veröffentlichung nicht auf die Anwesenheit der Eisenpartikel selbst in der markierten Zelle zurück, sondern auf die Markierungsprozedur. So erhielt er durch das Durchführen nur unvollständiger Waschvorgänge nach der Markierung und vor der Überführung der Zellen in das Differenzierungsmedium ebenfalls eine verminderte chondrogene Differenzierung [106].

Die Messung der transversalen Relaxationszeit (T<sub>2</sub>-Zeit) mittels Relaxometrie stellt ein einfaches und bewährtes Verfahren dar, die Menge an inkorporierten Eisenpartikeln durch ihren indirekten Einfluss auf die Relaxationszeit zu bestimmen. Die T<sub>2</sub>-Relaxationszeit verhielt sich invers proportional zur Menge des zellulär aufgenommenen Eisens. Ab einer Konzentration von 1,5 mM konnte die Relaxationszeit nur noch geringfügig verkürzt und somit die Relaxationszeit um 63% gesenkt werden. In Versuchen mit mononukleären Zellen aus der Milz und der Inkubation mit den gleichen Eisenpartikeln konnten nahezu identische Relaxationszeiten festgestellt werden [3]. Hierbei sei erwähnt, dass nicht die Eisenpartikel selbst die Verkürzung der Relaxationszeit verursachen, sondern die die Partikel umgebenden Wasserstoffprotonen. Zimmer et al. konnten zeigen, dass sich die Eisenpartikel nicht im Zytoplasma der Zellen aufhalten, sondern dass eine intrazelluläre Aufnahme der Partikel in Vesikeln erfolgt [107]. Die Partikel reichern sich dann in den Lysosomen der Zellen an. Die Wechselwirkung der Partikel mit den Wasserstoffprotonen ist durch die Anzahl der Protonen in den Lysosomen begrenzt. Durch die Speicherung in den Lysosomen und deren Zellorganellwand sind die Partikel von den Wasserstoffprotonen des Zytoplasmas abgeschirmt und daher können weiter steigende Zahlen an Eisenpartikeln die Relaxationszeit nicht mehr verändern [3]. So ist möglicherweise zu erklären, warum bei Zellen, die mit einer höheren Eisenpartikelkonzentration inkubiert worden waren, keine weitere Verkürzung der T<sub>2</sub>-Zeit nachgewiesen werden konnte.

Die anschließende Messung des Eisengehaltes durch die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) zeigte eine konzentrationsabhängige Aufnahme des Eisens durch die MSC. Der Eisengehalt, normiert auf  $1 \times 10^6$  Zellen, konnte von 1,7 µg bei einer Beladungskonzentration 0,375 mM auf 6,3 µg bei 6 mM gesteigert werden. Bei den Markierungsversuchen konnte ein Zusammenhang der Relaxationszeit und der aufgenommenen Menge an Eisen nachgewiesen werden.

Der Eisengehalt korrelierte mit der T2-Zeit von 0,375 mM bis zu der letztendlich gewählten Beladungskonzentration von 1,5 mM sehr hoch bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = -0,99$ . Ähnliche Korrelationskoeffizienten zeigten auch die Ergebnisse mit embryonalen Stammzellen, Nabelschnurblutzellen der Ratte und fast identische bei Versuchen mit Knochenmarkszellen von Ratten [101]. Im Vergleich mit etwas größeren ( $31,3 \pm 15,8$  nm) und dextranummantelten USPIO nahmen die Zellen, die mit citratummantelten VSOP inkubiert worden waren, im selben Inkubationszeitraum fast die fünffache Menge an Eisen auf [83]. Mit den hier verwendeten Eisenoxidnanopartikeln konnte die Effizienz der Beladung im Vergleich mit anderen Eisenoxidnanopartikeln sogar noch gesteigert werden.

Nachdem die Effektivität der Markierung und deren Unbedenklichkeit für die Biologie der Zelle gezeigt werden konnte, wurden die Zellen im MRT visualisiert. Da die Zellkulturflaschen nicht direkt im MRTs untersucht werden konnten, wurden die Zellen für die in vitro Versuche in Gelschichten gebettet, die sich in einem 50 ml Falcon-Tube befanden. Die eisenbeladenen Zellen konnten in den axialen Schichten des Phantoms schnell und sicher gegenüber der Gelmatrix und den unmarkierten Zellen identifiziert werden. Die relaxometrischen Ergebnisse hatten gezeigt, dass eine Erhöhung der Beladungskonzentration von 1,5 auf 3 mM eine nur geringe Verkürzung der Relaxationszeit zur Folge hatte. Diese Tatsache konnte bei der Visualisierung der beladenen Zellen im MRT beobachtet werden: Makroskopisch konnte nicht zwischen Zellschichten, die mit 1,5 mM oder 3 mM inkubiert worden waren, unterschieden werden.

Die lokale Transplantation der markierten MSC führte zu lokalisierten Signalauslöschungen im M. soleus der Pilotratte 1. In den T2\* gewichteten Flash2D Aufnahmen waren die Zellen sofort und ohne Schwierigkeiten zu erkennen. Bei dem identifizierten Zellareal konnte jedoch ein Suszeptibilitätsartefakt (Überstrahlungsartefakt) beobachtet werden. Die übermäßige Dephasierung (Signalauslöschung) der Protonenspins wird durch den Rephasierungsimpuls der hier verwendeten Gradientenechosequenz Flash2D aufgehoben. Nach Bowen et al. bieten die Flash2D-Aufnahmen die beste Möglichkeit, die durch die Partikel verursachten Artefakte zu vermeiden und weisen sogar auf die Möglichkeit hin, mit diesen Sequenzen eine intrazelluläre Eisengehaltquantifizierung durchführen zu können [78]. Um die potentielle Fehlerquelle der Überstrahlung noch weiter zu reduzieren, wurde auf Grund der nahezu identischen Relaxationszeiten in den in vitro Versuchen die Beladungskonzentration für das folgende Pilottier von 3 mM auf 1,5 mM halbiert. Der Zellpool des Pilottieres 2 ließ sich auch bei der niedrigeren VSOP-Beladungskonzentration problemlos von der traumatisierten Umgebung abgrenzen.



In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vitro* Versuche war auf Grund des Eisengehaltes, der Proliferation, der nur geringfügig höheren Relaxationszeit und einer sehr guten Differenzierbarkeit der Zellen in den MRT Bildern mit 1,5 mM die günstigste Beladungskonzentration für die nachfolgenden Studientiere gefunden.

Anhand der T1 gewichteten Aufnahmen konnte die anatomische Lage der Zellen in den Muskeln der Ratten 1 bis 7 sehr gut zugeordnet werden. Die T2 gewichteten Aufnahmen ließen eine deskriptive Beschreibung des Heilungsverlaufes der traumatisierten Muskulatur zu. Während das Ödem des subkutanen Fettgewebes nach 42 kaum noch vorhanden war, konnte das stattgefunden Trauma des M. soleus auch nach 42 Tagen noch beobachtet werden. Die Grauwerte der gesunden Muskulatur in den T2 gewichteten Aufnahmen von  $1506 \pm 1414$  wiesen zwar eine hohe Varianz auf, doch waren die Grauwerte des traumatisierten Muskels mit über 10000 Grauwerteinheiten deutlich über denen des gesunden Muskels.

Da aus den Zellpools Aussagen über das Volumen, die Oberfläche und den Schwerpunkt gemacht werden sollten, mussten die Zellareale in Amira für eine 3D Rekonstruktion markiert werden. Um die eisenbeladenen Zellen genau markieren zu können, wurde zunächst mit dem Programm ImageJ eine Grauwertbestimmung des traumatisierten Muskels und der Zellareale durchgeführt. In keiner Flash2D Aufnahme überschritt der Grauwert die Marke von 9000 Grauwerteinheiten. Somit wies der traumatisierte Muskel um 30% höhere Grauwerteinheiten auf. Nach dieser Definition wurden alle Pixel, die einen Grauwert unter 9000 aufwiesen in Amira als Zellpool markiert und dreidimensional rekonstruiert. Im Programm Amira konnte die Bandbreite von Pixelgrauwerten im „Magic-Wand-Tool“ selektiv dargestellt werden. Hierdurch wurden Pixel mit einem höheren Grauwert nicht mehr dargestellt und somit verhindert, falsch positive Zellareale zu markieren.

Während die markierten Zellen problemlos auf den MRT Scans nach der Transplantation identifiziert werden konnten, wurden bei den Kontrolltieren, die lediglich 20 µl Kochsalzlösung bekommen hatten, keine hypointensen Veränderungen im verletzten Muskel beobachtet.

In den Flash2D Aufnahmen der Ratte 6 konnte der Zellpool über 19 axiale Schichtbilder verfolgt werden. Nach einer Woche stellte sich der Körper in der Längsachse um 2 mm von 9,5 auf 7,5 mm verkürzt dar. Anhand der dreidimensional rekonstruierten Bilder konnte ein distal gelegener, im Durchmesser sehr dünner Zellpoolanhang beobachtet werden, der als Stichkanal interpretiert wurde. Die Länge des Zellpools ist somit durch den Stichkanal zu erklären. Die Zellpoolgröße in der horizontalen Ausbreitung blieb bei allen untersuchten Ratten im Zeitraum von 6 Wochen nahezu konstant. Alle im MRT identifizierten Zellareale wie-

sen ein Korrelat in den Berliner Blau gefärbten Schnitten auf. Eine Validierung der Berliner Blau gefärbten Schnitte wurde durch eine Doppelmarkierung der MSC mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 realisiert.

Die 3D Rekonstruktion der anatomischen Strukturen der Rattenunterschenkel ließ eine gute räumliche Orientierung im Unterschenkel der Ratten zu. Das Volumen der Zellpools der Ratten korrelierte nicht mit der Anzahl der transplantierten Zellen: Eine größere Anzahl an markierten Zellen hatte keinen größeren Zellpool im MRT zu Folge. Möglicherweise überlebten nicht alle Zellen den Transplantationsvorgang, wurden abgeräumt und waren somit nicht mehr detektierbar. Im Verlauf von drei Wochen verkleinerten sich die Zellpools, was zu einer Volumenreduktion von durchschnittlich  $44,1 \pm 29\%$  führte. Der Volumenverlust ist keinesfalls allein durch eine Abräumung der Zellen durch das Makrophagensystem zu erklären. Vielmehr könnte es an einer Exkorporation der Partikel durch die Zellen liegen, wobei die Partikel dann anschließend entfernt werden und somit im MRT nicht mehr zu verfolgen sind. Auch eine Degradation der Eisenpartikel durch biochemische Vorgänge in der Zelle, die eine Detektion der Partikel durch das MRT unmöglich macht, wäre denkbar. Weiter konnten in den histologischen Schnitten Fusionsereignisse zwischen den transplantierten Zellen und den Muskelfasern beobachtet werden. Bei der Fusion ergießt sich auch der Inhalt der Zellen und somit die darin gespeicherten Partikel in das Sarkoplasma der Muskelfaser. Dies kann dann zu einer Verdünnung der Partikelkonzentration im langen Verlauf der Muskelfasern und konsekutiv schlechteren Detektierbarkeit führen.

Die Oberflächenberechnung der Zellpools zeigte eine Abnahme im Untersuchungszeitraum mit  $15,5\% \pm 15\%$  eine ähnliche Varianz wie die Volumenkalkulation. Das Volumen des Zellpools der Ratte 2 betrug  $1,59 \text{ mm}^3$  bei einer Oberfläche von  $12,55 \text{ mm}^2$  wohingegen die Ratte 3 bei fast gleichem Volumen ( $1,56 \text{ mm}^3$ ) eine mit  $56,26 \text{ mm}^2$  deutlich größere Oberfläche hatte. Dies liegt an der unterschiedlichen geometrischen Form der Zellpools der beiden Ratten: Während die Ratte 2 einen nahezu runden Zellpool hatte, breitete sich der Zellpool der Ratte 3 in einer länglichen, dünnen Form aus, was die Oberfläche enorm vergrößert.

Neurologische Studien mit eisenmarkierten Zellen in einem Schlaganfallmodell der Maus konnten eine Wanderung der transplantierten Zellen von der kontralateralen Hemisphäre entlang des Corpus callosum in das infarzierte Areal nachweisen [88]. Zhang et al. beobachteten ebenfalls eine Migration von eisenmarkierten Zellen nach intrazisternaler Injektion in das infarzierte Areal eines zuvor durch eine Ischämie ausgelösten Schlaganfalles in einem Rattenmodell [90]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen bildeten die eisenbeladenen Zellen in

dieser Arbeit kompakte Zellpools, die sich Verlauf von 6 Wochen makroskopisch nicht bewegen. Dies führen wir auf die unterschiedlichen Gewebeeigenschaften des traumatisierten Muskels zurück: Während in der homogenen Struktur des unverletzten Muskels eine Migration transplantierter Zellen möglich zu sein scheint, wird eine Migration in dem nach dem Trauma von bindegewebigen Septen durchbauten Muskel behindert. Die Aufnahmen des fehltransplantierten Tieres stützen diese Vermutung. Hier wurden die Zellen fälschlicherweise in den gesunden M. peroneus transplantiert. Die Zellen verteilten sich im gesamten axialen Verlauf des Muskels und waren ebenfalls über den vollständigen Untersuchungszeitraum zu lokalisieren. Eine Migration sollte über die Berechnung des Schwerpunktes der Zellpools im Zeitverlauf visualisiert werden. Die Berechnung und anschließende Darstellung der Zellpools zeigten trotz der Volumen- und Oberflächenveränderungen keine signifikante Wanderung des Schwerpunktes woraus wir schließen, dass die transplantierten MSC keinen Migrationsvorgängen unterlagen.

### **4.3 Regeneration von traumatisierter Muskulatur mit eisenoxidpartikelmarkierten MSC**

Eine entscheidende Frage bei der Verwendung der Nanopartikel ist, ob die Partikel das Verhalten der Zellen *in vivo* beeinträchtigen und somit die zukünftige Verwendung der VSOP in der Stammzellforschung unmöglich machen. Zwar gaben die *in vitro* Versuche keine Hinweise auf eine Einschränkung der Zellen durch die Markierung, doch kann nicht ohne weiteres von *in vitro* Versuchen auf das Verhalten der Zellen *in vivo* geschlossen werden. In der aktuellen Literatur sind keine Ergebnisse über funktionelle Untersuchungen mit VSOP markierten Zellen *in vivo* zu finden. In eigenen Versuchstiergruppen wurde daher die Auswirkung der Zellmarkierung auf den Effekt der MSC auf die Muskelfunktion untersucht. Die Traumaapplikation erfolgte durch ein Quetschtrauma, das die Situation der verletzten Muskulatur nach einem Unfall am besten simuliert. Während Bittner et al. [25] und Ferrari et al. [23] lediglich eine histologische Analyse der Muskeln durchführten, testeten Natsu et al [33] auch das funktionelle Ergebnis der Transplantation. Die Arbeitsgruppe um Natsu konnte die Kraft der transgenen Ratten durch die lokale Transplantation von allogenen MSC 4 Wochen nach der Transplantation nahezu völlig wieder herstellen. Allerdings muss hier die Art der Traumasimulation kritisiert werden. Das von ihnen durchgeführte Schnitttrauma verletzt zwar die Muskelfasern, jedoch nur in einem begrenzten Areal, sodass der Großteil der Muskulatur gar nicht verletzt wird. Die Muskelfasern blieben proximal und distal des Schnittes ebenfalls unverletzt und

somit funktionsfähig. Weiter muss erwähnt werden, dass die Kontrollgruppe, die keine Zellen transplantiert bekommen hatte, ebenfalls fast gleiche Kontraktionswerte wie die mit Zellen behandelten Tiere aufwies. In vorangehenden Studien konnten Matziolis et al. [2] an männlichen Sprague Dawley Ratten durch die autologe Transplantation von  $1 \times 10^6$  unmarkierten MSC eine Kraftsteigerung von 13% (Fast Twitch) und 14% (Tetanie) erzielen. Die entwickelte Kraft des linken traumatisierten Muskels wurde jeweils auf den gesunden rechten Muskel normalisiert. Die Muskelkraft der traumatisierten Muskulatur konnte in dieser Arbeit um 27% (Tetanie) bzw. um 30% (Fast Twitch) gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert werden. Dabei ist im Besonderen zu beachten, dass zwischen den Gruppen, deren Zellen mit den Eisenoxidnanopartikeln markiert worden waren und der Gruppe ohne Markierung, kein Unterschied in der Wiederherstellung der Kraft messbar war. Somit konnte ein negativer Einfluss der VSOP auf die Funktionalität der MSC und die regenerierende Muskulatur in vivo ausgeschlossen werden.

#### **4.4 Ansätze zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus transplantierter MSC**

Zwar konnten durch die histologischen Untersuchungen Fusionsereignisse der transplantierten Zellen und regenerierenden Muskelfasern identifiziert werden, doch waren dies nur einzelne Ereignisse und vermögen die doch enorme Kraftsteigerung nicht alleine zu erklären. Für die Aktivierung der MSC scheint dem parakrinen Effekt durch Sekretion von Zytokinen, wie dem insulinähnlichen, hepatozytären oder dem fibroblastären Wachstumsfaktor eine entscheidende Bedeutung zuzukommen [108, 109]. Somit sollte der Gegenstand zukünftiger Untersuchungen die Auswirkung verschiedener von MSC sezernierten Wachstumsfaktoren auf die Regeneration des traumatisierten Muskels sein. Mehrere Studien konnten einen positiven Effekt dieser Faktoren auf die Muskelregeneration nachweisen [110, 111]. Hierbei scheint besonders IGF-2 einen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung und das Überleben von Myoblasten zu haben [112 - 114], während der fibroblastenähnliche Wachstumsfaktor Einfluss auf die Migration zu nehmen scheint [115]. Selbst die alleinige lokale Injektion von durch MSC konditioniertem Medium ohne Zellen konnte die Regeneration im Herzmuskel verbessern [116]. Hierbei wäre auch der Frage nach dem Homing der MSC nach zu gehen. Unter Homing versteht man Mechanismen, die dazu führen, dass die MSC des natürlich vorkommenden Zellpools eines Individuums in ein defektes Gewebe einwandern und so die Regeneration unterstützen. Es ließen sich bereits mehrere Botenstoffe wie CXCL12 oder IL-8 [117, 118]

identifizieren, die für das Homing und die Migration der MSC verantwortlich zu sein scheinen.

## **4.5 Ausblick**

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich mesenchymale Rattenstammzellen durch Eisenpartikel erfolgreich markieren und nach der lokalen Transplantation in ein schweres Skelettmuskeltrauma mittels eines hochauflösenden MRT in vivo visualisieren lassen. Durch die Transplantation konnte die Kraft der kontraktiven Muskelsubstanz gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe um bis zu 30% gesteigert werden.

Für Zellen bzw. Eisenpartikel, die möglicherweise nach der Transplantation Anschluss ans Gefäßsystem hatten und somit nicht im Muskel nachgewiesen werden konnten, wären MRT Aufnahmen der Lunge, der Milz und der Leber sinnvoll.

Nach der lokalen MSC Transplantation wäre weiter das Verhalten und die Auswirkung der Zellen nach einer systemischen Applikation, sei es arteriell, venös oder auch intraperitoneal, im Zusammenhang mit der sich dann entwickelnden Muskelkraft zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode eröffnet in vielen Bereichen der Stammzellforschung und im speziellen auf dem Gebiet des Tissue Engineering neue Möglichkeiten, um das Verhalten der Zellen in vivo genauer zu untersuchen.

Nach der Übertragung der Zellmarkierung auf ein humanes Modell, wäre zukünftig die nicht invasive Überwachung von Stammzelltherapien mittels MRT in der klinischen Routine denkbar.

## Literaturverzeichnis

- [1] Friedrich, P.L. (1898): Die aseptische Versorgung frischer Wunden unter Mittheilung von Thier-Versuchen über die Auskeimzeit von Infectionserregern in frischen Wunden, *Archiv für klinische Chirurgie* Bd. 57, Seite S. 288- 310.
- [2] Matziolis, G.; Winkler, T.; Schaser, K.; Wiemann, M.; Krockner, D.; Tuischer, J.; Perka, C. und Duda, G. N. (2006): Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats, *Tissue Eng* 12 [2], Seite 361-7.
- [3] Stroh, A.; Zimmer, C.; Werner, N.; Gertz, K.; Weir, K.; Kronenberg, G.; Steinbrink, J.; Mueller, S.; Sieland, K.; Dirnagl, U.; Nickenig, G. und Endres, M. (2006): Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging, *Neuroimage* 33 [3], Seite 886-97.
- [4] Wernig, A. (2003): [Regeneration capacity of skeletal muscle], *Ther Umsch* 60 [7], Seite 383-9.
- [5] Engelhardt, Martin (2006): *Sportverletzungen. Diagnose, Management und Begleitmaßnahmen*, Urban und Fischer, München, ISBN: 978-3437240904.
- [6] Rudolf Berchtold, Hans-Peter Bruch, Otmar Trentz (2005): *Chirurgie, 5. Auflage*, Urban und Fischer, München, ISBN: 978-3437419218.
- [7] Perka, C.; Heller, M.; Wilke, K.; Taylor, W. R.; Haas, N. P.; Zippel, H. und Duda, G. N. (2005): Surgical approach influences periprosthetic femoral bone density, *Clin Orthop Relat Res* [432], Seite 153-9.
- [8] Duda, G.N.; Taylor, W.R.; Winkler, T.; Matziolis, G.; Heller, M. O.; Haas, N. P.; Perka, C. und Schaser, K. D. (2008): Biomechanical, microvascular, and cellular factors promote muscle and bone regeneration., *Exerc Sport Sci Rev* 36 [2], Seite 64-70.
- [9] Bach, A. D.; Beier, J. P.; Stern-Staeter, J. und Horch, R. E. (2004): Skeletal muscle tissue engineering, *J Cell Mol Med* 8 [4], Seite 413-22.
- [10] Heemskerk, A. M.; Strijkers, G. J.; Drost, M. R.; van Bochove, G. S. und Nicolay, K. (2007): Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration after Femoral Artery Ligation in Mice: Monitoring with Diffusion MR Imaging, *Radiology*.
- [11] Stephan Zierz, Felix Jerusalem, Katharina Eger (2003): *Muskelerkrankungen, 3. Auflage*, Stuttgart, ISBN: 978-3135678030.
- [12] Von Rueden, K. T. und Harris, J. R. (1995): Pulmonary dysfunction related to immobility in the trauma patient, *AACN Clin Issues* 6 [2], Seite 212-28.
- [13] Mauro, A. (1961): Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J Biophys Biochem Cytol* 9, Seite 493-5.
- [14] Peng, H. und Huard, J. (2004): Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair, *Transpl Immunol* 12 [3-4], Seite 311-9.
- [15] Charge, S. B. und Rudnicki, M. A. (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, *Physiol Rev* 84 [1], Seite 209-38.
- [16] Partridge, T. (2004): Reenthronement of the muscle satellite cell, *Cell* 119 [4], Seite 447-8.
- [17] Huard, J.; Li, Y. und Fu, F. H. (2002): Muscle injuries and repair: current trends in research, *J Bone Joint Surg Am* 84-A [5], Seite 822-32.
- [18] Jarvinen, T. A.; Jarvinen, T. L.; Kaariainen, M.; Kalimo, H. und Jarvinen, M. (2005): Muscle injuries: biology and treatment, *Am J Sports Med* 33 [5], Seite 745-64.
- [19] Bischoff, R. und Heintz, C. (1994): Enhancement of skeletal muscle regeneration, *Dev Dyn* 201 [1], Seite 41-54.
- [20] Seale, P. und Rudnicki, M. A. (2000): A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells, *Dev Biol* 218 [2], Seite 115-24.
- [21] Irintchev, A.; Langer, M.; Zweyer, M.; Theisen, R. und Wernig, A. (1997): Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts, *J Physiol* 500 ( Pt 3), Seite 775-85.
- [22] Kuznetsov, S. A.; Mankani, M. H.; Gronthos, S.; Satomura, K.; Bianco, P. und Robey, P. G. (2001): Circulating skeletal stem cells, *J Cell Biol* 153 [5], Seite 1133-40.
- [23] Ferrari, G.; Cusella-De Angelis, G.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G. und Mavilio, F. (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science* 279 [5356], Seite 1528-30.
- [24] Pennisi, E. (1998): Bone marrow cells may provide muscle power, *Science* 279 [5356], Seite 1456.

- [25] Bittner, R. E.; Schofer, C.; Weipoltshammer, K.; Ivanova, S.; Streubel, B.; Hauser, E.; Freilinger, M.; Hoger, H.; Elbe-Burger, A. und Wachtler, F. (1999): Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice, *Anat Embryol (Berl)* 199 [5], Seite 391-6.
- [26] Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C. D.; Buzney, E. A.; Khan, M. K.; Flint, A. F.; Kunkel, L. M. und Mulligan, R. C. (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation, *Nature* 401 [6751], Seite 390-4.
- [27] Brazelton, T. R.; Nystrom, M. und Blau, H. M. (2003): Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells, *Dev Biol* 262 [1], Seite 64-74.
- [28] Palermo, A. T.; Labarge, M. A.; Doyonnas, R.; Pomerantz, J. und Blau, H. M. (2005): Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress, *Dev Biol* 279 [2], Seite 336-44.
- [29] Dymont, P. G. (1986): Management of minor soft tissue trauma in adolescent athletes, *J Adolesc Health Care* 7 [6 Suppl], Seite 133S-135S.
- [30] Webber, A. (1988): Acute soft-tissue injuries in the young athlete, *Clin Sports Med* 7 [3], Seite 611-24.
- [31] Johannsen, F. und Langberg, H. (1997): The treatment of acute soft tissue trauma in Danish emergency rooms, *Scand J Med Sci Sports* 7 [3], Seite 178-81.
- [32] Schaser, Klaus-Dieter; Disch, Alexander C.; Stover, John F.; Lauffer, Annette; Bail, Herman J. und Mittlmeier, Thomas (2007): Prolonged Superficial Local Cryotherapy Attenuates Microcirculatory Impairment, Regional Inflammation, and Muscle Necrosis After Closed Soft Tissue Injury in Rats, *Am J Sports Med* 35 [1], Seite 93-102.
- [33] Natsu, K.; Ochi, M.; Mochizuki, Y.; Hachisuka, H.; Yanada, S. und Yasunaga, Y. (2004): Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers, *Tissue Eng* 10 [7-8], Seite 1093-112.
- [34] Axel Rüter, Otmar Trentz, Michael Wagner (2003): *Unfallchirurgie*, 2. Auflage, Urban und Fischer, München, ISBN: 978-3437218507.
- [35] Pu, L. L. (2007): Soft-tissue reconstruction of an open tibial wound in the distal third of the leg: a new treatment algorithm, *Ann Plast Surg* 58 [1], Seite 78-83.
- [36] Allen, R. E. und Boxhorn, L. K. (1989): Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor, *J Cell Physiol* 138 [2], Seite 311-5.
- [37] Doumit, M. E.; Cook, D. R. und Merkel, R. A. (1993): Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells, *J Cell Physiol* 157 [2], Seite 326-32.
- [38] Coleman, M. E.; DeMayo, F.; Yin, K. C.; Lee, H. M.; Geske, R.; Montgomery, C. und Schwartz, R. J. (1995): Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice, *J Biol Chem* 270 [20], Seite 12109-16.
- [39] Zdanowicz, M. M.; Moyse, J.; Wingertzahn, M. A.; O'Connor, M.; Teichberg, S. und Slonim, A. E. (1995): Effect of insulin-like growth factor I in murine muscular dystrophy, *Endocrinology* 136 [11], Seite 4880-6.
- [40] Foster, W.; Li, Y.; Usas, A.; Somogyi, G. und Huard, J. (2003): Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle, *J Orthop Res* 21 [5], Seite 798-804.
- [41] Chan, Y. S.; Li, Y.; Foster, W.; Horaguchi, T.; Somogyi, G.; Fu, F. H. und Huard, J. (2003): Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration, *J Appl Physiol* 95 [2], Seite 771-80.
- [42] Negishi, S.; Li, Y.; Usas, A.; Fu, F. H. und Huard, J. (2005): The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries, *Am J Sports Med* 33 [12], Seite 1816-24.
- [43] Wright-Carpenter, T.; Opolon, P.; Appell, H. J.; Meijer, H.; Wehling, P. und Mir, L. M. (2004): Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model, *Int J Sports Med* 25 [8], Seite 582-7.
- [44] French, A. J.; Adams, C. A.; Anderson, L. S.; Kitchen, J. R.; Hughes, M. R. und Wood, S. H. (2008): Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts, *Stem Cells* 26 [2], Seite 485-93.
- [45] Young, H. E. und Black, A. C., Jr. (2004): Adult stem cells, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276 [1], Seite 75-102.
- [46] Friedenstein, A. J.; Piatetzky, Shapiro, II und Petrakova, K. V. (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *J Embryol Exp Morphol* 16 [3], Seite 381-90.
- [47] Jackson, L.; Jones, D. R.; Scotting, P. und Sottile, V. (2007): Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications, *J Postgrad Med* 53 [2], Seite 121-7.

- [48] Dazzi, F.; Ramasamy, R.; Glennie, S.; Jones, S. P. und Roberts, I. (2006): The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis, *Blood Rev* 20 [3], Seite 161-71.
- [49] Sakaguchi, Y.; Sekiya, I.; Yagishita, K. und Muneta, T. (2005): Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source, *Arthritis Rheum* 52 [8], Seite 2521-9.
- [50] Bobis, S.; Jarocha, D. und Majka, M. (2006): Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications, *Folia Histochem Cytobiol* 44 [4], Seite 215-30.
- [51] Berry, M. F.; Engler, A. J.; Woo, Y. J.; Pirolli, T. J.; Bish, L. T.; Jayasankar, V.; Morine, K. J.; Gardner, T. J.; Discher, D. E. und Sweeney, H. L. (2006): Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 [6], Seite H2196-203.
- [52] de Macedo Braga, L. M.; Rosa, K.; Rodrigues, B.; Malfitano, C.; Camassola, M.; Chagastelles, P.; Laccini, S.; Fiorino, P.; De Angelis, K.; D'Agord Schaan, B.; Irigoyen, M. C. und Beyer Nardi, N. (2007): Systemic Delivery Of Adult Stem Cells Improves Cardiac Function In Spontaneously Hypertensive Rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- [53] Hu, X.; Wang, J.; Chen, J.; Luo, R.; He, A.; Xie, X. und Li, J. (2007): Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction, *Eur J Cardiothorac Surg* 31 [3], Seite 438-43.
- [54] Krause, U.; Harter, C.; Seckinger, A.; Wolf, D.; Reinhard, A.; Bea, F.; Dengler, T.; Hardt, S.; Ho, A.; Katus, H. A.; Kuecherer, H. und Hansen, A. (2007): Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart, *Stem Cells Dev* 16 [1], Seite 31-7.
- [55] Mills, W. R.; Mal, N.; Kiedrowski, M. J.; Unger, R.; Forudi, F.; Popovic, Z. B.; Penn, M. S. und Laurita, K. R. (2007): Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction, *J Mol Cell Cardiol* 42 [2], Seite 304-14.
- [56] Minguell, J. J. und Erices, A. (2006): Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease, *Exp Biol Med (Maywood)* 231 [1], Seite 39-49.
- [57] Nagaya, N.; Fujii, T.; Iwase, T.; Ohgushi, H.; Itoh, T.; Uematsu, M.; Yamagishi, M.; Mori, H.; Kangawa, K. und Kitamura, S. (2004): Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 [6], Seite H2670-6.
- [58] Ohnishi, S.; Ohgushi, H.; Kitamura, S. und Nagaya, N. (2007): Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure, *Int J Hematol* 86 [1], Seite 17-21.
- [59] Pittenger, M. F. und Martin, B. J. (2004): Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ Res* 95 [1], Seite 9-20.
- [60] Schuleri, K. H.; Boyle, A. J. und Hare, J. M. (2007): Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy, *Handb Exp Pharmacol* [180], Seite 195-218.
- [61] Tang, J.; Xie, Q.; Pan, G.; Wang, J. und Wang, M. (2006): Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion, *Eur J Cardiothorac Surg* 30 [2], Seite 353-61.
- [62] Soni, S. (2007): Allogeneic stem cell transplantation for genetic disorders, *J Ky Med Assoc* 105 [1], Seite 12-6.
- [63] Levy, Y. S.; Stroomza, M.; Melamed, E. und Offen, D. (2004): Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease, *J Mol Neurosci* 24 [3], Seite 353-86.
- [64] Jorgensen, C.; Noel, D.; Apparailly, F. und Sany, J. (2001): Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis* 60 [4], Seite 305-9.
- [65] Tabbara, I. A.; Zimmerman, K.; Morgan, C. und Nahleh, Z. (2002): Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results, *Arch Intern Med* 162 [14], Seite 1558-66.
- [66] Ponticiello, M. S.; Schinagl, R. M.; Kadiyala, S. und Barry, F. P. (2000): Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy, *J Biomed Mater Res* 52 [2], Seite 246-55.
- [67] Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kon, E. und Marcacci, M. (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, *N Engl J Med* 344 [5], Seite 385-6.
- [68] Young, R. G.; Butler, D. L.; Weber, W.; Caplan, A. I.; Gordon, S. L. und Fink, D. J. (1998): Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair, *J Orthop Res* 16 [4], Seite 406-13.



- [69] Gao, J.; Dennis, J. E.; Muzic, R. F.; Lundberg, M. und Caplan, A. I. (2001): The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion, *Cells Tissues Organs* 169 [1], Seite 12-20.
- [70] Bos, C.; Delmas, Y.; Desmouliere, A.; Solanilla, A.; Hauger, O.; Grosset, C.; Dubus, I.; Ivanovic, Z.; Rosenbaum, J.; Charbord, P.; Combe, C.; Bulte, J. W.; Moonen, C. T.; Ripoche, J. und Grenier, N. (2004): In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver, *Radiology* 233 [3], Seite 781-9.
- [71] Lee, S. T.; Park, J. E.; Lee, K.; Kang, L.; Chu, K.; Kim, S. U.; Kim, M. und Roh, J. K. (2006): Noninvasive method of immortalized neural stem-like cell transplantation in an experimental model of Huntington's disease, *J Neurosci Methods* 152 [1-2], Seite 250-4.
- [72] Barbash, I. M.; Chouraqui, P.; Baron, J.; Feinberg, M. S.; Etzion, S.; Tessone, A.; Miller, L.; Guetta, E.; Zipori, D.; Kedes, L. H.; Kloner, R. A. und Leor, J. (2003): Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution, *Circulation* 108 [7], Seite 863-8.
- [73] Cardoza J. D., Herfkens R. J. (1994): *MRI Survival Guide*, 1. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ISBN: 0781701805.
- [74] Ding, W.; Bai, J.; Zhang, J.; Chen, Y.; Cao, L.; He, Y.; Shen, L.; Wang, F. und Tian, J. (2004): In vivo tracking of implanted stem cells using radio-labeled transferrin scintigraphy, *Nucl Med Biol* 31 [6], Seite 719-25.
- [75] Wu, J. C.; Spin, J. M.; Cao, F.; Lin, S.; Xie, X.; Gheysens, O.; Chen, I. Y.; Sheikh, A. Y.; Robbins, R. C.; Tsalenko, A.; Gambhir, S. S. und Quertermous, T. (2006): Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation, *Physiol Genomics* 25 [1], Seite 29-38.
- [76] Zhou, R.; Thomas, D. H.; Qiao, H.; Bal, H. S.; Choi, S. R.; Alavi, A.; Ferrari, V. A.; Kung, H. F. und Acton, P. D. (2005): In vivo detection of stem cells grafted in infarcted rat myocardium, *J Nucl Med* 46 [5], Seite 816-22.
- [77] Arbab, A. S.; Bashaw, L. A.; Miller, B. R.; Jordan, E. K.; Bulte, J. W. und Frank, J. A. (2003): Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques, *Transplantation* 76 [7], Seite 1123-30.
- [78] Bowen, C. V.; Zhang, X.; Saab, G.; Gareau, P. J. und Rutt, B. K. (2002): Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells, *Magn Reson Med* 48 [1], Seite 52-61.
- [79] Weissleder, R.; Cheng, H. C.; Bogdanova, A. und Bogdanov, A., Jr. (1997): Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging, *J Magn Reson Imaging* 7 [1], Seite 258-63.
- [80] Wagner, S.; Schnorr, J.; Pilgrimm, H.; Hamm, B. und Taupitz, M. (2002): Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization, *Invest Radiol* 37 [4], Seite 167-77.
- [81] Taupitz, M.; Schmitz, S. und Hamm, B. (2003): [Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development], *Rofo* 175 [6], Seite 752-65.
- [82] Weissleder, R.; Stark, D. D.; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P. und Lewis, J. (1989): Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *AJR Am J Roentgenol* 152 [1], Seite 167-73.
- [83] Fleige, G.; Seeberger, F.; Laux, D.; Kresse, M.; Taupitz, M.; Pilgrimm, H. und Zimmer, C. (2002): In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking, *Invest Radiol* 37 [9], Seite 482-8.
- [84] Daldrup-Link, H. E.; Rudelius, M.; Oostendorp, R. A.; Jacobs, V. R.; Simon, G. H.; Gooding, C. und Rummeny, E. J. (2005): Comparison of iron oxide labeling properties of hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood and from peripheral blood for subsequent in vivo tracking in a xenotransplant mouse model, *Acad Radiol* 12 [4], Seite 502-10.
- [85] Dodd, C. H.; Hsu, H. C.; Chu, W. J.; Yang, P.; Zhang, H. G.; Mountz, J. D., Jr.; Zinn, K.; Forder, J.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Mountz, J. M. und Mountz, J. D. (2001): Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles, *J Immunol Methods* 256 [1-2], Seite 89-105.
- [86] Bulte, J. W.; Arbab, A. S.; Douglas, T. und Frank, J. A. (2004): Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging, *Methods Enzymol* 386, Seite 275-99.
- [87] Gupta, A. K. und Curtis, A. S. (2004): Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture, *J Mater Sci Mater Med* 15 [4], Seite 493-6.

- [88] Hoehn, M.; Kustermann, E.; Blunk, J.; Wiedermann, D.; Trapp, T.; Wecker, S.; Focking, M.; Arnold, H.; Hescheler, J.; Fleischmann, B. K.; Schwindt, W. und Buhle, C. (2002): Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [25], Seite 16267-72.
- [89] Jendelova, P.; Herynek, V.; DeCroos, J.; Glogarova, K.; Andersson, B.; Hajek, M. und Sykova, E. (2003): Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles, *Magn Reson Med* 50 [4], Seite 767-76.
- [90] Zhang, Z. G.; Jiang, Q.; Zhang, R.; Zhang, L.; Wang, L.; Zhang, L.; Arniago, P.; Ho, K. L. und Chopp, M. (2003): Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat, *Ann Neurol* 53 [2], Seite 259-63.
- [91] Hamm, B.; Staks, T.; Taupitz, M.; Maibauer, R.; Speidel, A.; Huppertz, A.; Frenzel, T.; Lawaczeck, R.; Wolf, K. J. und Lange, L. (1994): Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide, *J Magn Reson Imaging* 4 [5], Seite 659-68.
- [92] Taupitz, M.; Wagner, S.; Hamm, B.; Binder, A. und Pfefferer, D. (1993): Interstitial MR lymphography with iron oxide particles: results in tumor-free and VX2 tumor-bearing rabbits, *AJR Am J Roentgenol* 161 [1], Seite 193-200.
- [93] Schmitz, S. A.; Albrecht, T.; Jensen, K. und Wolf, K. J. (2000): [Superparamagnetic iron oxide enhanced MR angiography of the portal vein system], *Rofo* 172 [1], Seite 51-4.
- [94] Schnorr, J.; Wagner, S.; Abramjuk, C.; Wojner, I.; Schink, T.; Kroencke, T. J.; Schellenberger, E.; Hamm, B.; Pilgrimm, H. und Taupitz, M. (2004): Comparison of the iron oxide-based blood-pool contrast medium VSOP-C184 with gadopentetate dimeglumine for first-pass magnetic resonance angiography of the aorta and renal arteries in pigs, *Invest Radiol* 39 [9], Seite 546-53.
- [95] Schnorr, J.; Wagner, S.; Abramjuk, C.; Drees, R.; Schink, T.; Schellenberger, E. A.; Pilgrimm, H.; Hamm, B. und Taupitz, M. (2006): Focal liver lesions: SPIO-, gadolinium-, and ferucarbotran-enhanced dynamic T1-weighted and delayed T2-weighted MR imaging in rabbits, *Radiology* 240 [1], Seite 90-100.
- [96] Backhaus, M.; Sandrock, D. und Schmidt, W. A. (2002): Bildgebende Verfahren in der Rheumatologie, *Imaging in Rheumatology* [37], Seite 1897-1903.
- [97] Taupitz, M.; Wagner, S.; Schnorr, J.; Kravec, I.; Pilgrimm, H.; Bergmann-Fritsch, H. und Hamm, B. (2004): Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrySTALLINE very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging, *Invest Radiol* 39 [7], Seite 394-405.
- [98] Dagher, I.; Boudechiche, L.; Branger, J.; Coulomb-Lhermine, A.; Parouchev, A.; Sentilhes, L.; Lin, T.; Groyer-Picard, M. T.; Vons, C.; Hadchouel, M.; Pariente, D.; Androletti, M.; Franco, D. und Weber, A. (2006): Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization, *Transplantation* 82 [8], Seite 1067-73.
- [99] Deng, Y. B.; Liu, X. G.; Liu, Z. G.; Liu, X. L.; Liu, Y. und Zhou, G. Q. (2006): Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys, *Cytotherapy* 8 [3], Seite 210-4.
- [100] Su, W.; Zhang, H.; Jia, Z.; Zhou, C.; Wei, Y. und Hu, S. (2006): Cartilage-derived stromal cells: is it a novel cell resource for cell therapy to regenerate infarcted myocardium?, *Stem Cells* 24 [2], Seite 349-56.
- [101] Stroh, A. (2006): Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomographie, *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin*.
- [102] Fish, J. S.; McKee, N. H.; Pynn, B. R.; Kuzon, W. M., Jr. und Plyley, M. J. (1989): Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia, *J Surg Res* 47 [4], Seite 365-70.
- [103] Racz, I. B.; Illyes, G.; Sarkadi, L. und Hamar, J. (1997): The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle, *Eur Surg Res* 29 [4], Seite 254-63.
- [104] Stroh, A.; Zimmer, C.; Gutzeit, C.; Jakstadt, M.; Marschinke, F.; Jung, T.; Pilgrimm, H. und Grune, T. (2004): Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages, *Free Radic Biol Med* 36 [8], Seite 976-84.
- [105] Walter Glenn A. , Kevin S. Cahill Johnny Huard Huiheng Feng T. Douglas H. Lee Sweeney Jeff W. M. Bulte (2004): Noninvasive monitoring of stem cell transfer for muscle disorders, *Magnetic Resonance in Medicine* 51 [2], Seite 273-277.

- [106] Bulte, J. W.; Kraitchman, D. L.; Mackay, A. M. und Pittenger, M. F. (2004): Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides, *Blood* 104 [10], Seite 3410-2; author reply 3412-3.
- [107] Zimmer, C.; Weissleder, R.; Poss, K.; Bogdanova, A.; Wright, S. C., Jr. und Enochs, W. S. (1995): MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas, *Radiology* 197 [2], Seite 533-8.
- [108] Cheng, S. L.; Zhang, S. F.; Mohan, S.; Lecanda, F.; Fausto, A.; Hunt, A. H.; Canalis, E. und Avioli, L. V. (1998): Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone, *J Cell Biochem* 71 [3], Seite 449-58.
- [109] Weimar, I. S.; Miranda, N.; Muller, E. J.; Hekman, A.; Kerst, J. M.; de Gast, G. C. und Gerritsen, W. R. (1998): Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+), *Exp Hematol* 26 [9], Seite 885-94.
- [110] Kasemkijwattana, C.; Menetrey, J.; Bosch, P.; Somogyi, G.; Moreland, M. S.; Fu, F. H.; Buranapanitkit, B.; Watkins, S. S. und Huard, J. (2000): Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury, *Clin Orthop Relat Res* [370], Seite 272-85.
- [111] Menetrey, J.; Kasemkijwattana, C.; Day, C. S.; Bosch, P.; Vogt, M.; Fu, F. H.; Moreland, M. S. und Huard, J. (2000): Growth factors improve muscle healing in vivo, *J Bone Joint Surg Br* 82 [1], Seite 131-7.
- [112] Kamochi, H.; Kurokawa, M. S.; Yoshikawa, H.; Ueda, Y.; Masuda, C.; Takada, E.; Watanabe, K.; Sakakibara, M.; Natuki, Y.; Kimura, K.; Beppu, M.; Aoki, H. und Suzuki, N. (2006): Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury, *Transplantation* 82 [4], Seite 516-26.
- [113] Stewart, C. E.; James, P. L.; Fant, M. E. und Rotwein, P. (1996): Overexpression of insulin-like growth factor-II induces accelerated myoblast differentiation, *J Cell Physiol* 169 [1], Seite 23-32.
- [114] Stewart, C. E. und Rotwein, P. (1996): Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts, *J Biol Chem* 271 [19], Seite 11330-8.
- [115] Schmidt, A.; Ladage, D.; Schinkothe, T.; Klausmann, U.; Ulrichs, C.; Klinz, F. J.; Brixius, K.; Arnhold, S.; Desai, B.; Mehlhorn, U.; Schwinger, R. H.; Staib, P.; Addicks, K. und Bloch, W. (2006): Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 24 [7], Seite 1750-8.
- [116] Gneccchi, M.; He, H.; Noiseux, N.; Liang, O. D.; Zhang, L.; Morello, F.; Mu, H.; Melo, L. G.; Pratt, R. E.; Ingwall, J. S. und Dzau, V. J. (2006): Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, *Faseb J* 20 [6], Seite 661-9.
- [117] Fox, J. M.; Chamberlain, G.; Ashton, B. A. und Middleton, J. (2007): Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking, *Br J Haematol* 137 [6], Seite 491-502.
- [118] Wang, L.; Li, Y.; Chen, X.; Chen, J.; Gautam, S. C.; Xu, Y. und Chopp, M. (2002): MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture, *Hematology* 7 [2], Seite 113-7.

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom Absorptions Spektroskopie
BMSSC	Bone marrow stromal stem cells
ELSC	Epiblast like stem cells
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
GFP	Green fluorescent protein
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IL	Interleukin
MDSC	Muscle derived stem cells
MPC	Mesodermal progenitor cells
MRI	Magnetic resonance imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natrium Chlorid
PET	Positronen Emissions Tomographie
PBS	Phosphate buffered saline
PS	Penicillin Streptomycin
RICE	Rest, ice, compress, elevation
RPM	Rounds per minute
SPECT	Single photon emissions computerized tomography

TBE	TRIS Borat EDTA
TGF-1	Transforming growth factor 1
USPIO	ultra small superparamagnetic particles of iron oxide
VSOP	Very small iron oxide particles

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Duda für die Überlassung des Themas, die Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Arbeit und die hilfreichen Gespräche.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Tobias Winkler bedanken, ohne den diese Arbeit nie zu Stande gekommen wäre und für dessen Unterstützung und Hilfe in den letzten drei Jahren ich sehr dankbar bin.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Julius Wolff Institutes und des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie. Hierbei möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Perka und PD Dr. Georg Matziolis bedanken, die das Projekt über den gesamten Zeitraum hilfreich begleiteten. Besonders möchte ich Marzena Princ erwähnen, die mir die Methodik der Zellkultur beibrachte und bei Fragen und Problemen immer eine große Hilfe war. Christian König danke ich für die Einführung und Unterstützung bei der Benutzung des Programms Amira.

Großer Dank gilt auch PD Dr. Matthias Taupitz und Dr. Jörg Schnorr aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité für die Unterstützung bei der Zellmarkierung und der Nutzung des MRT. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Susanne Müller danken, die mir mit einer unglaublichen Hilfsbereitschaft bei den MRT Untersuchungen geholfen hat.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, Cornelia, Dietrich und meinen Geschwistern Moritz, Charlott, Friedrich und besonders Carolin danken, die mich immer unterstützt haben. Ganz besonderer Dank gilt Nathalie ohne deren Geduld und Unterstützung während der letzten drei Jahre diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Publikationen**

von Roth, P.; Winkler, T.; Schumann M.; Matziolis G.; Taupitz M.; Perka C.; Duda G. N.: In Vivo Tracking of Locally Transplanted Mesenchymal Stem Cells Following Skeletal Muscle Trauma (Abstract), Eur J Med Res 12(Supplement IV): I-XXIV, Seite 164 (2007)

Winkler, T.; von Roth, P.; Schumann, M. R.; Sieland, K.; Stoltenburg-Didinger, G.; Taupitz, M.; Perka, C.; Duda, G. N. und Matziolis, G. (2008): In Vivo Visualization of Locally Transplanted Mesenchymal Stem Cells in the Severely Injured Muscle in Rats, Tissue Eng: Part A, Volume 14, Number 7

Winkler, T.; von Roth, P.; Matziolis, G.; Mehta, M; Perka, C. und Duda, G. N. (2008): Dose-Response Relationship of Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Functional Regeneration after Severe Skeletal Muscle Injury in Rats, Tissue Eng Part A (Epub ahead of print)

## **Lebenslauf**

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





## **Erklärung**

„Ich, Philipp von Roth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "In vivo Visualisierung mesenchymaler Stammzellen nach lokaler Transplantation im schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift