

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

DISSERTATION

Vergleich unmittelbarer versus verzögerter Transplantation
autologer, mesenchymaler Stammzellen nach schwerem
Muskeltrauma der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Urbanski
aus Stuttgart

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. C. Perka
2. Prof. Dr. med. T. Kälicke
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Hube

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 ABSTRACT	8
3 EINLEITUNG	10
3.1 MUSKULATUR	10
3.2 FUNKTIONELLER AUFBAU DER MUSKULATUR	10
3.3 MUSKELTRAUMA	11
3.4 MUSKELREGENERATION	12
3.4.1 Inflammations- und Degenerationsphase	12
3.4.2 Reparatur- und Regenerationsphase	13
3.4.3 Narbenbildung und Fibrosierung	14
3.5 THERAPIEOPTIONEN BZW. MÖGLICHKEITEN ZUR VERBESSERUNG DER REGENERATION	15
3.5.1 Sofortige Therapie	16
3.5.2 Spätere Therapie	17
3.5.2.1 <i>Momentan empfohlene Therapie</i>	17
3.5.2.2 <i>Weitere mögliche Behandlungsansätze</i>	18
3.5.2.2.1 Medikamentöse Therapie / NSAID	18
3.5.2.2.1.1 Analgetika	18
3.5.2.2.1.2 NSAIDs	18
3.5.2.2.1.3 Steroide	19
3.5.2.2.2 Wachstumsfaktoren	19
3.5.2.2.3 Genthherapie	20
3.5.2.2.4 Therapeutischer Ultraschall	21
3.5.2.2.5 Hyperbare Sauerstofftherapie	21
3.5.2.2.6 Weitere therapeutische Ansätze mittels humanogener Substanzen	22
3.5.2.3 <i>Operativer Behandlungsansatz</i>	22
3.5.3 Stammzelltherapie	23
3.5.3.1 <i>Stammzellen und mesenchymalen Stammzellen</i>	23
3.5.3.2 <i>Aktueller Einsatz von MSCs in Forschung und Klinik</i>	26
3.5.3.2.1 Gewinnung von MSCs	26

3.5.3.2.1 Isolation und Kultur von MSCs.....	26
3.5.3.2.2 MSCs im Tiermodell und in klinischen Versuchen.....	27
3.5.3.2.3 Wirkung von MSCs auf Myozyten bzw. Traumata in Muskelgewebe	29
3.6 HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER DISSERTATION	30
4 MATERIAL UND METHODEN.....	33
4.1 IN VIVO	33
4.1.1 Versuchstiere	33
4.1.2 Versuchstiergruppen und Versuchsverlauf	33
4.1.3 Biopsie	34
4.1.4 Traumatisierung.....	35
4.1.5 Zelltransplantation	36
4.1.6 Kraftmessung	37
4.2 IN VITRO	39
4.2.1 Zellkultur	39
4.2.2 Zellvorbereitung für die Transplantation	39
4.2.3 Differenzierungsassays	40
4.2.3.1 Vorbereitung der Zellen	40
4.2.3.2 Auswertung der Differenzierungsassays	40
4.3 STATISTIK	41
5 ERGEBNISSE	42
5.1 ZELLCHARAKTERISIERUNG UND DIFFERENZIERUNGSASSAYS	42
5.2 EINFLUSS DES TRAUMA AUF DIE MUSKELKRAFT.....	44
5.3 EINFLUSS VON MSCS AUF DIE MUSKELREGENERATION	46
5.4 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER TRANSPLANTATIONSZEITPUNKTE AUF DIE MUSKELREGENERATION.....	48
5.5 WEITERER EINFLUSS DER TRANSPLANTATION VON MSCS AUF DIE BIOMECHANISCHEN FÄHIGKEITEN DER MUSKULATUR	50
6 DISKUSSION	52
6.1 ERGEBNISSE DER ZELLCHARAKTERISIERUNG UND DER DIFFERENZIERUNGSASSAYS	53

6.2 EINFLUSS DES TRAUMAS AUF DIE MUSKELKRAFT	54
6.3 EINFLUSS VON MSCs AUF DIE MUSKELREGENERATION	57
6.4 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER TRANSPLANTATIONSZEITPUNKTE AUF DIE MUSKELREGENERATION.....	61
6.5 WEITERER EINFLUSS DER TRANSPLANTATION VON MSCs AUF DIE BIOMECHANISCHEN FÄHIGKEITEN DER MUSKULATUR	68
6.6 FAZIT	70
LITERATURVERZEICHNIS.....	72
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
DANKSAGUNG	86
ERKLÄRUNG	87

1 Zusammenfassung

Durch Unfälle, sportliche Aktivitäten oder chirurgische Eingriffe verursachte Muskelverletzungen stellen eine ernstzunehmende Problematik im klinischen Alltag aller Fachrichtungen dar und schränken Patienten oft lebenslang ein. Obwohl die Skelettmuskulatur über gute intrinsische Regenerationsfähigkeiten verfügt, kommt es posttraumatisch oft zu einem Funktionsdefizit der Muskulatur. Die Ursachen hierfür können sowohl in einem insuffizienten Wiederaufbau von funktionellem Muskelgewebe als auch in einer überschießenden Fibrosierung innerhalb des verletzten Muskels gesucht werden. Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich auf Ruhigstellung, Kühlung, Kompression und Hochlagerung der Muskulatur. Für weitere Therapieansätze, wie bspw. der Applikation von nicht-steroidalen, anti-inflammatorischen Medikamenten konnten bisher nur unbefriedigende Ergebnisse beobachtet werden. Ein aktuell diskutierter und untersuchter Gegenstand ist die potenzielle Nutzung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in klinischen Fragestellungen. Hierzu wurden verschiedene vielversprechende Beobachtungen in unterschiedlichen Fachbereichen wie der Kardiologie oder der Neurologie publiziert. In Vorarbeiten konnte sowohl der positive Effekt einer lokalen Transplantation von MSCs auf die funktionelle Muskelregeneration nach einem Trauma als auch die Abhängigkeit der funktionellen Regeneration von der Menge der transplantierten MSCs nachgewiesen werden. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus der Untersuchung des Einflusses verschiedener Transplantationszeitpunkte von autologen MSCs in einen verletzten Muskel auf dessen funktionelle Muskelregeneration. Die primäre Hypothese der Dissertation besagt, dass eine direkt auf das Muskeltrauma folgende Transplantation von MSCs einer verzögerten Transplantation in Bezug auf die Muskelregeneration unterlegen ist. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass sowohl eine sofortige als auch eine verspätete Transplantation von MSCs einen positiven Einfluss auf die Muskelregeneration hat.

Für den Versuch wurden 27 weibliche Sprague-Dawley Ratten in drei Gruppen (n=9) aufgeteilt. Die Zellgewinnung erfolgte aus dem tibialen Knochenmark. Zwei Wochen auf die Zellentnahme folgend wurde den Versuchstieren ein standardisiertes, stumpfes Trauma des *Musculus soleus* zugefügt. Es wurde eine unmittelbar auf das Trauma folgende Transplantation mit einer um eine Woche versetzten Transplantation verglichen. Beide Gruppen erhielten jeweils 2×10^6 MSCs in den verletzten Muskel injiziert, zum Zeitpunkt der Transplantation der Vergleichsgruppe wurde physiologische Kochsalzlösung verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde zu beiden Zeitpunkten physiologische Kochsalzlösung injiziert. Vier Wochen nach dem

Trauma wurde die Kraft der tetanischen sowie der fast-twitch (FT)-Kontraktionen des *M. soleus in vivo* durch beidseitige Stimulation des *Nervus ischiadicus* gemessen. Weiterhin wurden die Zellen auf ihre Adhäsions- sowie auf ihre Differenzierungsfähigkeit untersucht.

Messungen ergaben einen Verlust der ursprünglichen Kontraktionskraft von 62 % bei tetanischer und 43,5 % bei FT-Kontraktion durch die Traumatisierung. Durch lokale Injektion von MSCs konnte am *M. soleus* unabhängig vom Transplantationszeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe eine relative Steigerung der tetanischen Kraft um 51,5 % und von 66,5 % der Kraft bei FT-Kontraktionen beobachtet werden. Tetanische und FT-Kontraktionskräfte waren nach Transplantation von MSCs im Vergleich zu nicht-transplantierten Tieren signifikant ($p < 0,05$) größer. Im Gegensatz zur Hypothese konnte bei Vergleich der sofortigen mit der verspäteten Transplantation weder für tetanische Kontraktionen ($p = 0,73$) noch für FT-Kontraktionen ($p = 0,93$) ein signifikanter Unterschied der Kontraktionskräfte festgestellt werden. Der Vergleich der verschiedenen Transplantationszeitpunkte zur Kontrollgruppe ergab einen signifikant geringeren Kraftverlust ($p < 0,05$) sowohl bei FT als auch bei tetanischen Kontraktionen für die verspätete Transplantation. Die sofortige Transplantation konnte eine signifikante Verbesserung ($p < 0,05$) der Kontraktionskraft bei FT-Kontraktionen erreichen, bei tetanischen Kontraktionen war eine Tendenz zu einer Verbesserung zu beobachten. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss ($p = 0,85$) einer Zelltransplantation auf die Twitch / Tetanus Ratio der Muskulatur. Jedoch konnte eine signifikante Verschiebung ($p < 0,005$) der Ratio bedingt durch die Traumatisierung unabhängig von Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Transplantationsgruppen beobachtet werden.

Durch diese Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine sofortige wie auch die verspätete Transplantation von autologen MSCs in Bezug auf ihren Einfluss auf die funktionelle Muskelregeneration nach einem Trauma gleichwertig sind, jedoch sowohl eine sofortige wie auch eine verspätete Transplantation autologer MSCs einen Vorteil für die Muskelregeneration erbringen kann.

2 Abstract

Skeletal muscle trauma, often caused by accidents, sportive activities or surgical procedures, can pose challenging problems in every clinical field and can result in a lifelong restriction for the patient. Although skeletal muscles have good intrinsic capacities for regeneration, a trauma often results in posttraumatic, functional deficits. Reasons for this can be attributed to an inadequate reconstruction of contractive, functional muscle tissue as well as to an intramuscular fibrosis caused by an excessive inflammatory reaction. Other treatment options are limited to resting, cooling, compression and elevation of the affected muscle. Further therapeutic means such as the application of non-steroid, anti-inflammatory drugs have shown unsatisfactory results so far. The potential use of mesenchymal stem cells (MSCs) in clinical settings is much discussed and therefore subject of scientific studies. Promising observations on this matter have been published in different clinical fields such as cardiology and neurology. In previous studies we could show a positive effect of a local transplantation of MSCs on the functional muscle regeneration and further demonstrated a dose-response relationship of MSC-transplantation after severe skeletal muscle trauma in rats. The aims of the present work were to examine the influences on the functional muscle recovery for different time points of the transplantation of autologous MSCs after a severe muscle trauma. It was hypothesized that an immediate transplantation of MSCs following a trauma is inferior to a delayed transplantation of MSCs concerning the functional muscle regeneration. Furthermore, it was expected that both the immediate and delayed transplantation of MSCs will show a positive outcome regarding the muscle regeneration.

In the experiment, 27 female Sprague-Dawley rats were divided into three groups (n=9). Bone marrow aspirations were taken from both *tibiae* of each animal. A standardized, blunt crush injury was performed on the animals left soleus muscle two weeks following the bone marrow aspirations. The immediate posttraumatic transplantation of MSCs was compared to transplantation one week later. Both groups were injected with 2×10^6 MSCs into the traumatized muscle, using a sham injection of saline solution at the point of time the comparison group was transplanted respectively. The control group was treated with a sham injection of saline solution at both points of time. The force after both tetanic and fast-twitch (FT) stimulation was measured *in vivo* four weeks following skeletal muscle injury by stimulation of the sciatic nerve on both sides. In a separate experiment, the cells were examined for surface adhesion and their ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages.

The traumatized muscles showed a reduction of 62 % of their original tetanic contraction forces and of 43,5 % of their FT contraction forces caused by the trauma. Local injection of MSCs into the soleus muscle lead to a relative increase of 51,5 % of tetanic forces and of 66,5 % of FT forces compared to the sham-treated control group independent of the point of time of the transplantation. Tetanic and FT contraction forces were significantly ($p < 0,05$) higher in animals after transplantation of MSCs compared with non-transplanted animals. Surprisingly, the comparison of immediate with delayed transplantation did not result in a significant difference in contraction forces neither for tetanic ($p = 0,73$) nor for FT stimulations ($p = 0,93$). The comparison of the different transplantation groups with the sham-treated control group showed a significantly lower loss of force ($p < 0,05$) in tetanic and FT contractions for the delayed transplantation group of MSCs. Moreover, the immediate transplantation of MSCs could show a significant improvement ($p < 0,05$) to its contraction force at FT stimulation and the tendency of improvement for tetanic stimulations. No significant changes ($p = 0,85$) to the Twitch / Tetanus ratio could be observed after the transplantation of MSCs. However, a significant shift ($p < 0,005$) of the ratio was caused by the injury to the muscle, regardless of the experimental groups the animals belonged to.

This work proves for the first time, that an immediate as well as a delayed transplantation of autologous MSCs are equal in regard to their influences on the functional muscle regeneration. Yet it was shown that regarding the functional muscle regeneration, both immediate and delayed transplantation of autologous MSCs leads to a functional benefit.

3 Einleitung

3.1 Muskulatur

Die Muskulatur ist ein kontraktiles Organ des menschlichen Körpers, welches durch eine Abfolge von Kontraktion und Erschlaffen innere und äußere Strukturen des Organismus bewegen kann. Die durch Kontraktion erzeugte Kraft dient zahlreichen lebenswichtigen Funktionen des Organismus, wie bspw. den Atembewegungen und der Beförderung des Blutes im Herz-Kreislauf-System. Gleichzeitig bildet die Muskelkontraktion die Grundlage der Bewegung von Körperteilen und der aktiven Fortbewegung eines Individuums.

3.2 Funktioneller Aufbau der Muskulatur

Das grundlegende strukturelle Element des Muskels ist die Muskelfaser, welche an ihren beiden Enden mit dem Bindegewebe einer Sehne oder einer Faszie verbunden ist. Jede Muskelfaser ist von einer Membran umgeben, die als *Endomysium* bezeichnet wird. In ein *Perimysium* genanntes Bindegewebe gebettet, werden mehrere Muskelfasern von dem später in die Muskelfaszie übergehenden *Epimysium* zu Muskelfaserbündeln zusammengefasst. Mehrere Muskelfaserbündel ergeben einen Muskel.

Einzelne Muskelfasern entstehen durch die Fusion mehrerer *Myozyten*, weshalb sie bei Betrachtung die typische Mehrkernigkeit aufzeigen. Von *Sarkolemm* umgeben, bilden eine Mehrzahl von *Myofibrillen* eine einzelne Muskelfaser. Jede Myofibrille wird aus dem Zusammenschluss weiterer Untereinheiten, der *Sarkomere* gebildet. Sarkomere sind aus ihren spezifischen Strukturproteinen *Aktin* und *Myosin* aufgebaut, die aufgrund der Wechselwirkung der *Aktin-* und *Myosinfilamente* den zentralen Bestandteil des kontraktilen Apparats bilden. Aus deren Anordnung ergibt sich die typische Querstreifung der Skelettmuskulatur [1, 2].

Nach ihren Kontraktionseigenschaften werden bei Muskelfasern ausdauernde „*Slow-Twitch (ST)*“, also langsam kontrahierende Fasern und schneller kontrahierende, dafür auch schneller ermüdende „*Fast-Twitch (FT)*“ Fasern unterschieden [3]. Die histochemische Analyse führte zu der Unterteilung in *Typ I- (Slow)* und *Typ II- (Fast)* Fasern. Mittels einer Myosin ATPase-Färbung konnte eine genauere Unterteilung der Muskelfasertypen erfolgen, von den langsamsten zu den schnellsten in Typ I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB und IIB. Es existieren weitere Unterteilungen der Muskelfasern basierend auf Färbungen von Isoformen der schweren Kette des Myosins und der biochemischen Identifikation von Enzymen des Energiemetabolismus der Muskelfaser [4].

3.3 Muskeltrauma

Muskelschäden entstehen durch äußeren Einfluss bei Verkehrsunfällen, Unfälle am Arbeitsplatz oder Kollisionen während sportlicher Aktivitäten. In chirurgischen Eingriffen bedarf es oftmals Schnitte durch gesunde Muskulatur, um das Operationsgebiet zu erreichen. Im Bereich des Sports häufig zu beobachten sind durch Treten oder Rennen hervorgerufene Muskelverletzungen wie die Zerrung des *Musculus biceps femoris* [5]. Ein Muskeltrauma stellt sich als Prellung, Zerrung oder als kompletter Abriss dar, im Rahmen von Platzwunden, Schnittwunden oder nach lokalen Ischämien. Jede dieser Schädigungen kann zu Verlust von Muskelmasse und zu Bewegungseinschränkungen führen. Selbst die Heilung einer Knochenfraktur kann durch ein benachbartes Weichteiltrauma negativ beeinflusst werden [6, 7]. Somit sind Muskeltraumata eine Herausforderung sowohl in der Sportmedizin, als auch in der Traumatologie [2, 8].

Die Muskelprellung wird hauptsächlich durch den Aufprall eines stumpfen, nichtpenetrierenden Gegenstandes verursacht. Hier erfolgt eine starke, plötzliche Kompression, wodurch das weichere Muskelgewebe gegen härtere Strukturen wie den Knochen gedrückt wird und durch bei seitlicher Krafteinwirkung auftretende Scherkräfte kleinste Gefäße zerreißen und Muskelfasern schädigen [2, 9]. Die Hautoberfläche wird nicht durchtrennt und bleibt intakt.

Eine Zerrung ereignet sich, wenn die Muskelfasern entweder passiv oder aktiv überstreckt werden. Zudem kann auch eine starke exzentrische Kontraktion Grund für eine Zerrung sein [8]. Meist ist diese nahe am Muskelsehnenübergang lokalisiert und betrifft Muskeln, die sich über zwei Gelenke erstrecken [2].

Diese beiden Verletzungstypen machen mehr als 90% der Verletzungen der Sportmedizin aus [10].

Zusammen mit den weitaus selteneren Muskelrissen wurden diese Arten der Verletzung in der Vergangenheit auch als Shearing-Verletzungen bezeichnet, bei denen die Muskelfaser, ihre Basallamina und ihre Faszien beschädigt sind. Hierzu steht im Gegensatz die *in-situ* Nekrose, bei der die Muskelfasern innerhalb einer intakten Basallamina absterben [11]. Zu diesen kann die ischämische Muskelschädigung gezählt werden.

Man unterteilt Muskelverletzungen darüber hinaus abhängig von Schwere und dem Ausmaß der Einschränkungen, die sich aus ihnen ergeben:

Muskelverletzungen 1. Grades, die nur einzelne Muskelfasern betreffen, resultieren in leichten Schwellungen und Schmerzen und sind nicht oder nur von minimalen Bewegungseinschränkungen und Kraftverlusten begleitet.

Muskelverletzungen 2. Grades gehen mit größerem Schaden im Muskels einher und zeigen deutliche Funktionseinschränkungen.

Muskelverletzungen 3. Grades sind aufgrund eines kompletten Abrisses des Muskels mit einem kompletten Funktionsverlust verbunden [12].

3.4 Muskelregeneration

Relativ unabhängig von der Art der Muskelschädigung [13, 14] läuft die Muskelheilung in drei konstanten Phasen ab [1, 2, 8, 9, 11, 13]:

3.4.1 Inflammations- und Degenerationsphase

Unmittelbar auf eine Verletzung folgend, werden innerhalb der nächsten Tage verschiedene Prozesse initiiert. Im Beispiel einer Prellung trifft eine starke mechanische Kraft den Muskel, und zerstört die Zellmembran und Basallamina der Myozyten. Der natürliche Prozess der Zellnekrose tritt ein. Muskelfasern können eine Länge bis zu 30 cm erreichen. Es besteht die Gefahr, dass ein Trauma die Faser in ihrer ganzen Länge zerstört [15]. Um dies zu verhindern, bilden sich Kontraktionsbänder aus dem Zytoskelett der Faser, die die Nekrose aufhalten, und auf einen lokalen Prozess beschränken [13]. Eröffnete Gefäße führen schnell zur einer Hämatombildung und Schwellung der Umgebung. Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, T-Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen infiltrieren das Traumaareal [16]. Zunächst gelangen größtenteils neutrophile Granulozyten direkt durch die rupturierten Gefäße aus dem Blut an den Ort der Verletzung [14, 17]. Die weiteren Entzündungszellen werden etwas später durch verschiedene Chemotaxine (z.B. Interleukine und Tumor-Nekrosefaktoren) angelockt, welche von Fibroblasten, Lymphozyten und Satellitenzellen ausgeschüttet werden [14, 18, 19]. Diese räumen tote Zellen und Zelltrümmer ab. Die Basallamina der Muskelfasern bleibt meistens erhalten [20]. Gleichzeitig werden im verletzten Muskel unterschiedliche Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, TGF- β , IGF) ausgeschüttet, die Muskelzellen zur Regeneration anregen und die Satellitenzellen stimulieren [1, 2, 21, 22, 23]. Diese Ausschüttung von bspw.

IGF ist ein Effekt, der bereits bei physiologischen Stimuli wie einer Dehnung des Muskels beschrieben wurde [24]. Hiermit verschieben sich die Abläufe der Aufräumarbeiten von den mononukleären Zellen hin zu zwei konkurrierenden Prozessen innerhalb des traumatisierten Muskels. Einerseits kommt es zu Bildung von Granulationsgewebe mit anschließender Fibrosierung und Formation einer bindegewebigen Narbe [2, 13]. Andererseits beginnt der Muskel, das traumatisierte Muskelgewebe zu reparieren, und Muskelfasern zu regenerieren.

3.4.2 Reparatur- und Regenerationsphase

Durch Verschiebung der Prozesse innerhalb des Muskels hin zur Wiederherstellung von funktionellem Muskelgewebe kann ab dem 7. – 10. Tag nach einem Trauma von der Reparatur- und Regenerationsphase gesprochen werden. Ein Pool undifferenzierter Zellen, der Satellitenzellen, wird bereits während der Embryonalentwicklung innerhalb des Muskels bereit gestellt [25]. Sie befinden sich randständig zwischen Basallamina und Plasmamembran der Muskelfaser. In der Literatur können Satellitenzellen darüber hinaus verschiedenen Unterklassen zugeordnet werden. Die eine als Stammsatellitenzellen bezeichnete Unterklasse wird als Reaktion auf ein Trauma durch die ausgeschütteten Wachstumsfaktoren zuerst zur Proliferation angeregt [26]. Eine der beiden neu entstanden Satellitenzellen kann nun den Satellitenzellpool in seiner Quantität erhalten. Die andere neu entstandene Satellitenzelle kann nach der Proliferation weiter zu einem Myoblasten differenzieren [27, 28]. Die andere Unterklasse hingegen, im Englischen „Committed Satellite Cell“ genannt, kann direkt in einen Myoblasten differenzieren [27, 28]. Myoblasten, die durch direkte oder indirekte Differenzierung entstanden sein können, verschmelzen miteinander und formen so mehrkernige Muskelzellen [20]. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellkerne dieser Muskelzellen noch zentral in der Muskelfaser lokalisiert. Nachdem diese neugeformten Zellen mit den übriggebliebenen Teilen der schon bestehenden, traumatisierten Muskelfasern fusioniert sind, gewinnen sie auch das muskelspezifische Erscheinungsbild mit randständigen Zellkernen und der typischen Querstreifung zurück [20]. Es wurde interessanterweise gezeigt, dass hier wiederum verschiedene Subpopulationen von Satellitenzellen existieren, bei denen die schnell proliferierenden Satellitenzellen hauptsächlich mit bereits differenzierten Muskelfasern, langsam proliferierende Satellitenzellen eher miteinander fusionieren [29].

Zusätzlich zu Satellitenzellen können auch deren Vorläuferzellen, einerseits im Muskel lokalisierte und andererseits mesenchymale, dem Knochenmark entstammende Stammzellen (MSCs) zur Regeneration beitragen. MSCs besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in ver-

schiedenen Zelllinien, darunter auch zur Myogenese [22, 30, 31]. Deren Einfluss auf die Regeneration wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer besprochen werden.

Diese Vorgänge finden meist innerhalb Zylindern übriggebliebener Basallaminae statt, welche so wieder ausgefüllt werden. Hierauf strecken sich Muskelfaseräste von beiden Seiten des Traumaareals soweit wie möglich in die Narbe aus Granulationsgewebe vor und verankern sich in diesem mittels „Myotendinous Junctions (MTJ)“, [32, 33]. Indem die Narbe mit der Zeit abgebaut und verringert wird, nähern sich beide Seiten des verletzenden Muskels wieder einander an.

3.4.3 Narbenbildung und Fibrosierung

Parallel zu den bereits beschriebenen Abläufen, vollzieht sich die Bildung eines strukturgebenden Bindegewebes, im Überschuss in Form der Bildung einer funktionell einschränkenden Narbe. Die durch das Trauma entstandene Lücke im Muskel wird sofort durch die eröffneten Gefäße mit einem Hämatom ausgefüllt. Das Hämatom wird innerhalb des ersten Tages von Entzündungszellen wie z.B. Phagozyten erreicht, die mit dem Ab- und Umbau der Blutansammlung beginnen [13, 14]. Um Zugbelastungen im Muskel entgegenzutreten zu können, bildet sich aus blutentstammendem Fibrin und Fibronectin ein frühes Granulationsgewebe [34, 35, 36]. Ein Teil des Fibronectins wird von eingewanderten Fibroblasten produziert [34]. Das produzierte Fibronectin gehört zusammen mit Tenascin-C zu den ersten gebildeten Proteinen [37]. Zusammen verbinden sie sich zu Superfibronectin. Da Fibronectin und Tenascin-T über ein mehrfaches ihres Ruhezustandes hinaus dehnbar sind, erlangt bereits die frühe extrazelluläre Matrix der Bindegewebsnarbe eine hohe Dehnbarkeit und Reißfestigkeit [2, 38, 39]. Bereits ab dem dritten Tag ist Kollagen Typ III im Granulationsgewebe nachweisbar, nach etwa einer Woche ist hier eine Abnahme messbar. Nur wenige Tage auf Kollagen Typ III folgend ist Kollagen Typ I nachweisbar, das über mehrere Wochen produziert wird [34, 35, 36, 40]. Im Verlauf verdichtet sich das initial große Granulationsgewebe zu einer kleinen Menge von Bindegewebe, das dann hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht. Weiterhin steigt die Reißfestigkeit gegenüber Zug mit der Bildung von Kollagen Typ I mit der Zunahmen von intermolekularen Querverbindungen innerhalb des Kollagens während der Ausreifung der Narbe [2, 10, 34, 40, 41, 42]. Diese histologischen Veränderungen sind dafür verantwortlich, dass ab Tag 10 nach Trauma die Bindegewebsnarbe nicht mehr das schwächste Glied im verletzten Muskel darstellt [42].

Obwohl leichte Muskeltraumata ohne messbare Funktionseinschränkungen abheilen, wird eine vollständige Regeneration nicht immer erreicht. In einer Studie von Garrett et al. konnten vollständig rupturierte *M. extensor digitorum longus* von Hasen noch 50 %, angerissene Muskeln 60 % ihrer ursprünglichen Kontraktionskraft wiedererlangen [43]. Zudem gibt es berechnete Annahmen, dass eine überschießende Fibrosierung die Regeneration negativ beeinflussen kann. Kasemkijwattana et al. konnten zeigen, dass in ihrem Versuchsmodell an der Maus 35 Tage nach dem Trauma immer noch regenerierende Muskelfasern vorhanden waren, die aber aufgrund der sie umgebenden Fibrose nicht weiter in das Narbengebiet einwachsen konnten [26]. Da das Ausmaß der Fibrosierung maßgeblich von der Größe des initialen Hämatoms abhängt, ist die Gefahr einer überschießenden Reaktion und daraus folgender inkompletter Muskelregeneration mit Funktionseinschränkung bei schweren Verletzungen, kompletten Muskelabrissen oder Rerupturen älterer Traumata besonders hoch [2].

3.5 Therapieoptionen bzw. Möglichkeiten zur Verbesserung der Regeneration

Um eine Heilung der Muskelverletzung mit einem möglichst geringen Funktionsverlust zu erreichen, kann man den Phasen entsprechend von zwei verschiedenen Ansätzen ausgehen.

Einerseits ist es notwendig, die Hämatombildung, und damit den Einstrom von Entzündungszellen, die eine Entzündungsreaktion und die Fibrosierung initiieren, zu minimieren. Zudem gibt es Anzeichen dafür, dass neutrophile Granulozyten durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen einen zusätzlichen, sekundären Muskelschaden verursachen können [17].

Andererseits kann versucht werden, durch extrinsische Interventionen die Regeneration und Bildung neuer Muskelfasern zu fördern. Außerdem ist es wichtig, die Therapie dem zeitlichen Verlauf der biologischen Vorgänge innerhalb des Muskels anzupassen.

3.5.1 Sofortige Therapie

Unmittelbar nach einem traumatischen Ereignis ist es primär notwendig, auf die Blutung innerhalb des Traumagebietes Einfluss zu nehmen. Auf diesem Ziel basiert der aktuelle, weit verbreitete Therapiestandard, das RICE-Prinzip.

„R“ steht für Rest. Mehrere Studien konnten zeigen, dass ein kurzer Zeitraum der Immobilisation des Muskels vorteilhaft für dessen Regeneration ist. Erstens erlaubt dieser den Muskelenden, sich fester im Narbengewebe zu verankern, was die Gefahr einer Reruptur minimiert. Außerdem wird verhindert, dass sich die Enden des traumatisierten Muskels zurückziehen können, und sich die Lücke zwischen ihnen vergrößert. Damit wird wiederum die Größe des sich dort entwickelnden Hämatoms verringert, und überschießende Narbenbildung unterbunden [12, 41, 44].

„I“ steht für Ice, was mit der Kühlung des Muskels gleichzusetzen ist. Studien belegen, dass eine Herabsetzung der Gewebstemperatur den Sauerstoffbedarf der Zellen und den zellulären Metabolismus reduziert. Die Freisetzung hydrolytischer Enzyme (Proteasen) und Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin 2 wird verringert, die ihrerseits Heilungsprozesse hemmen [45]. Ebenso vermindert wird die Ausschüttung vasodilatativer Mediatoren, wodurch eine Absenkung des hydrostatischen Gewebedrucks einer Ödembildung entgegen wirkt [12, 46, 47].

„C“ wie „Compression“ weist darauf hin, welche Bedeutung eine Kompression des traumatisierten Muskels hat. Inwiefern diese jedoch sinnvoll ist, bleibt zu diskutieren, da die Literatur in diesem Fall keine eindeutigen Daten bezüglich einer Verbesserung der Muskelregeneration liefert. Obwohl der intramuskuläre Bluteinfluss in das verletzte Gebiet verringert wird [48], konnte eine schwedische Studie aus dem Jahr 1997 aufzeigen, dass sofortige Kompression innerhalb von 5 Minuten nach Trauma zu keiner signifikanten Verkürzung der Zeit zur subjektiven Erholung von der Verletzung geführt hat [49]. Trotzdem wird die initiale Kompression über einen mehrstündigen Zeitraum nach aktuellen Guidelines empfohlen.

„E“ betrifft den letzten Teil des RICE-Prinzips, die Elevation. Durch die Elevation oder Anhebung des verletzten Körperteils soll ähnlich wie bei der Kompression, der Blutfluss in das verletzte Areal vermindert werden. Die Idee basiert auf grundlegenden Prinzipien der Physiologie und Traumatologie. Die Erhöhung eines verletzten Körperteils über das Niveau des Herzens vermindert dort den hydrostatischen Druck und somit auch die Ansammlung von Flüssigkeit [12].

3.5.2 Spätere Therapie

3.5.2.1 *Momentan empfohlene Therapie*

Obwohl die initiale Immobilisation des Muskels einige unerwünschte Nebeneffekte wie bspw. eine muskuläre Atrophie mit sich bringt [10], ist sie notwendig damit das Granulationsgewebe eine ausreichende Stärke entwickeln kann, um hiermit den durch Muskelkontraktionen entstehenden Zugbelastungen zu widerstehen. Somit wird frühzeitigen Rerupturen in den ersten Tagen der Regeneration entgegengewirkt.

Im Anschluss hieran wird aus vielfältigen Gründen ein frühzeitiger Beginn der Mobilisation des Muskels angeraten. Järvinen konnte zeigen, dass das Granulationsgewebe penetrierende Muskelfasern sich in einem früh mobilisierten Muskel im histologischen Bild entlang den unverletzten Muskelfasern orientiert entwickeln. In einem immobilisiertem Muskel hingegen wachsen die entsprechenden Fasern konfus und nicht zielgerichtet [10]. Eine frühe Mobilisation fördert die Einsprossung von Kapillaren in den verletzten Bereich. Angiogeneese ist für die Versorgung des Traumaareals und damit für die Regeneration von essentieller Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Gewebsregeneration histologisch direkt mit der Gefässeinsprossung korreliert [50]. Eine weitere Studie zeigte außerdem, dass ein mobilisierter, verletzter Muskel früher als ein für die gleiche Zeit immobilisierter Muskel die volle Zugbelastung eines gesunden Muskels ertragen kann [51].

Dieser Studienlage entsprechend empfehlen aktuelle Reviews eine Ruhigstellung des Muskels innerhalb der ersten 2-3 Tage, und vorsichtige Bewegungen innerhalb schmerzfreier Grenzen in der ersten Woche nach einer Muskelverletzung [1, 2, 12, 45, 52].

Abhängig von Art und Lokalisation der Muskelverletzung können nach ungefähr 3 Tagen weitere Behandlungen mit aktiverer Patientenbeteiligung sinnvoll sein [53]. Dies entspricht einem Rehabilitationsprogramm, das nach aktuellen Empfehlungen aus folgenden Teilen besteht:

Begonnen wird das Programm mit isometrischen Übungen am regenerierenden Muskel innerhalb der persönlichen Schmerzgrenzen des Patienten. Das bedeutet, dass sich während der ausgeführten Übung nicht die Länge des Muskels selbst, sondern nur die Spannung in diesem verändert. Ist dabei ein gewisser Fortschritt erreicht worden, sollte mit isotonischen Übungen fortgefahren werden. Hierbei wird der Muskel zwar kontrahiert, jedoch wird die Muskelspannung konstant gehalten. Sobald sowohl isometrische als auch isotonische Übungen schmerzfrei ausgeführt werden können, kann mit einem isokinetischen, dynamischen Training begon-

nen werden. Bei all diesen Therapien ist es förderlich, im Voraus den Muskel durch geeignete Übungen zu erwärmen und zu dehnen [2].

3.5.2.2 Weitere mögliche Behandlungsansätze

3.5.2.2.1 Medikamentöse Therapie / NSAID

Momentan werden viele therapeutische Medikamente in der Behandlung von Muskelverletzungen genutzt. Zu diesen Medikamenten existieren, trotz ihres regelmäßigen Gebrauches im klinischen Alltag, nur wenige Studien, die einen sicheren Nutzen aufzeigen können. Zu den genutzten Medikamentenklassen gehören: Analgetika, nicht-steriodale, anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) und Kortikosteroide.

3.5.2.2.1.1 Analgetika

Im Tierversuch konnte keine Verbesserung der Regeneration oder Verminderung der Fibrosierung durch Analgetikagabe beobachtet werden. Es liegen unterschiedliche Meinungen und Ergebnisse über die Injektion von Lokalanästhetika (bspw. Procain) direkt ins verletzte Areal vor, obwohl Lokalanästhetika generell als myotoxisch angesehen werden [45, 54].

3.5.2.2.1.2 NSAIDs

Die NSAIDs gehören zu den bei Muskel- und Weichteilgewebsverletzungen am meisten genutzten Medikamenten. Ihr Wirkmechanismus besteht darin, das Enzym Cyclooxygenase zu inhibieren. Dadurch wird die Produktion der inflammatorisch wirksamen Prostaglandine aus Arachidonsäure blockiert. Einerseits ist es möglich, dass eine Abschwächung der inflammatorischen Antwort auf das Trauma durch verminderte Schmerzen und eine geringere Schwellung mit einem Benefit für die Muskelregeneration einhergeht [55, 56]. Andererseits kann diese inflammatorische Reaktion auch notwendig für die erfolgreiche Heilung eines Muskels sein.

Experimentell sind die unterschiedlichen Effekte der NSAIDs bereits relativ gut betrachtet worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von NSAIDs in der frühen Phase der Heilung zu einer geringeren Entzündungsreaktion führt, ohne negative Auswirkungen auf den Heilungsprozess, die Belastungsfähigkeit auf Zug oder die Kontraktionsfähigkeiten des Muskels zu haben [12, 57]. Hier sind für die Muskelheilung und diese Arbeit die Einflüsse von NSAIDs auf die Vorläuferzellen des Muskels von besonderem Interesse, diesbezüglich exis-

tiert momentan nur eine Studie. Thorsson et al. konnten zeigen, dass die Proliferation von Satellitenzellen bei einer Behandlung mit NSAIDs unbeeinflusst bleibt und dass es keine signifikanten Veränderungen in der Bildung von Muskelfasern oder Kapillaren gibt [58]. Die aktuelle Studienlage bleibt aber den sicheren Nachweis der Vorteile von NSAIDs schuldig. In einer Studie von Rahusen et al. wurde die Behandlung von zwei Tiergruppen bei Kontusions-trauma mit einem NSAID (Rofecoxib) oder einem Analgetikum ohne antiinflammatorische Eigenschaften (Acetaminophen) verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern festgestellt werden, weder für entzündliche noch für regenerative Veränderungen. Dies spricht für eine erneute kritische Evaluation des klinischen Nutzen von NSAIDs [59]. Im Hinblick auf die Behandlung von Muskelverletzungen bei Menschen finden sich wenige kontrollierte Studien. Einzig eine Studie konnte nachweisen, dass die orale Aufnahme von Diclofenac die Schädigung von Muskelgewebe bei exzessiver physikalischer Beanspruchung signifikant verringern kann [60].

Nach aktueller Studienlage gibt es wenig experimentell oder klinisch gesicherten Belege dafür, dass eine Therapie mit NSAIDs von Nutzen in der Behandlung von Muskeltraumata ist. Jedoch konnte gleichermaßen belegt werden, dass bei den momentan therapeutisch genutzten Mengen und Applikationswegen kein Schaden für den Patienten entsteht. Zudem kann der analgetische Effekt der NSAIDs als Vorteil angesehen werden.

3.5.2.2.1.3 Steroide

Obwohl Steroide früher häufiger in der Behandlung von Muskelverletzungen eingesetzt worden sind, können sie nach aktuellem Wissen als obsolet angesehen werden. Versuche haben gezeigt, dass Kortikosteroide die Regeneration in ihren frühen Phasen unterstützen können, auf längere Dauer aber irreversible Schäden im Muskelgewebe hervorrufen. Diese gehen mit einem verzögerten Abbau des nekrotischen Gewebes und des Hämatoms, mit einer veränderten Faserstruktur und schlussendlich mit einer verminderten biomechanischen Belastungsfähigkeit und Kontraktionskraft einher [12, 45, 61].

3.5.2.2.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind kleine Peptide, die an Rezeptoren der zellulären Plasmamembran binden und über verschiedene Signalwege das Wachstum und die Entwicklung von Zellen

beeinflussen. Von verschiedenen Geweben sezerniert, konnten mitogene und aktivierende Effekte der Wachstumsfaktoren sowohl auf Satellitenzellen, als auch auf Myoblasten nachgewiesen werden. Durch Wachstumsfaktoren werden Zellen des muskuloskeletalen Systems zur Sezernierung von Proteinen, zur Proliferation und darauffolgend zur Differenzierung angeregt [23, 52, 62, 63, 64]. Sie spielen somit eine bedeutende Rolle für die Muskelregeneration. Am ausführlichsten untersucht worden sind zum jetzigen Zeitpunkt IGF-I und IGF-II, welche für die embryonale und auch postnatale Entwicklung von essentieller Bedeutung sind [65]. Es wurde jedoch auch der positive Einfluss verschiedener anderen Faktoren wie NGF, b-FGF und G-CSF auf Myogenese und Muskelregeneration nachgewiesen [66].

Wenn der therapeutische Nutzen der Wachstumsfaktoren diskutiert wird muss bedacht werden, dass der stimulatorische Effekt der Wachstumsfaktoren nicht auf die Muskelzellen beschränkt ist, sondern diese auch auf Fibroblasten wirken. TGF- β wird bspw. als der größte Stimulator der Narbenbildung betrachtet [67]. Somit beschleunigen Wachstumsfaktoren neben der Regeneration des verletzten Muskels auch den kompetitiv ablaufenden Vorgang der Fibrosierung. Erste Studien haben hier vielversprechende Möglichkeiten aufzeigen können, Wachstumsfaktoren mit einem antifibrotischen Wirkstoff zu kombinieren, um so die Regeneration zu verbessern, und gleichzeitig der Narbenbildung entgegenzutreten. Sato et al. konnten in dieser Hinsicht bspw. sehr gute Ergebnisse mit der Kombination des Faktors IGF-I und Decornin, einem in der Literatur als antifibrotisch wirksam bekannten Proteins, erzielen [68].

3.5.2.2.3 Gentherapie

Das Prinzip des Gentransfers wird in unterschiedlichen klinischen Fachbereichen erforscht. Es beschreibt den Austausch genetischen Materials außerhalb der sexuellen Fortpflanzungswege. Eine Region der Spender-DNA, welche bspw. für ein Protein kodiert, das auf einen biologischen Prozess, hier die Muskelheilung, einen wünschenswerten Effekt ausübt, muss in die Empfänger-DNA integriert werden. Verschiedene Möglichkeiten dies zu bewerkstelligen werden momentan untersucht, beispielweise auf chemische Wege, mit Hilfe eines viralen Vektors oder durch direkte Injektion der DNA in die Zelle [69, 70]. Takahashi et al. ist es bspw. gelungen, Muskelzellen durch Gentransfer zu einer gesteigerten Ausschüttung des Wachstumsfaktors IGF-I zu bewegen. IGF-I ist bekannt für seine anabole Wirkung auf die Muskulatur. Im tierexperimentellen Traumamodell von Takahashi et al. konnte in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein größerer Durchmesser der Muskelfasern und eine erhöhte lokale IGF-I Konzentration nachgewiesen werden [71]. Aktivierte Muskelzellen in einem sich

regenerierenden Muskel produzieren eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen, welche einen großen Einfluss auf die Muskelheilung haben. Diese ergeben alle vielversprechende Ansatzpunkte für eine genetisch basierte Therapie. Jedoch ist die Forschung in diesem Punkte noch in ihrem Anfangsstadium, weitere Studien und Versuche müssen zeigen, ob die genetische Therapie in der Zukunft das halten kann, was sie verspricht.

3.5.2.2.4 Therapeutischer Ultraschall

Dieses Verfahren ist im klinischen Alltag zur Behandlung von Muskelverletzungen weitverbreitet. Verschiedene Studien konnten zwar eine signifikant erhöhte Satellitenzellproliferation und eine erhöhte Anzahl von Zellkernen der Myozyten nach einer Ultraschallbehandlung in verschiedenen Versuchsmodellen nachweisen. Keine der Studien konnte jedoch eine signifikante Veränderung in den von ihnen festgelegten Biomarkern und Messkriterien feststellen. Aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Beweise für den Nutzen von Ultraschallbehandlung wird die Einschätzung des therapeutischen Nutzens dieser Behandlung weiter von der persönlichen Meinung und der Erfahrung des behandelnden Arztes abhängen [72, 73, 74].

3.5.2.2.5 Hyperbare Sauerstofftherapie

Hyperbare Sauerstofftherapie (HBOT) bedeutet die therapeutische Verabreichung von 100% Sauerstoff bei Umgebungsdrücken, die den Atmosphärendruck um das Zwei- bis Dreifache übersteigen. Die HBOT wird innerhalb vielfältiger Indikationen, etwa bei Verbrennungen, bei problematischen Wundverläufen, CO-Intoxikationen, bei der Dekompensationskrankheit oder Osteomyelitis verwendet [75]. Die theoretische Basis für die Annahme, dass HBOT einen positiven Effekt auf die Muskelregeneration haben kann, beruht wie in Abschnitt 3.4.2.1 erwähnt, darauf, dass die Regeneration des verletzten Muskels in einer offensichtlichen Abhängigkeit von einer adäquaten Vaskularisierung bzw. einer adäquaten Versorgung mit Sauerstoff steht [50]. In einer experimentellen Studie konnte ein signifikanter Anstieg der Maximalkraft und der sich neubildenden Muskelfasern in einem myotoxisch traumatisierten Muskel nach HBOT nachgewiesen werden. Eine zweite tierexperimentelle Studie zeigte weiterhin, dass die HBOT in einer frühen Phase der Regeneration eine positive Auswirkung auf die Muskelheilung in einem dehnungstraumatischen Modell hat [76, 77]. Es sind momentan jedoch noch keine klinischen Daten verfügbar, aufgrund derer eine HBOT sicher empfohlen werden kann.

3.5.2.2.6 Weitere therapeutische Ansätze mittels humanogener Substanzen

Die in einem traumatisierten Muskel ablaufenden konkurrierenden Vorgänge der Regeneration und Fibrosierung bilden ein hochkomplexes System. Unzählige Signalkaskaden laufen simultan ab, überschneiden sich, und beeinflussen sich ständig als Reaktion und Gegenreaktion. Hier eröffnen sich selbstverständlich noch unzählige Möglichkeiten, in Abläufe auf humoraler, zellulärer oder Zytokinebene regulierend einzugreifen. So konnten Rotter et al. 2008 zeigen, dass Erythropoetin, ein Zytokin mit antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften, im Tierexperiment sowohl die Fibrosierung als auch die Regeneration eines traumatisierten Muskels positiv beeinflussen kann [78]. Derselbe wünschenswerte Effekt auf Fibrosierung und Regeneration konnte bspw. auch für Gamma-Interferon nachgewiesen werden [79]. In der Klasse der Hormone konnte in einer Studie mit Relaxin eine verminderte Narbenbildung und daraus resultierend eine verbesserte funktionelle Erholung eines traumatisierten Muskels bewirkt werden [80]. Wie bereits erwähnt ergeben sich hieraus noch lohnende Wege für die Forschung. Die nächsten Jahre müssen zeigen, welche Therapien sich durchsetzen.

3.5.2.3 Operativer Behandlungsansatz

Die operative Versorgung eines Muskeltraumas ist selten indiziert. Die meisten Muskelverletzungen können konservativ behandelt werden, da der Muskel über eine gute intrinsische Regenerationsfähigkeit verfügt, die meist zu einer effizienten Wiederherstellung führt [12]. Es gibt jedoch Situationen, die einen kompromittierenden Einfluss auf die funktionelle Erholung haben, und denen oft mit chirurgischen Mitteln begegnet werden kann.

Bei bestehenden Schmerzen (mehr als 4-6 Monate) und einem Bewegungsdefizit bei der Extension eines Muskels besteht der Verdacht auf Adhäsionen des Muskels mit dem umliegenden Gewebe. Dies kann besonders bei einer überschießenden Entzündungsreaktion der Fall sein, eine interventionelle Adhäsiolyse sollte in Betracht gezogen werden [2].

Ein weiterer Umstand, der zu chronischen Kontraktionseinschränkungen eines Muskels nach Trauma führen kann, ist eine Obstruktion durch die Bildung einer exzessiven Bindegewebsnarbe. Auf den Pathomechanismus dieser Reaktion wurde in vorangehenden Abschnitten bereits ausführlich eingegangen, eine Hauptursache dafür ist jedoch oft in einer übermäßig starken Hämatombildung zu sehen [40]. Diese findet häufig dann statt, wenn sich zwischen den

beidseitigen Muskelenden innerhalb der Verletzung eine außergewöhnlich große Lücke bilden konnte. In diesem Fall ist es möglich, die beiden Muskelstümpfe durch eine Naht näher aneinander zu bringen, und damit die Größe der Einblutung zu minimieren. Diese Art der chirurgischen Intervention ist nur bei schweren Fällen indiziert, wies hier allerdings Vorteile gegenüber einer konservativen Behandlung auf [81, 82]. Indikationen für eine chirurgische Intervention ergeben sich dementsprechend bei einem kompletten Abriss (Grad 3) eines Muskels ohne oder mit nur wenigen Agonisten oder bei Teilanrissen (Grad 2), bei denen mehr als die Hälfte des Muskelbauches eingerissen ist [12]. Es muss bei der Wiederherstellung darauf geachtet werden, dass mit den Nähten nicht das Muskelgewebe direkt, sondern die Muskelfaszien miteinander verbunden werden. Eine Naht innerhalb des Muskelgewebes findet aufgrund der vorherrschenden Faserstruktur keinen Wiederhalt, sondern fügt dem Gewebe noch zusätzlichen Schaden zu. Aufgrund der starken Faszie nahe des Muskel-Sehnen Übergangs verspricht hier eine chirurgische Reparatur bessere Ergebnisse als eine Rekonstruktion in der Mitte des Muskelbauchs [2]. Bei einem zeitlich weiter zurückliegenden Trauma mit bereits fortgeschrittener intramuskulärer Hämatombildung kann eine gründliche Ausräumung zusätzlich Vorteile für die Heilung bringen.

Ein weiterer Grund für eine chirurgische Annäherung der Muskelstümpfe ist, dass das distale Muskelende bei einem verhältnismäßig großen Abstand permanent denerviert und als Konsequenz atrophieren kann [11]. Die Chance der Reinnervation und damit eine Vermeidung einer permanenten Muskelatrophie wird durch die chirurgische Intervention verbessert [2, 82].

3.5.3 Stammzelltherapie

3.5.3.1 Stammzellen und mesenchymalen Stammzellen

Der menschliche Organismus ist der Verbund einer großen Anzahl Zellen, welche 1665 erstmals von Robert Hooke beschrieben wurden [83]. Jede dieser Zellen ist in ihrer Funktion hochspezialisiert und besitzt individuelle Fähigkeiten, Funktionen und Verantwortlichkeiten. Die Zellen müssen über die Lebensdauer des Individuums hinaus die Funktion des für sie spezifischen Gewebes gewährleisten, und in diesem durch Krankheit oder traumatische Ereignisse bedingte Schäden reparieren können. Hookes Aussage konnte in den 1850er Jahren von Rudolf Virchow dahingehend erweitert werden, dass jede Zelle durch Teilung aus einer vorbestehenden Zelle entsteht [83]. Diese Entwicklung des Organismus aus bereits bestehenden Zellen läuft nach einem komplexen Schema ab, in dessen Verlauf die Zellen ihre Differenzierungsmöglichkeiten in dem Maße einbüßen, in dem sie sich in einem zunehmend spe-

zialisiert werdenden Zellverbund auf eine Gewebeart festlegen und sich entsprechend differenzieren.

Die Entwicklung beginnt mit der Fusion der weiblichen Eizelle mit dem männlichen Spermium. Die aus der Fusion entstandene *Zygote* ist noch *totipotent*, d. h. ihr Differenzierungspotential ist noch vollständig vorhanden. Durch Proliferation entsteht darauf die *Morula*, daraus dann der *Blastocyst*, bestehend aus *Trophoblast* und einer *innen liegenden Zellmasse*. Aus dem Trophoblasten bildet sich im weiteren Verlauf der embryonale Teil der Plazenta, Teile der innen liegenden Zellen differenzieren über den *Epiblast* zu *Endoderm*, *Ektoderm* und *Mesoderm*. Ab diesem Zeitpunkt sind die Zellen soweit in ihrer zukünftigen Entwicklung festgelegt, dass sie als *pluripotent* bezeichnet werden. Hier lässt es sich vereinfacht sagen, dass das Entoderm später einen großen Teil der inneren Organe wie bspw. den Gastrointestinaltrakt und die Lunge bildet, das Ektoderm sich zu Haut mit Anhangsgebilden (Haare, Nägel, etc.), sowie zum zentralen und peripheren Nervensystem entwickelt. Aus dem Mesoderm entwickeln sich neben dem Urogenitaltrakt die Zellreihen, aus denen in Zukunft Bindegewebe, Muskeln und Knochen entstehen. In weiteren Runden der Proliferation und Differenzierung zu ihrem Endzustand hin verlieren Vorläuferzellen weitere Differenzierungsmöglichkeiten und werden je nach Reife als *multipotente*, *tripotente*, *bipotente* oder *unipotente* Vorläuferzellen oder Stammzellen bezeichnet [84].

Jede Zelle des Körpers hat eine genetisch determinierte für sie spezifische Lebenszeit und stirbt zu einem vorhersagbaren Zeitpunkt. Erleidet ein Individuum eine Krankheit, gehen einige Zellen des Organismus bereits vor deren determinierter Zeit im Verlaufe dieser Erkrankung zugrunde. Geschieht dies und eine Zelle stirbt, tritt umgehend eine neue Zelle an ihre Stelle, um die weitere Funktion des Gewebes zu gewährleisten. Aufgrund dieses Umsatzes benötigt der Organismus ständig einen Pool an Zellen in Reserve [30]. Obwohl ein Großteil der Zellen alle Stadien der Entwicklung bis hin zu einer endgültig differenzierten Zelle durchläuft, verlassen ein paar Zellen diese Kontinuität und verharren in ihrem momentanen Entwicklungsstand um multipotente Reservezellen zu werden. Diese Reservezellen kommen in fast jedem Gewebe vor und wurden bspw. im Muskel 1961 erstmals von Mauro et al. als Satellitenzellen beschrieben [85]. Sie konnten inzwischen unter anderem auch in der Haut, im Blut, in den Wänden des Gastrointestinaltraktes und der Leber nachgewiesen werden [86]. Um Differenzierung und Proliferation regulieren zu können, befindet sich jede ruhende Stammzelle in ihrer speziellen Nische. Innerhalb dieses definierten Umfeldes bleiben die

Stammzellen mitotisch untätig, und beginnen erst nach Verlassen dieser Nische mit asymmetrischen Teilungen [87].

Eine weitere Art der Vorläuferzellen, die hauptsächlich in Bindegeweben zu finden ist, jedoch unter anderem auch aus Nabelschnurblut, der Leber, der Plazenta, der Zahnpulpa und dem Knochenmark isoliert werden konnte, wird *Mesenchymale Stammzelle* (MSC) genannt [88]. Diese Zellreihe ist *multipotent*, und ist durch das Potential zu *Adipogenese*, *Chondrogenese*, *Fibrogenese*, *Osteogenese* und *Myogenese* definiert [89]. Desweiteren zeichnen MSCs sich durch ihre Neigung aus, *in-vitro* an Plastikoberflächen wie z.B. in Kulturflaschen zu adhären. Als Definitionskriterium eines Zelltyps in der Literatur angegeben ist das Schema ihrer Oberflächenmarker. Dies ist stark von den Einflüssen aus der Umgebung der Zelle abhängig. *In-vivo* beeinflussen direkte Zellkontakte, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone etc. das Muster ihrer Zellmarker, *in-vitro* ist dieses bspw. von der Zusammensetzung des Kulturmediums, der Homogenität der Zellmasse, der Zeit der Zellen in Kultur und der Häufigkeit des Medienwechsels abhängig. Somit kann man davon ausgehen, dass die meisten Arbeitsgruppen mit geringfügig unterschiedlichen Zellen arbeiten [90]. Um diesem Problem zu begegnen, hat die „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ Minimalkriterien für die Definition von MSCs vorgeschlagen [91]. Drei Hauptkriterien wurden von der ISCT eingeführt, um MSCs zu definieren:

- Die Zellen müssen unter normalen Kulturbedingungen an Plastikoberflächen adhären.
- Bei einer Flow-Cytometrie Messung müssen mehr als 95% der Zellen für folgende Oberflächenmarker positiv sein: CD73, CD90, CD105, und mehr als 98% der Zellen negativ sein für: CD45, CD34, entweder CD11b oder CD14, entweder CD19 oder CD79a und HLA Klasse 2 Oberflächenmarker.
- MSCs müssen in der Lage sein, zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren, wenn sie in dem dafür notwendigen Medium kultiviert werden.

Kürzlich wurde zusätzlich von CD271 und CD140b als spezifische Marker der dem Knochenmark entstammenden MSCs berichtet [88, 92].

3.5.3.2 Aktueller Einsatz von MSCs in Forschung und Klinik

3.5.3.2.1 Gewinnung von MSCs

Für den Einsatz in der Forschung und der klinischen Therapie bieten sich MSCs aus verschiedenen Gründen an. Sie bieten aufgrund ihres Vorkommens in fast sämtlichen Geweben des Körpers und den relativ einfachen und sicheren Möglichkeiten der Gewinnung und der Isolierung eine ethisch akzeptable Quelle für Stammzellen. Sie können von einem geübten Arzt in einem kurzen Verfahren unter Lokalanästhesie aus dem Beckenkamm (*Crista iliaca*) gewonnen werden, in Nagetieren ist eine Entnahme aus der Tibia oder anderen langen Röhrenknochen leicht durchführbar [31, 93]. Ausgehend von den Daten von Spitkovsky et al, in denen eine Häufigkeit von 1 MSC pro 10000 kernhaltigen Zellen im Knochenmark, zwischen 2,25 - 22 Millionen kernhaltigen Zellen / ml Knochenmark (abhängig von Individuum und Biopsiegüte) und einer durchschnittlichen Gewinnung von 40 ml Aspirat pro Marksbiopsie genannt wird, ist eine suffiziente Anzahl an Zellen mit einer einzigen Biopsie erreichbar [94, 95, 96]. Caplan et al. konnte zeigen, dass die Frequenz des Vorkommens von Stammzellen im Gewebe mit dem Alter abnimmt, mit 1 MSC pro 500 000 Zellen bei 50 jährigen Probanden [30]. Bei einer unter optimalen Bedingungen möglichen 50-fachen Verdopplung der Zellpopulation in vitro mit Hilfe eines geeigneten Expansionprotokolls ist immer noch eine ausreichende Zellgewinnung gewährleistet [95, 97]. Bei einer Erfolgsrate der MSC-Isolation von 100 % durch eine korrekt durchgeführte Knochenmarkbiopsie und guten Alternativen in Nabelschnurblut mit einer Erfolgsrate von 63 % oder der Gewinnung aus dem Fettgewebe besitzt man hervorragende Verfahren zur MSC Gewinnung [98].

3.5.3.2.1 Isolation und Kultur von MSCs

Ein standardisiertes Protokoll für die Isolation und Expansion von MSCs ist bis jetzt noch nicht existent. Bei der Arbeit mit MSCs nutzen viele Labore eigene Protokolle. Dementsprechend decken sich die Beobachtungen eines Labors oft nicht mit denen eines anderen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche Zellisolutionsprotokolle einen großen Einfluss auf die Aktivität der dem Knochenmark entstammenden Vorläuferzellen haben und die Ergebnisse von Studien beeinflussen können [99]. Von Friedenstein et al. zuerst beschrieben, basiert die Isolation von MSCs aus dem Knochenmark traditionell auf einer Trennung der mononuklearen Zellen des Knochenmarks anhand eines einfachen Dichtegradienten, in dem MSCs der Fraktion mit einer geringen Dichte angehören. Weiterhin besitzt die mesenchymale Subfrakti-

on eine selektive Fähigkeit zu Adhäsion an Plastikoberflächen und ist somit auch auf diese Weise leicht von den nichthaftenden hämatopoetischen Zellen zu trennen [100].

Um eine Akzeptanz der Stammzelltransplantation bei Ärzten und Patienten zu erreichen, setzt die für die Gewinnung von für klinische Nutzung ausreichenden Quantitäten an MSCs notwendige *in-vitro* Expansion strikte Regulationen bezüglich der Sicherheit voraus. Verschiedene Gesichtspunkte bezüglich der Sicherheit werden in der Diskussion erläutert.

3.5.3.2.2 MSCs im Tiermodell und in klinischen Versuchen

Das Verhalten von MSCs wurde bereits in verschiedenen präklinischen Versuchsreihen in großen und kleinen Tieren untersucht. Diese Studien konnten zeigen, dass MSCs neben der Fähigkeit zur Differenzierung zu Abkömmlingen der mesodermalen Zellreihe auch in der Lage sind, Zellen anderer Zellreihen zu bilden. Studien konnten die Differenzierung zu Kardiomyozyten, Hepatozyten, Pankreaszellen und Epidermis-ähnlichen Zellen nachweisen. Diskutiert wird jedoch, ob MSCs *in-vivo* wirklich in diese Zellreihen differenzieren, oder eher mit bereits differenzierten Zellen fusionieren [96].

Vassilopoulos et al. konnten in einem Mausmodell bei einem Gendefekt der Leberzellen durch Knochenmarktransplantation eine normale Leberfunktion wiederherstellen. Die funktionellen Hepatozyten exprimierten als Zeichen für Zellfusionen sowohl Gene des Spenders wie auch des Empfängers [101]. *In-vivo* konnten Sato et al. die unmittelbare Differenzierung ohne Fusionsereignisse von humanen MSCs zu Hepatocysten transplantiert in eine mit Allylalkohol behandelte Rattenleber aufzeigen [102].

Mehrere präklinische Tierversuche konnten die Effekte der Nutzung von MSCs in der Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten demonstrieren. Große Knochendefekte konnten von Quarto et al. durch die Injektion von *ex-vivo* kultivierten autologen MSCs behandelt werden [103]. Zusätzlich scheint die Implantation von autologen Knochenmarkszellen in nekrotische Läsionen des Femurkopfs bei der Behandlung von Osteonekrose von Vorteil zu sein [104]. Allogene MSCs wurden genutzt, um skeletale Defekte in Kindern mit *Osteogenesis imperfecta* (OI) zu reparieren. OI wird von einem Defekt des Genes verursacht, welches für Kollagen Typ 1 kodiert. In fünf von sechs Fällen wurde ein Anwachsen von MSCs an einer oder mehreren Lokationen beobachtet, und eine Verbesserung der Knochendichte sowie der Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb eines sechsmonatigen Follow-Ups berichtet [105]. Ein weiterer interessanter aktueller Ansatz für die Zelltherapie der OI wurde durch *in-utero* Trans-

plantation von allogenen, fetalen MSCs in einen weibliche Fötus mit multiplen intrauterinen Frakturen in der 32. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Im Alter von neun Monaten konnte bei dem Patienten ein Einwachsen der Spenderzellen sowie eine gesteigerte Knochenmineralisation festgestellt werden [106].

Aufgrund ihrer immunomodulatorischen Wirkung sind MSCs interessant in der Behandlung der Graft-versus-Host (GvHD) Reaktion, einer lebensbedrohlichen Erkrankung nach Transplantation von allogenen, hämatopoetischen Stammzellen. Mehrere Studien konnten vielversprechende Ergebnisse aufzeigen. Eindrücklich ist bspw. eine 2008 in Lancet veröffentlichte Studie. In dieser Phase II Studie wurden 55 an steroid-resistenter, schwerer, akuter GvHD erkrankte Patienten mit MSCs behandelt. 30 Patienten zeigten eine komplette Heilung, 9 Patienten eine Besserung der Symptome. Bei keinem der Patienten wurden unerwünschte Nebeneffekte während oder direkt nach der Infusion beobachtet [107]. Verschiedene Einsatzgebiete ergeben sich hier in der Nutzung von MSCs, etwa bei Organtransplantationen oder der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Es wird momentan bspw. die Behandlung von Morbus Crohn mittels humaner MSCs untersucht [108].

Die Fähigkeiten von MSCs wurden in zahlreichen weiteren klinischen Bereichen unter Beweis gestellt. Der Nachweis wurde erbracht, dass die Regeneration des Dünndarmepithels nach einer strahleninduzierten Schädigung durch die Transplantation von humanen MSCs in immuntolerante NOD/SCID Mäuse unterstützt werden kann [109]. In die linke Nierenarterie injizierte MSCs konnten in einem Versuchsaufbau von Kunter et al. mit Ratten und Mäusen zwei Tage und vier Tage nach induziertem, akutem Nierenversagen eine verringerte Mesangiolyse und einen Anstieg der glomerulären Zellproliferation bewirken [110]. In der Neurologie werden regenerativen Eigenschaften bei unterschiedlichen Diagnosen, etwa neurodegenerativen Erkrankungen, bei Parkinson und ischämischen Gehirnschädigungen im Tiermodell untersucht. Positive Einflüsse konnten aufgezeigt werden [111]. Die Sicherheit und Effizienz einer autologen intravenösen MSC Transfusion wurde von Bang et al. bei fünf Patienten nach einem ischämischen Schlaganfall evaluiert. Das klinische Outcome der MSC-Gruppe hatte sich während eines zwölfmonatigem Follow-Ups im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert, es wurden keine zellabhängigen, unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt [112].

3.5.3.2.3 Wirkung von MSCs auf Myozyten bzw. Traumata in Muskelgewebe

Die Möglichkeit einer Unterstützung von Muskelregeneration durch MSCs und anderen Vorläuferzellen des muskulären Gewebes ist von großem Interesse und wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen exploriert. Die potentielle Nutzung von Vorläuferzellen zu Behandlung von Muskeldystrophien, insbesondere vom Typ Duchenne, hat zu frühen grundlegenden Untersuchungen der Effekte von Zelltransplantation auf Muskeln geführt. Muskeldystrophie vom Typ Duchenne ist eine x-chromosomale, rezessiv vererbte Erkrankung, die durch mangelnde Expression des Proteins Dystrophin am Sarkolemm des Muskels hervorgerufen wird. Mehrere große Studien konnten bereits die Durchführbarkeit von Zelltransplantationen bei Muskeldystrophie nachweisen, weiterführende Studien konnten zeigen, dass skeletale Myoblasten fähig waren, nach Transplantation in einen Muskel mit Mangel an Dystrophin, mit Muskelfasern zu fusionieren, und dort erneut Dystrophin zu bilden [113, 114].

Schon 1997 konnte von Irintchev et al. ein positiver Einfluss auf die Muskelregeneration durch Transplantation von Myoblasten nachgewiesen werden. Es konnte die tetanische Kontraktionskraft nach einem schweren Cryotrauma durch die Implantation von 10^6 Myoblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als verdoppelt werden [115]. Ähnlich gute Ergebnisse konnten DeRosimo et al. nach Injektion von Myoblasten in einen orthotop transplantierten *Musculus extensor digitorum longus* in Mäusen erzielen. Die absoluten fast-twitch (FT) und tetanischen Kräfte der regenerierenden Muskeln konnten um 65% bzw. 74% verbessert werden [116].

Der größte Teil der aktuellen Studien zum Verhalten von MSCs im Muskel kommt aus dem kardiovaskulären Umfeld. Tierversuche der MSC-Transplantation bei Herzinfarktmodellen und ischämischer Kardiomyopathie konnten hier weitreichende Wirkungen erzeugen. Dazu gehören die Verminderung der kardialen Infarkt- und Narbengröße, die Verbesserung der ventrikulären Funktion und eine Steigerung der Gefäßdichte und myokardialen Perfusion [117, 118, 119, 120].

Weiterhin konnten Matziolis et al. zeigen, dass die Transplantation aus dem Knochenmark gewonnener Vorläuferzellen durch Injektion in einen stumpf traumatisierten Muskel zu einer Verbesserung der Regeneration führt. Nach drei Wochen konnten mit MSCs behandelte Muskeln einen um 14 % größeren Anteil der im kontralateralen gesunden Muskel gemessenen Kraft bei tetanischer Kontraktion und um 13 % mehr Kraft bei FT-Kontraktion im Vergleich

zur unbehandelten Kontrollgruppe erreichen [121]. Eine vorausgegangene Studie unserer Gruppe hat die Beziehung zwischen der Menge der transplantierten Zellen und den daraus resultierenden Muskelkräften nach Regeneration exploriert. Es wurden Sprague-Dawley Ratten nach stumpfem Muskeltrauma lokal zwischen $0,1 \times 10^6$ und 10×10^6 autologe MSCs injiziert. Es konnte neben der Wirksamkeit der Stammzelltransplantation ein logarithmisches Verhältnis von Dosis zu Muskelregeneration festgestellt werden, sowohl für tetanische, als auch für FT-Kontraktionen, mit der deutlichsten Kraftsteigerung bei einer Dosis von 10×10^6 Zellen [31].

3.6 Hypothesen und Zielsetzung der Dissertation

Die Orthopädie und Traumatologie stellen interessante Anwendungsgebiete für Transplantationsverfahren von mesenchymalen Stammzellen dar. Hier bedingen operative Interventionen Muskeltraumata verschiedenen Ausmaßes. Chirurgische Eingriffe können hierbei durch eine eingeschränkte Regeneration des dabei verletzten Muskelgewebes eine verminderte postoperative Funktion der zugehörigen Extremität verursachen. Als gutes Beispiel dient der künstliche Hüftersatz. Im Jahr 2007 wurden allein in den USA 402060 Patienten mit Endoprothesen des Hüftgelenks versorgt, wobei mehr als die Hälfte dieser Patienten 65 Jahre oder älter waren [122]. Bei einem aktuell bereits sehr großen Patientenkollektiv ist davon auszugehen, dass das Volumen der notwendigen Eingriffe weiterhin ansteigt, und die Indikation zur Operation bei immer jünger werdenden Patienten gestellt werden wird. Ein Anhalten der momentanen Entwicklung würde dazu führen, dass im Jahr 2030 die jungen Patienten unter 65 Jahren mehr als 52 % der Patienten ausmachen würden [123]. Besonders bei einem jungen und aktiven Patientenkollektiv ist eine Optimierung des Regenerationsverlaufs unbedingt erstrebenswert, die Unterstützung der Regeneration durch eine Stammzelltransplantation bietet dazu eine vielversprechende Möglichkeit.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige kontrollierte, klinische Studien mit MSCs an Patienten. Um das gesamte therapeutische Potential von MSCs untersuchen zu können, muss von derzeitigen und zukünftigen Studien gefordert werden, sorgfältig Kernpunkte bezüglich der Transplantation von MSCs zu bestimmen und diese zu klären. Zu den zu klärenden Punkten gehören der Vergleich der Vor- und Nachteile verschiedener Stammzellpopulationen, die Evaluation der optimalen Zelldosis, der geeigneten Art der Transplantation, der geeigneten Patientenkohorten bzw. der Indikationen für die Transplantation und ein Nachweis der Sicherheit von Zelltransplantation über einen längeren Zeitraum. Aufgrund der möglichen zu-

künftigen Bedeutung dieses Therapieverfahrens, sind diese Fragen momentan sicherlich Gegenstand der Betrachtung vieler Arbeitsgruppen weltweit. So wurde in einer ersten Studie an Patienten mit erhöhtem Risiko für ein akutes Nierenversagen nach einem herzchirurgischen Eingriff ein Anstieg unerwünschter Nebenwirkungen durch die Transplantation beobachtet [124]. Nachdem die Frage der geeigneten Dosis wie in 3.5.3.2.3 erwähnt bereits durch Arbeiten unserer Gruppe bearbeitet wurde, und andere Aspekte wie die bestmögliche Art der Transplantation von dieser aktuell verfolgt werden, hat sich diese Dissertation mit einem weiteren wichtigen Punkt für die Nutzung dieser Therapieoption beschäftigt. Von essentieller Bedeutung ist die Abwägung eines optimalen Zeitpunkts für die Transplantation der Zellen. Nach momentanem Wissensstand können hierzu noch keine Empfehlungen ausgesprochen werden. Im Bereich der Kardiologie, in der wie bereits erwähnt die meisten Studien zum Thema MSC-Transplantation durchgeführt wurden, reichen die gewählten Zeitpunkte der Transplantation von direkt auf einen Infarkt folgend bis zu drei Wochen verzögert [117, 125].

Der in den Vorarbeiten unserer Gruppe gewählte Transplantationszeitpunkt eine Woche nach Trauma beruhte auf der Annahme, dass transplantierte MSCs in der initialen Entzündungsphase bei einer hohen Präsenz von Makrophagen möglicherweise als Fremdzellen wahrgenommen und entfernt werden [12]. Verschiedene aktuelle Studien stellen jedoch zunehmend immunomodulatorische, parakrine und trophische Eigenschaften als ursächlich für positive Effekte der MSCs auf die Muskelregeneration dar [126, 127]. In diesem Zusammenhang gesehen wäre es sinnvoll, sich diesen Effekt zeitnah zum Trauma während der inflammatorischen Phase der Muskelregeneration zunutze zu machen. Eine dem Trauma sofort folgende Transplantation der Zellen könnte dies erreichen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses verschiedener Transplantationszeitpunkte von autologen, mesenchymalen Stammzellen in einen verletzten Muskel auf die funktionelle Muskelregeneration. Hierzu wird der Effekt einer lokalen Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in direkter Folge auf ein schweres Muskeltrauma mit dem Effekt einer verzögerten Transplantation mesenchymaler Stammzellen verglichen.

Um hierzu eine Aussage treffen zu können, setzt sich diese Arbeit folgende aufeinander aufbauende Ziele:

1. Der Nachweis der adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit der mit dem in dieser Arbeit genutzten Biopsieverfahren gewonnenen mesenchymalen Stammzellen, um den Nachweis einer Multipotenz der Zellen zu erbringen und um Kriterien der ISCT gerecht zu werden.
2. Der Nachweis von einem Einfluss eines Traumas auf die Muskelkraft.
3. Der Nachweis von einem Einfluss der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen auf die funktionelle Regeneration.
4. Die Betrachtung des Einflusses unterschiedlicher Transplantationszeitpunkte auf die funktionelle Regeneration.
5. Die Beobachtung des Einflusses der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen auf biomechanische Fähigkeiten der Muskulatur.

Daraus ergebend werden folgende Hypothesen gestellt:

Die primäre Hypothese lautet:

Eine direkt auf das Muskeltrauma folgende Transplantation von mesenchymalen Stammzellen ist einer verzögerten Transplantation in Bezug auf die Muskelregeneration unterlegen.

Die erste Sekundärhypothese lautet:

Eine Transplantation von mesenchymalen Stammzellen eine Woche nach einem Muskeltrauma bewirkt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Steigerung der Kontraktionskraft.

Die zweite Sekundärhypothese lautet:

Eine Transplantation von mesenchymalen Stammzellen unmittelbar auf ein Muskeltrauma folgend bewirkt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Steigerung der Kontraktionskraft.

4 Material und Methoden

4.1 In vivo

4.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Albino Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzbach, Deutschland) verwendet. Die Versuchsreihen unterlagen den 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 290-09). Das Alter der Tiere betrug zu Beginn der Versuche 5 Wochen mit einem Gewicht der Tiere von 140 – 160 g. Die Tiere wurden in Gruppen zu fünf bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gehalten, mit freiem Zugang zu Wasser und Futterpellets. Gehalten wurden die Tiere in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Forum 4, Augustenburgerplatz 1, 13353 Berlin.

4.1.2 Versuchstiergruppen und Versuchsverlauf

Für den Versuchsaufbau wurden 27 Tiere benötigt, die in drei Gruppen (n = 9 Tiere) aufgeteilt wurden. Zur Bewertung der verschiedenen Transplantationszeitpunkte wurden eine direkt auf das Trauma folgende mit einer um eine Woche versetzten Transplantation verglichen. Beide Gruppen erhielten jeweils 2×10^6 MSCs in den verletzten Muskel injiziert, zum Zeitpunkt der Transplantation der Vergleichsgruppe wurden ihnen 20 µl physiologische Kochsalzlösung verabreicht. Dazu kam eine Kontrollgruppe, die jeweils zu beiden Zeitpunkten eine physiologische Kochsalzlösung injiziert bekam.

	Tag 0	Tag 14	Tag 21	Tag 42
Gruppe 1 (n=9)	Biopsie	Trauma / Trans- plantation 2 x 10 ⁶ MSCs	Injektion NaCl	Muskelkraftmessung
Gruppe 2 (n=9)	Biopsie	Trauma / Injek- tion NaCl	Transplantation 2 x 10 ⁶ MSCs	Muskelkraftmessung
Kontrolle (n=9)	Biopsie	Trauma / Injek- tion NaCl	Injektion NaCl	Muskelkraftmessung

Tabelle 1: Verteilung der Ratten auf die Versuchsgruppen mit Angabe des Versuchsprotokoll im zeitlichen Verlauf.

4.1.3 Biopsie

An allen 27 Tieren wurde zur Stammzellgewinnung an Tag null an beiden Tibiae eine Knochenmarksbiopsie durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte mittels Isofluran (Flow 2 %) und N₂O/O₂ als Inhalationsnarkose. Zur Schmerztherapie erhielten die Tiere vor Beginn der Operation und 24 Stunden nach dem Eingriff eine subkutane Analgesie mit 5 mg/kg KG Rimadyl (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere auf den Rücken gelagert, und beide Beine ventral mit einer Schermaschine (Favorita II, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) geschoren. Der gesamte Operationsbereich wurde mit der antiseptischen Lösung Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert.

Nachdem das *Ligamentum patellae* und die *Tuberositas tibiae* lokalsiert waren, erfolgte eine ca. 7 mm lange Inzision medial des *Lig. patellae*. Vorsichtig konnte nun das *Lig. patellae* dargestellt, und das mediale Periost der *Tibia* abgeschabt werden. Zur darauffolgenden Bohrung wurde der Handbohrer mit dem Durchmesser 2 mm (Krick, Knittlingen, Deutschland) auf Höhe der *Tuberositas tibiae* unter moderatem Druck aufgesetzt und die *Korticalis* perforiert.

Eine Spritze mit einer Kanüle (Durchmesser 18g) wurde in den Markraum der *Tibia* vorgeschoben und das Knochenmark aspiriert. Die Kanüle wurde mit dem größtmöglichen in den Markraum passenden Querschnitt gewählt, um die Aspirations- und Scherkräfte an den Knochenmarkszellen gering zu halten.

Die Zellen wurden unter Wahrung der Sterilität in einen vorbereiteten 50 ml Falcon-Tube (Centrifuge And Test Tube 50 ml Produkt Nummer: 3502070, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt. Dieser war mit 10ml Kulturmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin (P / S), Sigma, Hamburg, Deutschland) gefüllt. Besonders wurde darauf geachtet, dass aufgrund mehrmaligen Aspirierens des Mediums in die Spritze das Knochenmark vollständig aus der Spritze entfernt werden konnte und somit keine Zellen verloren gingen. Im Anschluss darauf wurde die Knochenmarksaspiration ein zweites Mal durchgeführt, um sicherzustellen, einen größtmöglichen Teil des Knochenmarks zu gewinnen. Nach Spülung mit NaCL-Lösung wurde die Haut mit einer fortlaufenden Naht spannungsfrei verschlossen (Vicryl 3-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Die erläuterte Prozedur wurde am zweiten Bein der Versuchstiere wiederholt.

Zudem wurden die Tiere zur späteren Zuordnung mittels eines wasserfesten Markers am Schwanz in durchlaufenden Nummern markiert.

Unmittelbar nach der Biopsie wurden die Zellen bis zur Aussaat gekühlt bei einer Temperatur von 4-6 °C gelagert, um den zelleigenen Metabolismus auf ein Minimum zu senken. Die Aussaat der Zellen in die Kultur fand unter einer sterilen Bench (Holten Laminair, Allerod, Dänemark) statt. Die Kulturflaschen der Größe 175cm² (SoLo Flasks, Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit weiteren 20 ml Medium gefüllt, die Gesamtmenge Medium in den Flaschen betrug 30 ml.

Zur weiteren Züchtung der Zellen wurden diese in einem CO₂-Inkubator (CB 150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert.

4.1.4 Traumatisierung

14 Tage nach der Knochenmarksbiopsie wurde an den Versuchstieren ein stumpfes Trauma gesetzt. Nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Modell wurde als Zielmuskel des Traumas der *Musculus soleus* gewählt. Anästhesie und Analgesie erfolgten wie unter 4.1.3 beschrieben.

Das Versuchstier wurde auf dem Bauch gelagert, und das linke Bein großzügig geschoren und desinfiziert. Ein Hautschnitt wurde über die Länge von 1,5 cm gesetzt, lokalisiert lateral der Achillessehne am lateralen Rand des Bauches des *M. gastrocnemicus*. Im nächsten Schritt wurde der Hautmuskel durchtrennt. Der daraufhin sichtbar werdende *M. gastrocnemicus* wurde freipräpariert und danach vorsichtig der darunterliegende *M. soleus* von lateral in seiner

ganzen Länge dargestellt. Besondere Sorgfalt wurde darauf gelegt, das Gefäß-Nerven-Bündel nicht zu verletzen, welches dem *M. soleus* etwa in seiner Mitte zuläuft.

Insgesamt wurden von medial auf den *M. gastrocnemicus* fünf stumpfe Traumata gesetzt. Hierzu wurde eine Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) genutzt, deren Enden mit dem Stück Polyethylenschlauch geschützt waren, um scharfe Verletzungen der Faszie zu vermeiden.

Das erste Quetschungstrauma wurde knapp über der Achillessehne gesetzt. Um eine Standardisierung zu erreichen, geschah die Quetschung mittig der beiden Klemmbacken, die Klemme wurde dafür für jeweils 20 Sekunden auf der 3. Raste geschlossen. Die Klemme erzielt in dieser Stellung eine Kraft von 112 ± 5 N (Zwick, Materialtestungsmaschine, Ulm, Deutschland). Das zweite Quetschungstrauma wurde kranial zum ersten Quetschungstrauma gesetzt, ebenso das dritte Trauma. Kranial des Gefäß-Nervenbündels wurden die weiteren zwei Quetschungen gesetzt. Im Anschluss wurde zuerst der Hautmuskel mit einer fortlaufenden Naht (Vicryl 3-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen, daraufhin ebenso die Haut des Versuchstieres.

4.1.5 Zelltransplantation

Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben vorbereitet.

Die Anästhesie und Analgesie erfolgte wie unter 4.1.3 beschrieben.

Das Versuchstier wurde auf dem Bauch gelagert und das linke Bein geschoren. Nach der Desinfektion wurde ein Hautschnitt 3 mm über dem *Calcaneus* über ca. 1 cm nach proximal auf dem *M. gastrocnemicus* gesetzt. Der darunterliegende Hautmuskel wurde durchtrennt, der *M. gastrocnemicus* und *M. soleus* aufgesucht und dargestellt. Die Nadel (Norm-Ject, HSW, Tuttlingen, Deutschland) mit einem Durchmesser von 25 G wurde nahe dem Beginn der Achillessehne im Verlauf des Muskels eingeführt. Nach sicherer Lage der Nadelspitze im *M. soleus* wurde die Zellsuspension vorsichtig ohne die Lage der Nadel zu verändern appliziert. Nachdem keine Zellsuspension mehr im Nadelkonus sichtbar war, wurden noch fünf Minuten abgewartet, damit das Gewebe dem Volumendruck nachgeben konnte. Nach dem Entfernen der Nadel wurden der Hautmuskel und die Haut wie unter 4.1.3 beschrieben verschlossen.

4.1.6 Kraftmessung

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte mittels gewichtsadaptierter, intraperitonealer Injektion von Ketamin (50mg/ml) und Medetomidin (1mg/ml) (Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) gemäß dem Mischungsverhältnis Ketamin : Medetomidin von 4 : 1 nach der initialen Isoflurannarkose. Nach erfolgter Anästhesie wurde der *M. soleus* unter Erhalt der umgebenden Strukturen freipräpariert. Besonders auf das Trennen sämtlicher Adhärenzen auf der traumatisierten Seite des Tieres wurde sehr großer Wert gelegt, um eine möglichst ungestörte Kontraktion des Muskels während der Messung zu ermöglichen. Die Achillessehne wurde möglichst nah an ihrem Ansatz am *Tuber calcanei* abgetrennt. Von ihr wurde auch der zusätzlich ansetzende *M. gastrocnemicus* entfernt. Sie wurde mittels einem Faden Vicryl 3-0 mit dem Kraftmesser verbunden. Weiter proximal am untersuchten Bein wurde der *N. ischiadicus* freigelegt, über den später die Kontraktion des *M. soleus* ausgelöst wurde.

Nach Abschluss dieser Vorbereitung wurde das Versuchstier zur Kraftmessung in die dafür entwickelte Messanlage gelegt. Fixiert wurde die Ratte in Höhe des Knies, und der zuvor angebrachte Faden an der Achillessehne mit dem Kraftabnehmer verbunden. Am *N. ischiadicus* wurde eine Elektrode als Impulsgeber angesetzt. Gemessen wurden schnellablaufende (FT) Kontraktionen und andauernde (tetanische) Maximalkontraktionen. Zur standardisierten Messung wurde ein automatisiert ablaufendes Stimulationsprogramm (Visual Basic, Version 8, Microsoft, Redmond, Washington, USA) benutzt. Es war nicht durch den Untersuchenden zu beeinflussen.

Folgendes Protokoll wurde durch dieses Programm ausgeführt:

Die Vorspannung des Muskels wurde auf 0.15 N festgestellt, dieser Wert wurde in Vorexperimenten festgestellt und stellt die optimale Vorspannung für die größtmögliche resultierende Kontraktionskraft dar.

Sechs Stimulationen mit einer Stromstärke von 9 mA / 75 Hz über 0,01 Sekunden folgten in 5 Sekunden Intervallen im FT-Modus.

Die maximale Muskelkraft wurde in tetanischen Kontraktionen durch sechsmalige Stimulation des *N. ischiadicus* mit 9 mA / 75 Hz über 3 Sekunden mit Pausenintervallen von fünf Sekunden aufgezeichnet.

Erst wurde das rechte, nicht-traumatisierte Bein gemessen, danach die linke, traumatisierte Extremität. Am Ende der Untersuchungen wurden die Tiere durch intrakardiale Injektion von Kalium euthanisiert.

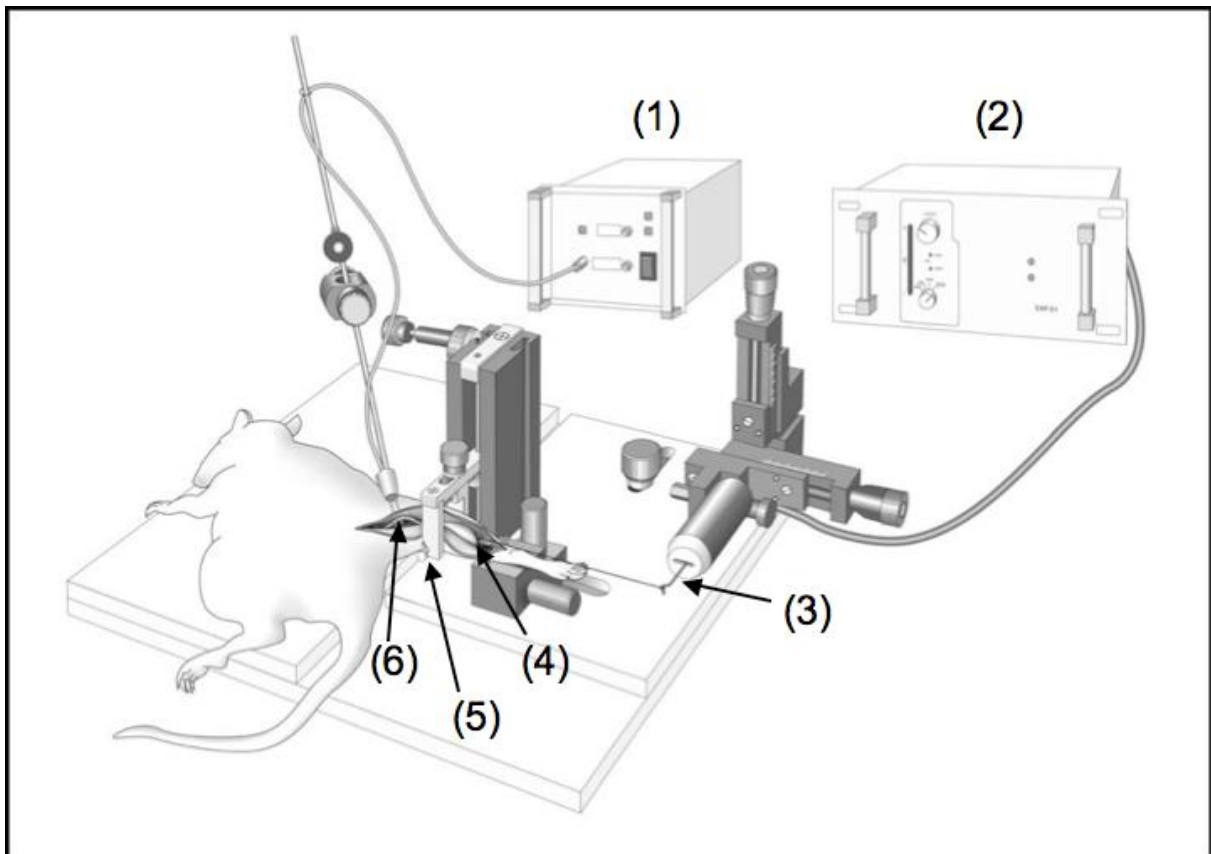


Abbildung 1: Schematische Zeichnung der Muskelkraft-Messanlage während einer Messung des rechten *M. soleus*. Im Hintergrund: Der Impulsgeber (1) und das Gerät zur Kraftaufzeichnung (2), vorne der Abnehmer für die Kraftentwicklung (3), der präparierte *M. soleus* (4), die Fixierung der zu messenden Extremität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

4.2 In vitro

4.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden wie in 4.1.3 beschrieben gewonnen und in die Kultur überführt.

Das Medium wurde in Zwei-Tages-Intervallen erneuert. Die Isolierung der Stammzellen von sonstigen Zelltypen gelang dadurch, dass MSCs als einzige Zellen am Boden der Kulturflaschen adhären und somit mit den Medienwechseln alle nicht adhärenen Zellen bzw. nicht Stammzellen ausgewaschen werden. Nach einer 60 % Konfluenz der Zellschicht wurden die MSCs in 300 cm² Kulturflaschen überführt. Dazu wurden die Zellen mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und mit 0,25 % Trypsin (Sigma, Hamburg, Deutschland) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Dieselbe Prozedur wurde zwei weitere Male bei einer 60 % Konfluenz durchgeführt, so dass sich die MSCs zum Zeitpunkt ihrer Transplantation in ihrer dritten Passage befanden. Die Zellen wurden jeweils auf zwei 300 cm² Kulturflaschen überführt. Zu jedem Zeitpunkt wurde die genaue Kennzeichnung des Tieres vermerkt, um die Zellen später dem entsprechenden Versuchstier zuordnen zu können.

Die für mesenchymale Stammzellen charakteristischen Oberflächenmarker wurden mittels FACS-Analyse bestätigt. Oberflächenmarker, die bestimmt wurden sind: CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺ und CD45⁻. Folgende Antikörper wurden zur Sicherung des Musters benutzt: Maus (α -rat CD44) (Serotec, Kidlington, UK), Maus (α -rat CD45) und Maus (α -rat CD90) (Acris Antibodies, Herford, Deutschland), Maus (α -rat CD73) und Ratte (α -mouse IgG) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.2.2 Zellvorbereitung für die Transplantation

Zur Ernte der MSCs wurden die Zellen zweimalig mit PBS und mit 0,25 % Trypsin abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen in 50 ml Falcon-Tubes überführt und diese 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. (Rotofix 32, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mittels eines Zellzählers (Casy DT, Innovatis, Reutlingen, Deutschland) gezählt, die gewünschte Zellzahl von 2×10^6 in 20 μ l 0,9 % Kochsalzlösung resuspendiert und bis zur Transplantation kühl gelagert.

4.2.3 Differenzierungsassays

4.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Zuerst wurden Zellen aus der Kultur wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben geerntet und gezählt.

Für die osteogene und adipogene Differenzierung wurden $2,4 \times 10^4$ Zellen in 400 μl Differenzierungsmedium aufgenommen. Diese Anzahl wurde jeweils auf die Löcher einer 24-Loch-(Well-) Platte (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator (CB 150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Zweimal wöchentlich erfolgte der Wechsel des Mediums durch ein frisch angesetztes Differenzierungsmedium.

Adipogenes Medium	Osteogenes Medium
1 μl Wasserlösliches Dexamethason	10 μl Wasserlösliches Dexamethason; Verdünnung 1:1000 mit Aqua dest.
6 μl Insulin	4 μl Ascorbinsäurephosphat
1 μl IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin)	35 μl β -Glycerophosphat
1,4 μl Indomethacin	951 μl DMEM + 1% P / S
100 μl FCS	
890,6 μl DMEM + 1% P / S	

Tabelle 2: Zusammensetzung der verschiedenen Medien zur Zelldifferenzierung.

4.2.3.2 Auswertung der Differenzierungsassays

Innerhalb der *osteogenen* Differenzierungsreihe wurde die Auswertung mittels einer Alazarin Red S Färbung nach 21 Tagen durchgeführt. Nachdem das Medium abgenommen worden war, die Zellen in den Wells mit 500 μl PBS gewaschen worden waren, konnten sie mit 500 μl 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert werden. Das PFA wurde nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) abgenommen und die Zellen erneut mit 500 μl PBS

gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Überschichten der Wells mit 400 µl Alizarin Red S (Fluka 05600, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und der Inkubation der Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Alazarin Red S bildet einen Komplex mit Kalzium, wodurch die Bildung von Kalziumphosphat durch Osteoblasten gemessen werden kann. Nach dem Waschen der Zellen mit destilliertem Wasser wurden 200 µl Cetylpyridiniumchlorid zugegeben, um das kalziumgebundene Alazarin Red S in eine Lösung zu überführen. Die Wells wurden für ca. 10 – 20 Minuten auf einem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei RT inkubiert, bis der gesamte Farbstoff gelöst war. Von den Überständen konnte danach die Absorption des abgegebenen Farbstoffes in einem Photometer (Spectramax 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bei 562 nm gemessen werden.

Die Auswertung der *adipogenen* Differenzierungsreihe erfolgte nach 21 Tagen. Nachdem das Medium abgenommen worden war, die Zellen in den Wells mit 500 µl PBS gewaschen worden waren, konnten sie mit 500 µl 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert werden. Das PFA wurde nach zehn minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) abgenommen und die Zellen erneut mit 500 µl PBS gewaschen. Die Wells wurden mit Isopropanol gewaschen und trocknen gelassen. Danach konnte eine Färbung mittels 200 µl einer Oil-Red-Lösung durchgeführt werden. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei RT färbt sich die Oil-Red-Lösung bei einer Reaktion mit Fetten rot und lässt sich mit Isopropanol aus den Zellen lösen. Dieses lässt sich in einem Photometer bei 500 nm messen und gibt somit Hinweise auf die adipogene Differenzierung der MSCs.

Sowohl die osteogenen als auch die adipogenen Messungen wurden zur Auswertung auf die Zellzahl normalisiert, die mittels einem MTS-Assay erfasst wurde. Die Messung erfolgte mit dem Mikroplate Reader bei 490 nm.

4.3 Statistik

Die Standardabweichung und der arithmetische Durchschnitt wurden für jede Messung bestimmt. Wurden die Versuchstiere intraindividuell betrachtet, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für abhängige Proben angewandt, um die statistische Signifikanz zu ermitteln. Um die Transplantationsgruppen und die Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U Test für unabhängige Proben benutzt.

Als Signifikanzlevel wurde 0,05 festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Zellcharakterisierung und Differenzierungsassays

Die MSCs wurden gemäß den Kriterien der ISCT auf ihre Fähigkeit adipogen und osteogen zu differenzieren getestet. Der Nachweis der Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung gelang nach Inkubation in einem entsprechendem Kulturmedium mittels einer Oil Red Färbung. Die osteogene Differenzierungsfähigkeit der genutzten MSCs konnte mittels einer Alizarin R Färbung der Zellen bestätigt werden. Für beide Differenzierungsreihen konnte durch Messungen der Extinktion mit Hilfe des Photometers ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Ausprägung der entsprechenden Färbung im Vergleich von Zellen aus Differenzierungs- bzw. Kulturmedium aufgezeigt werden. Zudem wurde als Kennzeichen von MSCs die typische Oberflächenadhärenz beobachtet.

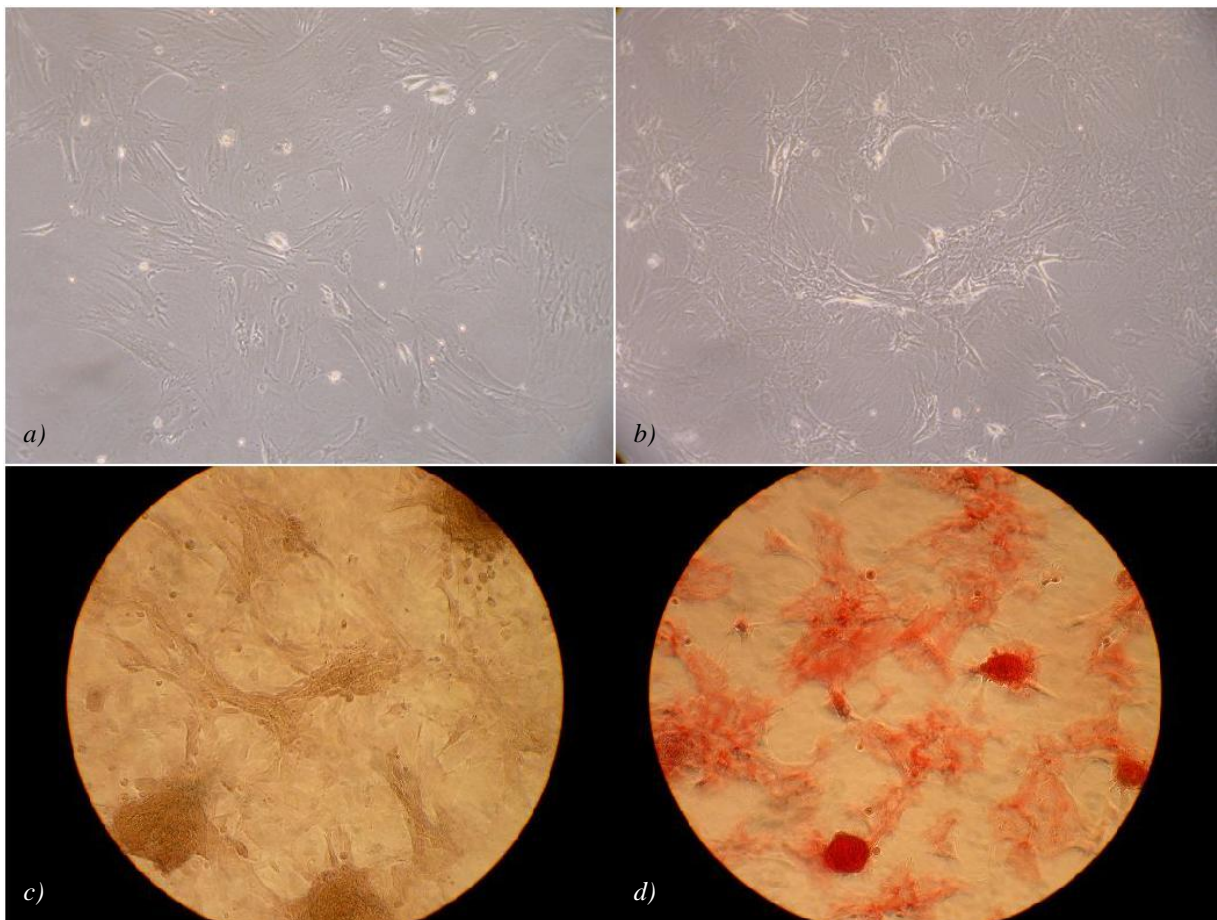


Abbildung 2: a) & b) Mesenchymale Stammzellen in Kultur, 3. Passage; zeigen mit Zellausläufern deutliche Oberflächenadhärenz.; c) & d) Osteogene Differenzierungsreihe in Alazarin Red Färbung, c) Probe in Kulturmedium, d) Probe in Differenzierungsmedium; Vergrößerung $\times 10$

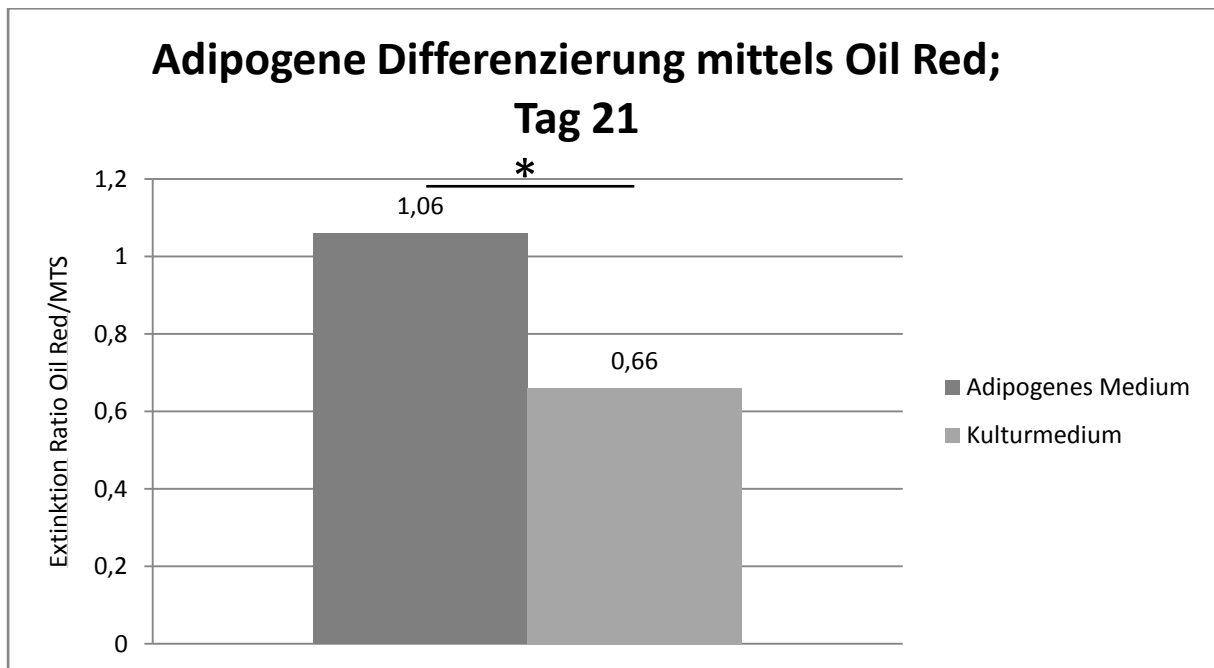


Abbildung 3: Adipogene Differenzierung der Zellen als Vergleich der Extinktion normiert auf die gemessene Zellzahl in Differenzierungsmedium vs. normales Kulturmedium; Oil Red Färbung an Tag 21; Signifikante Unterschiede sind mit einem * markiert.

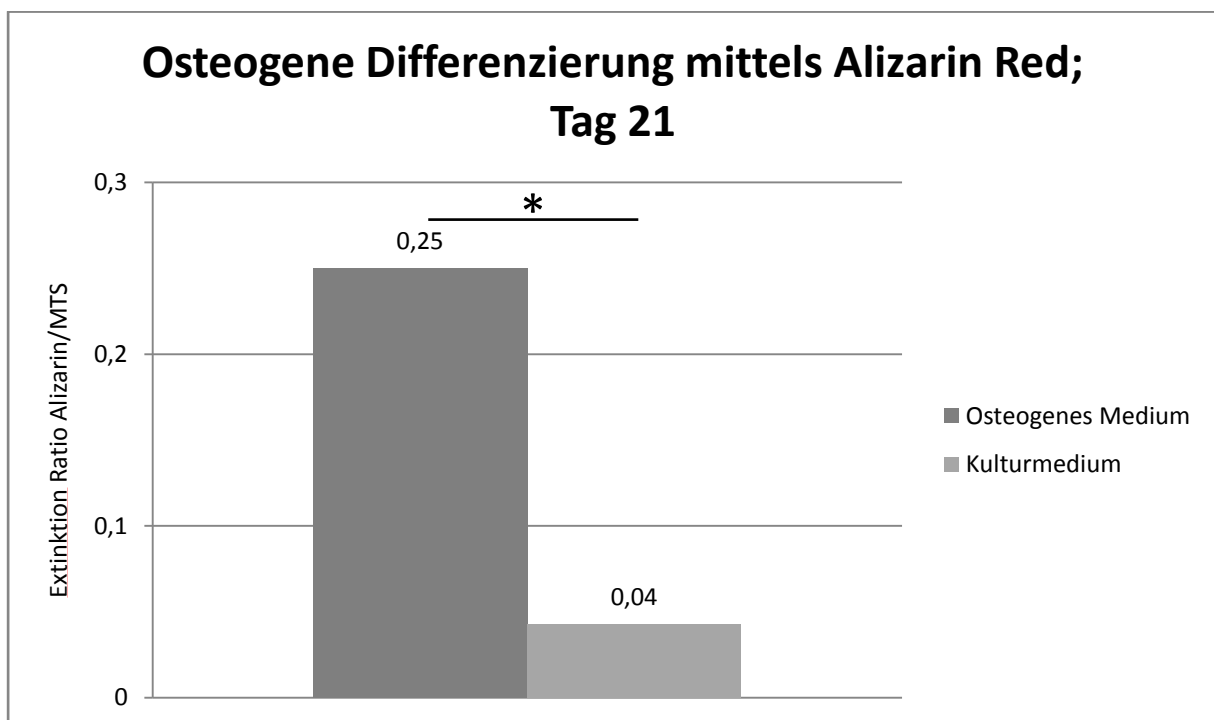


Abbildung 4: Osteogene Differenzierung der Zellen als Vergleich der Extinktion normiert auf die gemessene Zellzahl in Differenzierungsmedium vs. normales Kulturmedium; Alizarin Red Färbung an Tag 21; Signifikante Unterschiede sind mit einem * markiert.

5.2 Einfluss des Trauma auf die Muskelkraft

Die nicht-traumatisierten Muskeln des rechten Beines der Versuchstiere (Gruppen 1, 2 und Kontrollgruppe) konnten eine mittlere Kontraktionskraft von $0,98 \pm 0,26$ N bei tetanischen Kontraktionen und $0,52 \pm 0,14$ N für FT-Kontraktionen erreichen. Für die traumatisierte Seite aller Versuchstiere wurde ein Mittelwert von $0,37 \pm 0,16$ N bei tetanischen und $0,29 \pm 0,14$ N für FT-Kontraktionen gemessen. Der Muskel konnte im Mittel bei tetanischer Kontraktion 62 Prozent weniger als seine ursprüngliche Kraft vor der Traumatisierung aufbringen, die Werte lagen hier für die FT-Kontraktionen bei 43,5 Prozent weniger als des rechten Muskels. Sowohl für FT- als auch für tetanische Kontraktionen lag eine signifikante Differenz ($p < 0,005$) im Vergleich von traumatisierten mit nichttraumatisierten Muskeln vor. Dies zeigt, dass nach dem Trauma des Muskels sowohl bei tetanischen als auch FT-Kontraktionen keine vollständige funktionelle Regeneration des Muskels stattfindet.

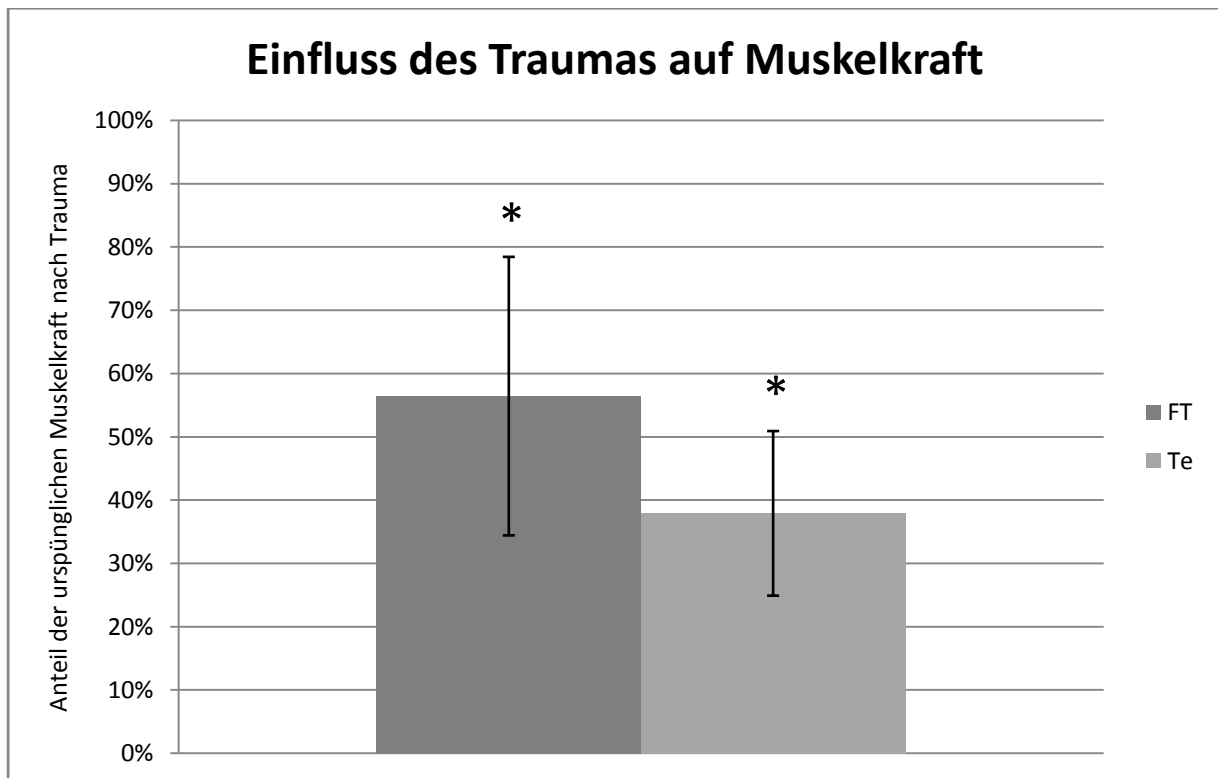


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der maximalen Kraftentwicklung der traumatisierten Muskulatur verglichen mit der gesunden Muskulatur des zugehörigen Beines der Versuchstiere. Gezeigt werden Fast-Twitch (FT) und Tetanische (Te) Kontraktionen. Signifikante Unterschiede zu den entsprechenden gesunden Muskeln sind mit einem * markiert.

5.3 Einfluss von MSCs auf die Muskelregeneration

Die maximalen Kontraktionskräfte der Kontrollgruppe betragen für den traumatisierten *M. soleus* bei tetanischen Kontraktionen im Mittel $0,27 \pm 0,15$ N, bei FT-Kontraktionen $0,21 \pm 0,11$ N. Nach der Normalisierung des geschädigten auf den gesunden Muskel ergab sich ein Kraftverlust von 72 ± 12 Prozent für tetanische und ein Kraftverlust von $61 \pm 16,5$ Prozent für FT-Kontraktionen.

Die *Mm. solei* der transplantierten Versuchstiere (Gruppen 1 & 2) konnten nach Regeneration im Mittel $0,41 \pm 0,15$ N bei tetanischen und $0,32 \pm 0,14$ N bei FT-Kontraktionen aufbringen. Der Kraftverlust nach Normalisierung auf den gesunden Muskel ergab bei tetanischer Kontraktion $57,5 \pm 12,5$ Prozent und bei FT-Kontraktionen 35 ± 21 Prozent.

Durch die lokale Injektion von 2×10^6 MSCs nach dem Trauma konnte beim *M. soleus* im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Zuwachs der tetanischen Kraft um 51,5 % beobachtet werden, ebenso bewirkte die Transplantation bei FT-Kontraktionen einen Zuwachs der Kontraktionskraft von 66,5 % verglichen zu nicht-transplantierten Versuchstieren.

Sowohl die tetanischen als auch die FT-Kontraktionskräfte nach der Transplantation von MSCs waren im Vergleich zu den nicht transplantierten Tieren signifikant ($p < 0,05$) größer.

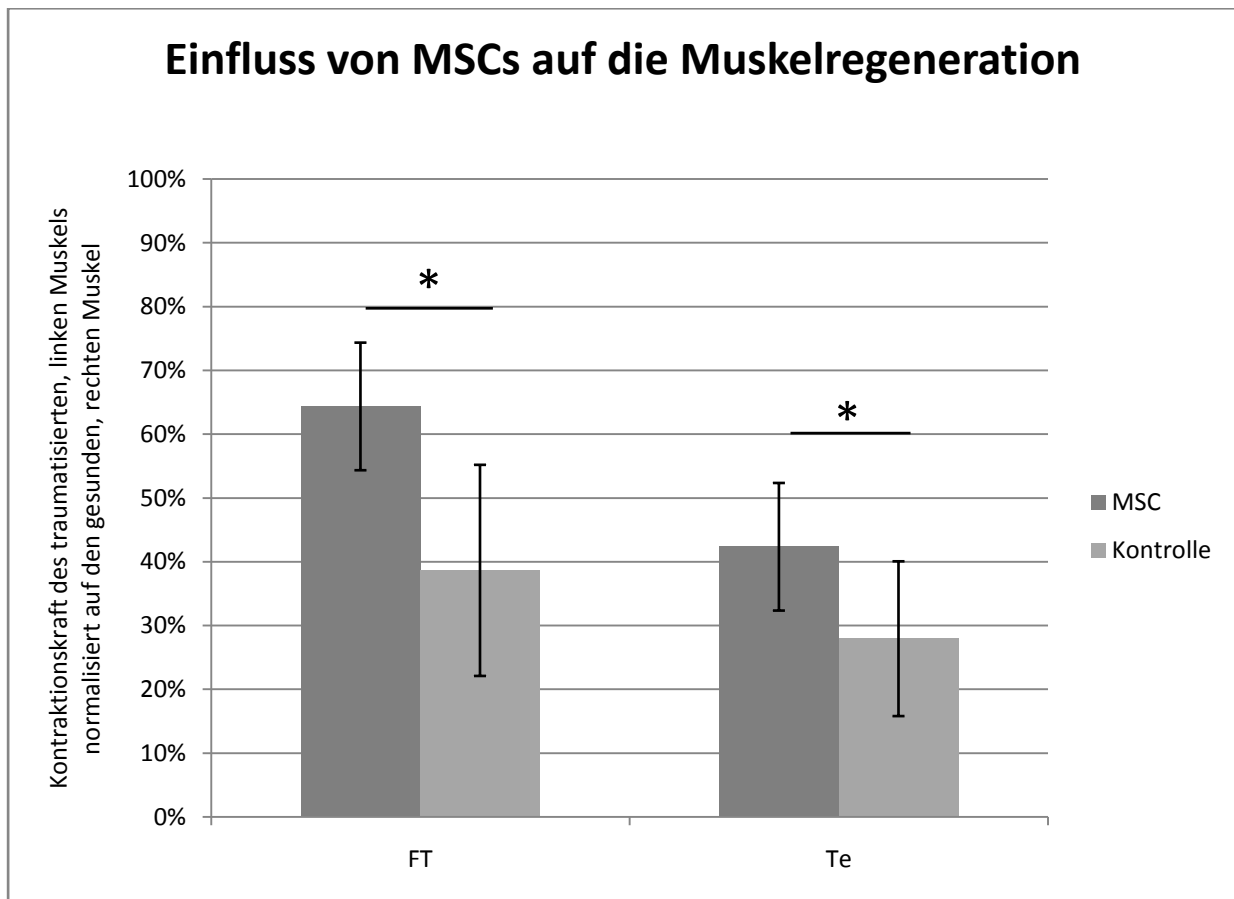


Abbildung 6: Maximale Kontraktionskraft des traumatisierten Muskels normalisiert auf den gesunden Muskel des Tieres; Vergleich des Mittelwertes aller MSC-transplantierten Tiere mit der Kontrollgruppe im FT und tetanischem (Te) Stimulationsmodus. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit einem * markiert.

5.4 Einfluss unterschiedlicher Transplantationszeitpunkte auf die Muskelregeneration

Die Untersuchung der tetanischen Kontraktionskräfte ergab eine Regeneration von 42 ± 13 % Prozent der ursprünglichen Kontraktionskräfte in Gruppe 1 und von $43 \pm 12,5$ % Prozent der Kraft bei einer um eine Woche verzögerten Transplantation der MSCs. Im Vergleich der Gruppen 1 (sofortige Transplantation) und 2 (Transplantation nach 7 Tagen) konnte hier bei einem p-Wert von 0,73 kein signifikanter Unterschied der Kontraktionskräfte festgestellt werden. Auch die Untersuchung der Muskelregeneration der Versuchstiere bei FT Stimulationen der *Mm. solei* mit Werten von 67 ± 24 % der ursprünglichen Muskelkraft in der ersten Versuchsgruppe und von $61,5 \pm 18$ % des Ausgangswertes der Gruppe 2 ergab im Vergleich bei einem p-Wert von 0,93 keinen signifikanten Unterschied bei verschiedenen Transplantationszeitpunkten.

Der Vergleich der verschiedenen Transplantationszeitpunkte zur Kontrollgruppe ergab einen signifikant geringeren Kraftverlust ($p < 0,05$) sowohl bei FT- als auch bei tetanischen Kontraktionen für die Gruppe 2. Für die sofortige Transplantation (Gruppe 1) konnte eine signifikante Verbesserung ($p < 0,05$) der Kontraktionskraft bei FT-Kontraktionen gezeigt werden, bei tetanischen Kontraktionen zeigte sich die Tendenz einer verbesserten Kontraktion.

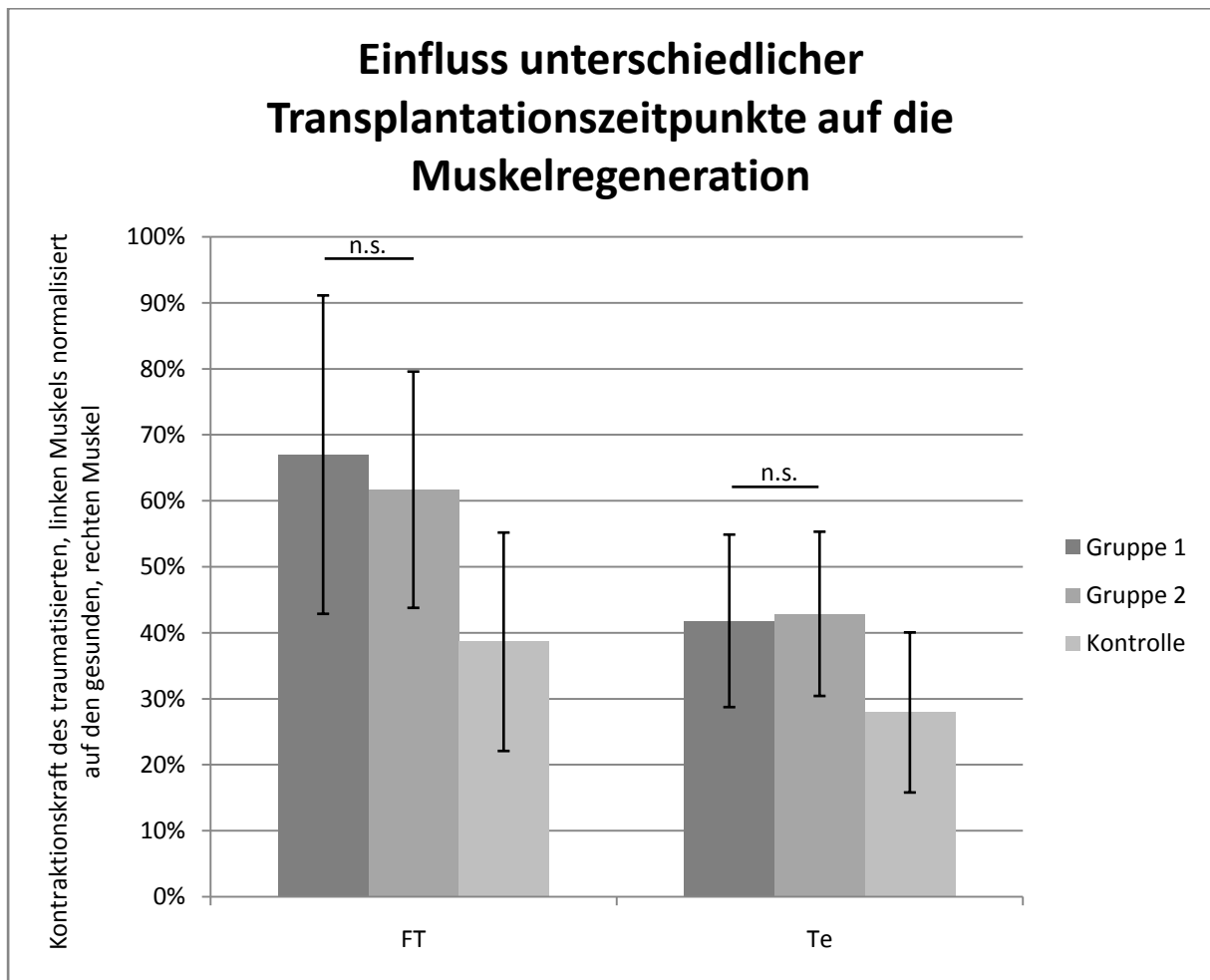


Abbildung 7: Maximale Kontraktionskraft des traumatisierten Muskels normalisiert auf den gesunden Muskel des Tieres; Vergleich des Mittelwertes der Gruppe 1 (sofortige Transplantation) und der Gruppe 2 (Transplantation nach 7 Tagen) mit der Kontrollgruppe im FT und tetanischem (Te) Stimulationsmodus. Dem Vergleich verschiedener Transplantationszeitpunkte entsprechende Säulen sind gemäß fehlender Signifikanz der Unterschiede in der Muskelregeneration mit nicht-signifikant (n.s.). markiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) einzelner Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe bestanden bei FT-Stimulationen für Gruppe 1 und Gruppe 2, bei tetanischer Stimulation für Gruppe 2 und mit einer entsprechenden Tendenz für Gruppe 1.

5.5 Weiterer Einfluss der Transplantation von MSCs auf die biomechanischen Fähigkeiten der Muskulatur

Der Mittelwert der Twitch / Tetanus Ratio der linken Beine und damit nach einem Muskeltrauma lag bei den Tieren der Gruppe 1 (sofortige Transplantation) und der Gruppe 2 (Transplantation nach 7 Tagen) bei $0,81 \pm 0,23$, bei den Tieren der Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von $0,80 \pm 0,12$ für deren linke Seite. Die Berechnungen der Twitch / Tetanus Ratio des rechten, im Versuch unverletzt gebliebenen Beins der ersten und zweiten Gruppe ergaben einen Mittelwert von $0,53 \pm 0,1$, für die Kontrollgruppe kann hier ein Wert von $0,58 \pm 0,15$ angegeben werden.

Bei der Auswertung der Werte der Twitch / Tetanus Ratios wurden zuerst die transplantierten Tiere der Gruppe 1 & 2 im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe betrachtet. Hier konnte weder für die linken, traumatisierten Beine bei einem p-Wert von 0,85 noch für die rechte, nicht traumatisierte Seite bei einem p-Wert von 0,57 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die weitere Auswertung erfolgte mittels dem Vergleichs der Ratio der traumatisierten versus der Ratio der nicht-traumatisierten Beine, unabhängig von der Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Transplantationsgruppen. Hier war bei einem $p < 0,005$ ein signifikanter Unterschied feststellbar. Der Anstieg der Twitch / Tetanus Ratio der traumatisierten im Vergleich zu den unverletzten Beinen deutet auf eine Verschiebung des Verhältnisses der Fasertypen innerhalb des Muskels zu Gunsten des schnellen Fasertypus hin.

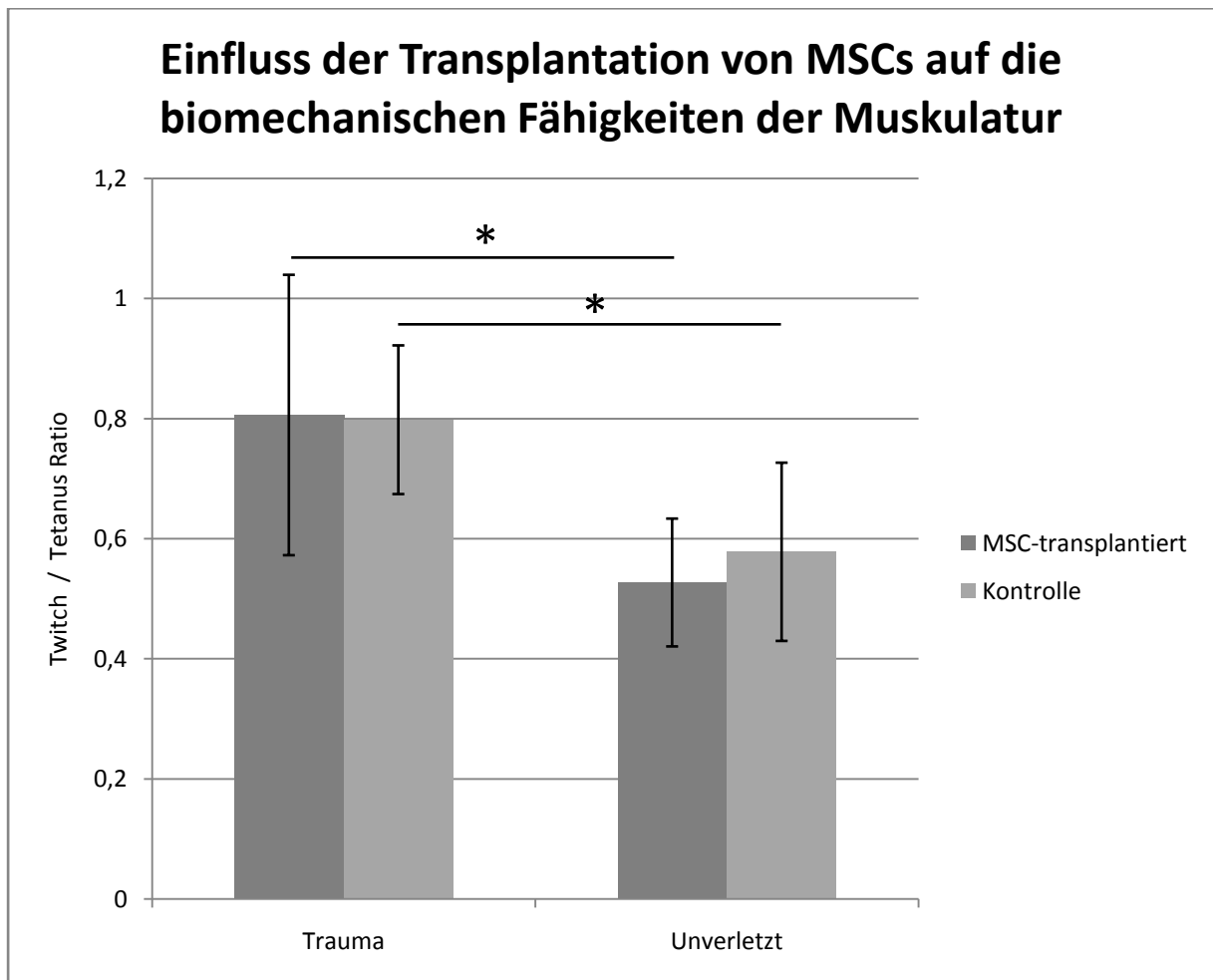


Abbildung 8: Die Daten stellen den Vergleich des linken, traumatisierten Bein vs. dem rechten, unverletztem Bein dar. Jede Säulengruppe zeigt jeweils die transplantierten und die nicht-transplantierten Tiere. Signifikante Unterschiede zur Ratio des gesunden Beines sind mit einem * markiert.

6 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die zu Beginn genannten Ziele erreicht werden. Die gestellte primäre Hypothese wurde widerlegt. Sowohl die erste Sekundärhypothese als auch die zweite Sekundärhypothese wurden bestätigt.

Die Multipotenz der durch eine tibiale Biopsie gewonnenen Stammzellen konnte durch Differenzierungsassays nachgewiesen und Kriterien des ISCT gerecht werden.

Durch die Art und Weise des im Experiment gesetzten Traumas wurde ein signifikanter Verlust der Kontraktionskräfte nach der Regeneration beobachtet.

Die Beobachtung von einem signifikanten Unterschied der funktionellen Regeneration bei Vergleich der MSC-transplantierten Gruppen (Gruppe 1 & 2) mit den Tieren der Kontrollgruppe spricht für einen prinzipiellen positiven Effekt der MSC-Transplantation auf die Muskelregeneration.

Wurden die verschiedenen Transplantationszeitpunkte miteinander verglichen, konnten der primären Hypothese widersprechend keine signifikanten Unterschiede zwischen der frühen und späten Transplantation beschrieben werden. Dies war weder der Fall bei tetanischen noch bei der FT-Kontraktionen. Interessanterweise war die späte Transplantation von Stammzellen bei beiden Formen der Kontraktion der Placebothherapie überlegen. Auch das sofortige Transplantationsverfahren war im FT-Stimulationsmodus der Placebothherapie überlegen und zeigte bei tetanischen Stimulationen die Tendenz zu Verbesserung der Regeneration. Dies bestätigt somit die erste Sekundärhypothese und weiterhin die zweite Sekundärhypothese. Daraus eröffnet sich die Grundlage für weitere Diskussionen und Betrachtungen.

Ausgewertet wurde auch der Einfluss des Traumas und der Transplantation auf die Twitch-Tetanus Ratio der Muskulatur. Konnte in diesem Fall keine Verschiebung der Ratio durch eine Transplantation an sich festgestellt werden, stieg diese bei Vergleich der traumatisierten mit den nicht-traumatisierten Muskeln zugunsten des schnellen Fasertypus innerhalb der Muskulatur, es kann somit ein Einfluss des Traumas selber auf die Zusammensetzung des Fasermusters vermutet werden.

6.1 Ergebnisse der Zellcharakterisierung und der Differenzierungsassays

Um den Nachweis erbringen zu können, mit den als mesenchymalen Stammzellen bekannten Zelltyp gearbeitet zu haben, wurden die genutzten Zellen entsprechend den ISCT-Kriterien untersucht. In spezifischen Assays konnten deren adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential nachgewiesen werden. Die Zellen wiesen weiterhin die Fähigkeit zur Oberflächenadhärenz auf und exprimierten die geforderten Oberflächenmarker.

Unsere Daten entsprechen denen von Kunter et al., die in unseren entsprechenden Versuchsreihen die adipogene und osteogene Differenzierung von Stammzellen nachweisen konnten. In diesem Fall wurden den Versuchsratten nach der Tötung Tibia und Femur vollständig entfernt. Das Knochenmark wurde ausgewaschen, und die so gewonnenen Zellen zeigten neben der Oberflächenadhärenz mit der Fähigkeit zur Osteogenese und Adipogenese die Schlüsseleigenschaften von MSCs [110]. Diese und unsere Beobachtungen decken sich auch mit Versuchen von aus dem Knochenmark gewonnenen MSCs am Tiermodell der Maus und am humanen Modell [95, 128].

6.2 Einfluss des Traumas auf die Muskelkraft

Um eine fundierte Aussage über die funktionelle Regeneration der Muskulatur bzw. einen Einfluss auf diese treffen zu können, muss ein nicht durch die dem Muskel gegebenen intrinsischen Ressourcen zu heilendes Trauma vorausgesetzt werden. Der Verlust von 62 % der ursprünglichen Kontraktionskraft des Muskels bei tetanischen Kontraktionen und von 43,5 % bei FT-Kontraktionen nach Trauma zeigt deutlich, dass die Muskulatur nicht in der Lage ist, eine vollständige funktionelle Regeneration mittels ihrer intrinsisch vorhandenen Ressourcen durchzuführen.

Obwohl die Literatur im diese Beobachtungen als wahrscheinlich vorausgesagt hat, sind bei einer kritischen Beobachtung folgende Punkte zu beachten. Der mögliche Anteil der einem Trauma folgenden Regeneration ist in weitem Maß von der Schwere des vorausgehenden Traumas abhängig. Aufgrund der Schwere der Verletzung und der trotzdem erhaltenden Kontinuität des Muskels in dem hier angewandten Traumamodell einer stumpfen Quetschung ist das Trauma nach der in der Einleitung beschriebenen Einteilung als ein Muskeltrauma zweiten Grades zu bezeichnen. Ein großer Teil der Studien zu dieser Thematik bedienen sich der intramuskulären Injektion von myotoxischen Substanzen wie bspw. Cardiotoxinen oder von Lokalanästhetika, um eine Muskelverletzung zu provozieren [128, 129]. Obwohl auf diese Art ein nachweisbares Muskeltrauma induziert werden kann, scheint dies durch die Applikationsweise in seinem Ausmaß nur begrenzt zu sein, und ist auch in der Lokalisation nicht immer befriedigend zu reproduzieren. Es ist anzunehmen, dass auf diese Weise häufig kein über den ersten Grad hinausgehendes Trauma zu erreichen ist. Preferabel ist ein den vollständigen Muskel betreffendes Trauma. So wurde bei einem offenen Verfahren von Garrett et al. eine Erholung auf 50 % der ursprünglichen Kraft nach der Regeneration eines vollständig rupturierten Muskels und somit eines Verletzungstypus dritten Grades beschrieben. Bei Vergleich mit den Kontraktionskräften eines nur teilweise rupturierten und somit eher als Referenz anzusehenden Trauma konnte diese Gruppe nur einen 40 prozentigen Kraftverlust nachweisen [43]. Die durch die standardisierte, stumpfe Quetschung im vorliegenden Traumamodell erreichten Werte ähneln denen von Garrett et al. Auch vorhergehende Messungen im eigenen Projekt konnten einen Verlust der Muskelkraft um bis zu 65 % bei FT-Kontraktionen durch das angewandte Verfahren nachweisen [130].

Einen wichtigen weiteren Punkt zur Gewinnung valider Daten ist die Auswahl eines geeigneten Messzeitpunktes für den Fortschritt der Muskelregeneration. Die Arbeitsgruppe von Stratos et al. konnte mit demselben Protokoll der Traumasetzung und der Kraftmessung einen

unserem ähnlichen Kraftverlust nachweisen. In diesem Fall wurde die Kraft jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten, 4, 7 und 14 Tage auf das Trauma folgend gemessen. Unbehandelte Tiere erreichten an Tag vier 26 % (FT) und 20 % (Tetanisch), weiterhin 53 % (FT) und 37 % (Tetanisch) zwei Wochen nach dem Zufügen der Verletzung [64]. Dies spricht für einen dynamischen Verlauf der Muskelregeneration und der Kraftentwicklung. Aufgrund dieser Daten scheint unser Messzeitpunkt von 14 Tagen posttraumatisch gut gewählt, um die Regeneration an einem Zeitpunkt zu beurteilen, der bereits genug vorangeschritten ist, um über einen großen Anteil des Regenerationsverlaufes eine Aussage treffen zu können. Auch zeigen die Ergebnisse der vorher erwähnten Arbeit, dass sich in der Kraftentwicklung ein Plateau einzustellen scheint, so dass im Zeitraum nach der funktionellen Analyse keine Entwicklungen der erreichten Muskelkraft mehr zu erwarten sind, die in Bezug auf unsere getroffenen Aussagen relevant sein könnten. Dies deckt sich mit früheren histologischen Untersuchungen, die den Beginn der Regenerationsphase um den 7. Tag posttraumatisch sehen, mit einem Höhepunkt um ungefähr zwei Wochen posttraumatisch. Als gänzlich abgeschlossen betrachtet wird die Regenerationsphase in der Literatur im Allgemeinen um circa drei bis vier Wochen nach dem Trauma [1].

Während des Strebens nach bestmöglichen und gültigen Ergebnissen wurden verschiedene Überlegungen zu möglichen Schwachpunkten in den angewandten Verfahren zur Traumainduktion und Muskelkraftmessung angestellt. Ein uns bekanntes Risiko der Traumasetzung mittels einer standardisierten Klemme an einem offenen, frei präparierten Muskel, in unserem Fall des *M. soleus*, ist, im Vergleich zur Traumasetzung bspw. mittels der intramuskulären Injektion myotoxischer Substanzen, die Gefahr ein relativ großes Areal des den Muskel umgebenden Weichteilmantels zu verletzen. Die hierdurch möglicherweise entstehenden Traumata können über den Prozess der Inflammation zu Adhäsionen des umliegenden Gewebes mit der Muskulatur führen. Diese können einerseits im Verlauf des Regenerationsprozess durch Bewegungseinschränkungen die für die Regeneration empfohlene, frühzeitige Mobilisation der Muskulatur behindern. So fördert diese, wie in der Einleitung erwähnt, die Einsprossung von Kapillaren in das Traumaareal [50]. Andererseits können Adhäsionen während dem finalen Messverfahren die Muskulatur in ihrer Kontraktionsfähigkeit beeinträchtigen. Dieses Problem lässt sich jedoch durch eine gründliche Präparation des Muskels vor der Kraftmessung umgehen. In unserem Fall ist eine zusätzliche Gefahr eine Schädigung des Gefäß-Nerven-Bündels des *Mu. soleus*. Zuständig sowohl für sämtliche nutritive und oxidative Versorgung, als auch für die nervale Stimulation, ohne welche ein Muskel zwangsläufig atrophiert, kann dieses während der Traumasetzung von der Klemme erfasst werden. Tiere, bei

denen eine Verletzung des Gefäß-Nerven-Bündels vorlag, konnten sicher identifiziert werden. Entsprechende Tiere sind nicht in die Auswertung eingegangen. Ist während der Traumasetzung eine vollständige Erfassung des Muskels gewünscht, wird dieses Risiko nicht zu umgehen sein. Eine mögliche Alternative zur Setzung eines geschlossenen, stumpfen Muskeltraumas, konnte zum Beispiel von Gierer et al. aufgezeigt werden, dessen Aufpralltrauma mittels einem pneumatisch betriebenen Apparats verursacht wurde [131]. Interessant ist weiterhin, welche Auswirkungen die Einschränkung der Nutzung des traumatisierten linken Beines auf die Muskelkraft des rechten, gesunden Beines des Versuchstiers hat. Geht man davon aus, dass das rechte Bein über den dem Trauma folgenden Zeitraum stärker als üblich belastet wird, da das linke in Schonhaltung gehalten wird oder nicht ausreichend bewegungsfähig ist, wäre dieses zum Zeitpunkt der Messung über seine ursprüngliche Kontraktionskraft trainiert. Bei einer Normalisierung des traumatisierten auf das übertrainierte, gesunde Bein verschiebt sich die Ratio hinzu zu einer falsch niedrigen Abbildung der prozentuellen Regeneration des Muskeltraumas. Nach meinen Kenntnissen ist zu diesem Punkt keine existente Literatur vorhanden. Jedoch wurden im Vorfeld der vorliegenden Arbeit in unserer Versuchsgruppe entsprechende Bodenkontaktmessungen mit Kraftaufnehmern durchgeführt. Diese zeigten, dass die Versuchstiere auch das traumatisierte Bein schnell wieder voll belasten.

Die in diesem Versuchsabschnitt gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage einer klinischen Relevanz der darauf folgenden Versuche. Die Unfähigkeit der Skelettmuskulatur nach einem ein bestimmtes Ausmaß überschreitenden Traumas eine vollständige funktionelle Regeneration zu erreichen, wird bei einem Vergleich der gesunden mit der traumatisierten Muskulatur innerhalb eines Versuchstiers ersichtlich. Gleiche Beobachtungen machten Studien verschiedener Arbeitsgruppen [43, 121, 132]. Zeigen sich Wege auf, die funktionelle Regeneration zu unterstützen, eröffnen sich in der Traumatologie und Orthopädie zahlreiche potentielle Anwendungsgebiete.

6.3 Einfluss von MSCs auf die Muskelregeneration

Aufgrund der sich überschneidenden Diskussionsansätze und Thematik wesentlicher Punkte dieses Abschnitts in 3.5.3.2.3 und der Diskussion der Hypothesen im darauffolgenden Abschnitt 6.4, erwähnt dieser Absatz nur sonst nicht erwähnte Daten, um Doppelnennungen zu vermeiden und zu Gunsten eines sinnvollen und durchgängigen Aufbaus der Dissertation.

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zur Einflussnahme auf die Muskelregeneration ist die Transplantation autologer, mesenchymaler Stammzellen. Um wie in den zuvor gestellten Hypothesen, eine Aussage zur Bedeutung des Zeitpunkts der Stammzelltransplantation auf ihren Effekt auf den verletzten Muskel machen zu können, muss primär deren positiver Effekt an sich nachgewiesen sein. Die Zusammenfassung aller transplantierten Tiere im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe nach der funktionellen Kraftmessung ermöglicht es, eine grundlegende Aussage über die Wirkung autologer MSCs zu treffen. Transplantierte Ratten konnten bei tetanischen Kontraktionen eine um 51,5% verbesserte Kontraktionskraft, bei FT-Kontraktionen eine um 66,5 % höhere Kraft als nicht-transplantierte Tiere erreichen, was einen signifikanten Effekt ($p < 0,05$) der Transplantation aufzeigt.

Unsere Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Studien. Aufgrund von Erfolgen der Behandlung von Muskeldystrophie-Patienten mit Myoblasten gibt es eine Grundlage für die Möglichkeit von Zelltransplantation [113, 114]. Trotz der Nutzung von bereits höher differenzierten Zellen in diesen Studien, ist das myogene Differenzierungspotenzial von MSCs erwiesen [93, 133]. Weiterhin liefert die Literatur deutliche Hinweise, dass dem Knochenmark entstammende MSCs über den Weg der myoblastären Differenzierung Einfluss auf Regenerationsprozesse in der Muskulatur nehmen und bei Mangel der muskeleigenen Satellitenzellen deren Platz einnehmen [134]. Es ist davon auszugehen, dass Immunreaktionen gegenüber den transplantierten Zellen zum Teil für schlechte Ergebnisse verantwortlich gewesen sein könnten, wenn in den Studien allogene Zellen genutzt wurden. In einer Studie konnten nach Myoblastentransplantation bei Duchenne-erkrankten Jungen ohne Immunsuppression im Serum Antikörper gegen die Spenderzellen nachgewiesen werden [135]. Um Host vs. Graft Reaktionen zu umgehen, wurden in unseren Versuchen ausschließlich autologe Zellen zu Transplantationszwecken genutzt. Erste Hinweise auf das Potenzial der aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen zeigt eine Studie von Ferrari et al. auf. Sie konnten histologisch Fusionsereignisse von Muskelfasern nach Injektion markierter Knochenmarkszellen in einen geschädigten Muskel nachweisen. Auch bei Injektion nach Aufteilung der Knochenmarkszellen in eine *in-vitro* an Oberflächen adhärierende und nicht adhärierende Fraktion

konnten bei einem Teil der Versuchstiere dieselben Beobachtungen gemacht werden. Markierte Zellen fanden sich vornehmend in Tieren, welche mit zuvor adhärennten Zellen behandelt wurden. Da die Oberflächenadhärenz als ein spezifisches Definitionsmerkmal von MSCs angeführt wird, können sie in diesem Fall als Effektor angesehen werden. Zu kritisieren an dieser Arbeit ist, dass zwar histologisch Fusionsereignisse nachgewiesen wurden, sich hieraus jedoch keine Aussagen über deren Nutzen für die Regeneration an sich, insbesondere über die Funktion des Muskels nach dem Trauma treffen lassen [136]. Diesen Ansatz verfolgte die Gruppe von Natsu et al. Nach scharfer Entfernung eines transversalen Keils aus der Mitte des Muskelbauchs füllten Natsu et al. den Defekt mit in Fibrinkleber eingebetteten, allogenen MSCs. Vergleichsgruppen erhielten einen Fibrinkeil oder der Defekt wurde leer verschlossen. Die Zellen waren mit Green-Fluorescent-Protein (GFP) markiert, so dass zu verschiedenen Zeitpunkten die Muskeln funktionell und histologisch untersucht werden konnten. Obwohl die Arbeitsgruppe die ursprüngliche Muskelkraft durch die Transplantation von MSCs innerhalb von vier Wochen wiederherstellen und einen signifikanten Unterschied zu den Vergleichsgruppen feststellen konnte, müssen verschiedene Gesichtspunkte kritisch betrachtet werden. Zum Zeitpunkt der letzten Messungen, 12 Wochen auf die Transplantation folgend, war der Vorsprung der Stammzellgruppe von den anderen Versuchsgruppen wieder eingeholt, so dass der Transplantation nur noch im Vergleich der MSC mit der unbehandelten Gruppe bei FT-Kontraktionen ein signifikanter Vorteil zugeschrieben werden konnte. Ursachen dafür sind vermutlich in der Art des Traumas zu sehen. Bei Entfernung eines relativ kleinen Teils des Muskelgewebes bleibt der Großteil der Muskulatur proximal und distal der Schnittfläche unverletzt und somit funktionsfähig. Weiterhin konnten die Ergebnisse der immunohistologischen Färbung keinen Beweis dafür liefern, dass transplantierte MSCs zu Muskelfasern differenzierten, oder mit Muskelfasern fusionierten. Die Kombination eines möglicherweise insuffizienten Traumas mit der Verwendung einer allogenen Zellpopulation ermöglicht Kritik an verwendetem Versuchsaufbau und somit an der Validität der Ergebnisse. Von Natsu et al. wurden ihre Ergebnisse so gewertet, dass der Beitrag der MSCs nicht auf dem Weg der Zelldifferenzierung oder der Fusion verläuft, sondern durch andere Mechanismen bewirkt wird. Den nächsten Abschnitt vorwegnehmend ist hier ein weiterer Kritikpunkt anzumerken. Um immunologische Reaktionen gegen das Allograft zu vermeiden, erhielten alle Tiere eine intraperitoneale Injektion von Tacrolimus, einem Immunsuppressivum [137]. Dies könnte neben der Wirkung auf die transplantierten Zellen einen Einfluss auf die inflammatorische Phase der Muskelregeneration gehabt haben. In dieser Phase ist aus zahlreichen Studien eine Möglichkeit der Einflussnahme auf die Regeneration bekannt [1, 68]. In der Einleitung erwähnt wur-

de, dass in einer vorangehenden Studie unserer Projektgruppe die Transplantation von Stammzellen in ein muskuläres Quetschtrauma zu einer signifikanten Verbesserung der funktionellen Regeneration führte [121]. Eine weitere vorausgegangene Studie unserer Gruppe konnte durch ihre Versuche eine Aussage zu einer geeigneten Dosis der transplantierten Zellen und den daraus resultierenden Muskelkräften nach Regeneration machen. In dieser Versuchsreihe ergab sich die deutlichste Kraftsteigerung bei einer Dosis von 10×10^6 Zellen [31].

Kritikpunkte der eigenen Arbeit bezüglich des Traumamodells und der funktionellen Arbeit wurden im vorangehenden Abschnitt besprochen. Eine Sorge ist der Verbleib der Zellen am Ort der Verletzung nach der Transplantation. Entweder können die implantierten Zellen bei erhöhter zellulärer Aktivität von Teilen des Immunsystems abgeräumt werden, oder aufgrund der eigenen Motilität das Traumaareal verlassen. Verschiedene Studien veranlassen zu der Vermutung, dass pluripotente Stammzellen eine geringere Rate an Abstoßungsreaktionen als bereits differenzierte Zellen zeigen. Der Nachweis der Möglichkeit einer Implantation von Stammzellen ohne zusätzliche Immunsuppression konnte erbracht werden, in dieser Hinsicht sind Stammzellen den anderen zur Diskussion stehenden Zellreihen wie Myoblasten oder Satellitenzellen überlegen [138, 139]. Die Ursache hierfür könnte in den Stammzellen zugeschriebenen, immunomodulatorischen Eigenschaften zu suchen sein, auf die im nächsten Absatz eingegangen wird [126]. Um der vermuteten Migration der MSCs entgegenzutreten, haben Natsu et al. in ihrer Versuchsreihe die Zellen in einen festen Fibrinblock eingebettet. Eine vorangehende Studie unserer Projektgruppe konnte jedoch zeigen, dass dies nicht notwendig ist. Aufgrund einer Markierung der MSCs mittels Eisenoxidnanopartikel konnte der Verbleib von transplantierten Zellen innerhalb des Muskels über den Zeitraum von 6 Wochen beobachtet werden. Die mit einem hochauflösenden MRT gewonnenen Bilder zeigten deutlich den transplantierten Zellpool ab 24 Stunden auf die Transplantation folgend, der zwar zunehmend an Größe verlor, jedoch über 6 Wochen sicher vom umgebenden Gewebe abzugrenzen war. Eine Migration der Zellen konnte nicht beobachtet werden [130]. Dies ist vermutlich auf Veränderungen der Gewebeeigenschaften des traumatisierten Muskels zurückzuführen. Während die Verteilung von Zellen in einem gesunden Muskel noch weitgehend ungestört möglich ist, scheint diese durch die im Trauma entstehenden, bindegewebigen Septen behindert zu sein.

Nachdem die Wirksamkeit der Transplantation autologer, mesenchymaler Stammzellen erwiesen wurde, lohnt es sich, Überlegungen zur klinischen Nutzung dieser Therapie anzustellen.

Die in der Einleitung erwähnten Fragen der optimalen Anzahl von transplantierten Zellen, der Applikationsart und den Indikationen sind momentan in der Erforschung. Sie werden und können durch standardisierte Human- und Tierstudien zu einem späteren Zeitpunkt sicherlich suffizient beantwortet werden. Ein wesentlicher Punkt neben der Wirksamkeit der Transplantation ist jedoch auch deren Sicherheit und Risiken für den Patienten. Um eine optimale Expansion der MSCs in der Kultur zu gewährleisten, wird der Zusatz von FCS (Fetal Calf Serum) im Kulturmedium benötigt. FCS kann aufgrund der potentiellen Übertragung von viralen Erregern oder pathogenen Eiweißen (z.B. BSE) gefährlich sein. Es besteht die Gefahr, dass die Zellen Bestandteile des Serums in sich aufnehmen, und dadurch unerwünschte immunologische Reaktionen hervorrufen [140, 141]. Aktuell wird an Alternativen mit humanem Serum oder aus Nabelschnurblut gewonnenem Serum geforscht. Ein anderes diskutiertes Bedenken gegenüber Stammzelltherapie ist die potentielle Tumorentwicklung nach Einsatz der Zelltherapie. Es gibt Hinweise darauf, dass MSCs eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und im Tumorwachstum spielen. Entweder können Spenderzellen als direkte Ursprungszellen einer Neoplasie dienen, wie ein Fallbericht von Arait et al. zeigt [142]. Oder sie können möglicherweise über ihre immunsuppressiven Effekte die Kanzerogenese fördern können, worauf es auch bereits Hinweise gibt [143]. Nach Stammzelltransplantation treten am häufigsten nichtmelanöse Tumore der Haut und Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle auf [142]. Potentielle Risiken und Nebenwirkungen dieser Therapie müssen in weiteren klinischen Studien betrachtet werden. Trotzdem bleibt die Nutzung von MSCs für verschiedene therapeutische Verfahren von großem Interesse.

6.4 Einfluss unterschiedlicher Transplantationszeitpunkte auf die Muskelregeneration

Die primäre Hypothese der vorliegenden Arbeit besagt, dass eine direkt auf ein Muskeltrauma folgende Transplantation von autologen MSCs einer verzögerten Transplantation in Bezug auf die Muskelregeneration unterlegen ist. Daraus ergibt sich die Alternativhypothese, dass die direkte Transplantation im Vergleich mit einer verzögerten Transplantation gleichwertig oder ihr sogar überlegen ist. Der Vergleich der Versuchsgruppe 1 (sofortige Transplantation) und der Gruppe 2 (Transplantation eine Woche nach Trauma) ergab weder für tetanische Kontraktion ($p=0,73$) noch für FT-Kontraktionen ($p=0,93$) einen signifikanten Unterschied.

Es wurden weiterhin beide Gruppen mit der Kontrollgruppe verglichen. Hier wurde ein signifikanter, erwünschter Effekt ($p<0,05$) sowohl für tetanische als auch FT-Kontraktion für die verzögerte Gruppe beobachtet. Die sofortige Transplantationsgruppe konnte den gesetzten Signifikanzlevel bei FT-Kontraktionen erreichen, bei tetanischer Stimulation war die Tendenz zu einer Verbesserung zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich erschließen, dass die Transplantation von MSCs unabhängig des Abstands zum Auftreten der Verletzung eine positive Wirkung auf die funktionelle Muskelregeneration besitzt.

Als ursächlich für den Effekt der MSCs auf die Muskelregeneration werden verschiedene Wirkungsweisen untersucht. Diskutiert wird eine Unterstützung des Regenerationsvorganges, hauptsächlich während der Reparatur- und Regenerationsphase, wodurch eine verstärkte Bildung von funktionellem Muskelgewebe erreicht wird. Obwohl frühere Studien einzelne Fusionsereignisse von transplantierten Zellen mit Myozyten beobachten konnten, zeigten diese sich meist nicht in genügendem Maße, um allein für den enormen Kraftzuwachs verantwortlich sein. Dies wird im vorangehenden Abschnitt besprochen. Weiterhin können MSCs eine überschießende und schädliche Entzündungsreaktion in einer frühen Phase regulatorisch beeinflussen. Hierdurch wird gesundes Muskelgewebe geschützt und eine zu starke Narbenbildung kann vermindert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Wirkung der Transplantation von Stammzellen auf verschiedenen Mechanismen basiert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Regenerationsverlauf ansetzen können. Addieren sich die einzelnen Effekte der MSCs, kommt es zu einem messbaren Funktions- oder Kraftgewinn.

Folgende Faktoren bieten Erklärungsmöglichkeiten für die Effekte der Stammzellen auf den Heilungsverlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten posttraumatisch. Im frühen Verlauf des Traumas sind immunomodulatorischen Fähigkeiten der MSCs wahrscheinlich von großer Bedeutung. In den ersten Tagen nach dem Trauma überwiegt eine inflammatorische Reaktion.

Das zelluläre Bild wird von mononukleären Zellen dominiert. Zuerst lassen sich im verletzten Areal neutrophile Lymphozyten nachweisen [14]. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese in einigen Fällen über eine exzessive Bildung von freien Sauerstoffradikalen noch zusätzlich gesundes Muskelgewebe schädigen können [17]. Raffaghello et al. konnten in einer Studie zeigen, dass MSCs die Bildung freier Radikale durch neutrophile Zellen verhindern konnten, ohne Einfluss auf deren phagozytotische Aktivität zu nehmen [144]. Als nächstes lassen sich vermehrt Makrophagen im Muskel nachweisen. Makrophagen sezernieren inflammatorische Zytokine und räumen tote Zellen mittels Phagozytose ab. Auch auf diese Zellen zeigen MSCs eine positive Wirkung. Maggini et al. konnten nachweisen, dass MSCs die Sekretion der inflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-6) reduzieren, gleichzeitig aber deren Fähigkeit apoptotische Zellen zu entfernen vermehrt wird [145]. Eine Reduktion der Ausschüttung von TGF- β durch eine Transplantation von MSCs in eine entzündete Niere wurde von Rampino et al. belegt [146]. In einem verletzten Muskel wird TGF- β sowohl von neutrophilen Leukozyten als auch von Makrophagen produziert. Über TGF- β ist bekannt, dass es die myogene Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung hemmt [1]. Weiterhin besitzt es eine ausschlaggebende Rolle bei der Initiation der fibrotischen Kaskaden innerhalb des Traumas. Diese Eigenschaft sowie die Fähigkeit, die Differenzierung von Myoblasten zu Myofibroblasten zu induzieren, lassen der Hemmung von TGF- β Relevanz in der Vermeidung überschießender Fibrosierungsreaktionen zukommen [67]. Die Eigenschaft der MSCs durch parakrine Aktionen Einfluss auf den Heilungsverlauf zu nehmen, wird in der Literatur als „trophische Aktivität“ bezeichnet. Untersuchungen von Kulturmedien, in denen humane MSCs kultiviert wurden, konnten die Sekretion einer Vielzahl bioaktiver Moleküle von MSCs bereits nach 24 Stunden in Kultur nachweisen [30]. Hier sei als Beispiel Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) erwähnt. G-CSF gehört zu den Faktoren, die Caplan et al. im Kulturmedium der MSCs nach einem Tag identifizieren konnte. Stratos et al. stellten Untersuchungen zu den Effekten von G-CSF auf Muskelregeneration und Muskelkraft an. Sowohl Traumasetzung als auch das Verfahren zur Messung der Muskelkraft entsprachen dem von uns verwendeten Protokoll. Im Gegensatz zu einer Injektion von MSCs erhielten die Versuchstiere täglich eine Injektion mit G-CSF, mit der ersten Einheit sofort auf das Trauma folgend über 14 Tage. Die Ergebnisse wurden an Tag 4, 7 und 14 posttraumatisch histologisch und funktionell ausgewertet. Funktionell konnten an Tag 4 auf das Trauma noch keine signifikanten Unterschiede zu einer NaCl-behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies ist interessanterweise auch der Zeitraum, den die Literatur meist der Degeneration und Inflammation in einem Muskeltrauma zuschreibt [22]. Ab Tag dem 7. sowie am 14. Tag posttraumatisch zeigten sich jedoch

signifikante Unterschiede der Muskelkraft im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ergänzt sich gut mit Beobachtungen, welche G-CSF proliferationsfördernde Eigenschaften zuschreiben, und denen, die den Beginn und Gipfel der Bildung und Reparatur von Muskelgewebe in eben diesem Zeitraum eine Woche auf eine Verletzung folgend sehen [22, 30]. Dies wird von histologischen Untersuchungen unterstützt, welche besonders am 4. Tag posttraumatisch eine erhöhte Proliferation von Satellitenzellen bei Tieren der G-CSF Gruppe beobachtet. Diese Proliferation ist wahrscheinlich notwendig, um einen genügend großen Zellpool für die Erholung des Muskelgewebes über die nächsten Tage zu gewährleisten. Ähnliche Aussagen lassen sich über viele der verschiedenen Wachstumsfaktoren sagen. Die Sekretion von insulin-like Growth-Factor (IGF) durch MSCs wurde von Cheng et al. beschrieben [147]. Es ist bekannt, dass ein Anheben des IGF-Spiegels innerhalb der Muskulatur zu einem Anstieg der Muskelmasse führt. Diese hypertrophen Effekte lassen sich einerseits auf Aktivierung von Satellitenzellen zur Proliferation und zu einer gesteigerten Proteinsynthese innerhalb der Muskelfasern zurückführen [22]. Dies führt zur Annahme, dass auch IGF in einem Traumamodell zu einer Verbesserung der Regeneration führen kann. Dieser Nachweis konnte von Schertzer et al. durch die Behandlung von myotoxisch-induzierter Traumata mittels IGF erbracht werden [63]. Mehrere weitere Studien scheinen auf eine besondere Relevanz der Wirkung von IGF-II auf die Differenzierung von Myoblasten hinzuweisen [148, 149, 150]. Auch für den hepatozytären Wachstumsfaktor (HGF) konnte ein positiver Effekt auf die Muskelregeneration, sowie die Sekretion durch MSCs nachgewiesen werden [1, 151]. Eine vollständige Aufzählung aller für die Muskelregeneration relevanten Wachstumsfaktoren wird an dieser Stelle der Dissertation nicht möglich sein. Einerseits würde dies den Rahmen der Arbeit überschreiten, andererseits ist in diesem Bereich die Forschung noch nicht an ihren Grenzen angelangt. Es lässt sich abschließend jedoch mit Sicherheit sagen, dass Wachstumsfaktoren die Muskelregeneration positiv beeinflussen [62, 66]. Wie der vorangehende Text zeigt, ist sicher auch anzunehmen, dass viele von diesen von MSCs sezerniert werden können. Wachstumsfaktoren sind sehr wahrscheinlich für einen großen Teil der parakrinen bzw. trophischen Effekte und somit auch für die Verbesserung der funktionellen Regeneration durch die Stammzelltransplantation verantwortlich. Unterstützt wird die Vermutung von Versuchen, in denen selbst die alleinige Injektion von durch MSCs konditioniertem Medium ohne Zellen die Regeneration eines verletzten Herzmuskels verbessern konnte [152]. Die Formation einer Bindegewebsnarbe (Fibrosierung) beginnt in der zweiten bis dritten Woche posttraumatisch. Im Laufe der Zeit nimmt die Menge des Bindegewebes zu. Es wird davon ausgegangen, dass keine vollständige Regeneration des Muskels möglich ist, solange eine Narbe gebildet wird [1]. Auf der Basis

des in der Einleitung beschriebenen Ablaufs der Muskelheilung basieren viele der momentan untersuchten Verfahren zur Verbesserung der Muskelregeneration darauf, eine Fibrosierung zu unterbinden. Bereits erwähnt wurden die Wirkungen von TGF- β auf das Muskeltrauma. Huard et al. konnten immunohistochemisch deutlich erhöhte Werte von TGF- β in verletzter Muskulatur messen [1]. Dies zugrunde gelegen wurde die Annahme untersucht, dass durch die Neutralisation von TGF- β eine Verhinderung der Fibrosierung und so eine verbesserte Regeneration eines Traumas möglich ist. Um dies zu betrachten, behandelten Fukushima et al. traumatisierte Versuchstiere mit Decorin und stellten sowohl histologische und funktionelle Untersuchungen an. Decorin ist ein humanes Proteoglykan, welches TGF- β deaktivieren kann und bereits in verschiedenen Geweben wie Lunge, Leber und Nieren antifibrotische Effekte aufweisen konnte. Es wurde histologisch eine signifikant geringere Bildung von fibrotischem Gewebe der Decorin-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. In den funktionellen Untersuchungen zeigte sich sogar, dass durch die Injektion von Decorin die Muskelkraft fast vollständig wiederhergestellt werden konnte, wobei eine signifikante Differenz zu der Entwicklung der Muskelkraft der Kontrollgruppe bestand [153]. Dies unterstützen Versuche von Sato et al., der die Injektion von IGF zur Förderung der Regeneration mit der Gabe von Decorin zur Verhinderung einer Fibrosierung kombinierte. Auch hier konnte eine deutliche Verminderung der Narbenbildung beschrieben werden [68]. Die vorher in diesem Abschnitt erwähnte Beobachtung, dass Stammzellen die Ausschüttung von TGF- β deutlich senken können, bildet die Grundlage für die vielversprechende Annahme, dass die Transplantation von MSCs einen wünschenswerten Einfluss auf Fibrosierungsreaktionen nehmen kann. Die Literatur liefert einige weitere Beispiele für die antifibrotischen Eigenschaften von MSCs. Häufig konnte in kardiologischen Versuchsreihen eine verminderte Bindegewebsbildung bei Schädigungen des Herzmuskels beobachtet werden, wenn sie mit MSCs behandelt wurden [154, 155]. Eine verminderte Fibrosierung nach Stammzelltransplantation zeigten auch andere Gewebe wie bspw. eine Bleomycin-geschädigte Lunge oder einer chronisch-entzündeten Niere [156, 157]. Ursachen hierfür sehen die Autoren in der nachweislich verminderten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 im Umfeld von mesenchymalen Stammzellen [156, 158, 159]. Als abschließender Punkt sollte auf den Einfluss von MSCs eingegangen werden, die diese auf die Angiogeneese in einem verletzten Gewebe nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Gewebsregeneration histologisch direkt mit der Gefässeinsprossung korreliert [50]. Estrada et al. konnten ein reichlich in MSCs und deren Kulturmedium nachweisbares Protein definieren, welches in vitro die Bildung von Endothelzellen stimulieren kann und in vivo zu deutlichen Neovaskularisation in

einem Versuchsmodell an Mäusen führte [160]. Auch hier kommen viele Ergebnisse aus Versuchen der Behandlung von Herzinfarktmodellen mittels MSCs. Implantierte MSCs konnten einerseits histologisch die kardiale Struktur durch vermehrte Angioneogenese verbessern. Weiterhin wurde auch die Funktion gemessen an der kardialen Ejektionsfraktion durch den kombinierten Effekt von Myogenese und vermehrter Angioneogenese verbessert [161, 162]. Dies ergänzend konnten Wu et al. nachweisen, dass mit MSCs behandelte Versuchstiere in einem oberflächlichen Wundmodell deutlich früher und ausgeprägter Gefäßeinsprossungen in das verletzte Areal aufzeigten [163]. Betrachtet man die Relevanz der Gefäßeinsprossung für die erfolgreiche Muskelregeneration und die in anderen Bereichen aufzeigbaren Erfolge der Verwendung von MSCs zur Förderung der Angioneogenese, so lässt sich hier ein weiterer hoffnungsvoller Punkt für Forschung und Verwendung von Stammzellen in der Therapie von Muskelverletzungen finden.

Diese Beobachtungen stimmen nicht mit klassischen Meinungen überein, dass die Schlüssel-funktion von MSCs darin besteht, Ersatzteile für mesenchymales Gewebe zu liefern. Vielmehr scheinen die Mechanismen, die in allen angeführten Fällen maßgeblich waren, von ähnlicher Natur zu sein. MSCs sezernieren bioaktive Faktoren, welche Narbenbildung unterdrücken, die Apoptose inhibieren und das Ausmaß der Verletzung limitieren, die Entzündungsreaktionen regulieren, die Angioneogenese fördern und die Mitose von muskelansässigen Stammzellen oder deren Vorläufern stimulieren. Betrachtet man dazu den Ablauf der Muskelregeneration in seinen typischen Phasen, scheint es vollends stimmig, dass MSCs dank ihrer vielzähligen Fähigkeiten diesen Prozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten Erfolg versprechend beeinflussen können.

Die Datenlage für den optimalen Zeitpunkt einer Stammzelltransplantation ist relativ dünn. Wieder einmal kommt in diesem Zusammenhang der Großteil der auffindbaren Studien aus dem Bereich der Kardiologie. Existente Studien an einem Traumamodell der Skelettmuskulatur sind bis dato nicht publiziert. Die wenigen bekannten Studien zum Thema der MSC-Transplantation an einem Trauma der Skelettmuskulatur zeigen jedoch unseren Beobachtungen entsprechende Ergebnisse. Sowohl Natsu et al. als auch Ferrari et al. führten den Versuchstieren die Zellen sofort auf das Trauma folgend zu und konnten eine signifikante Verbesserung der Regeneration erreichen [136, 137]. Ergebnisse von ähnlicher Qualität konnte mehrere Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe erzielen, wo wir eine Woche nach der Trauma-setzung die Transplantation durchführten [31, 121, 130]. Einen direkten Vergleich verschiedener Transplantationszeitpunkte im kardiologischen Bereich führten Jiang et al. durch. Sie un-

ternahmen die Transplantationen zwei Stunden, eine Woche und zwei Wochen postinfarkt. Verglichen wurden die kardiale Funktion, die Gefässdichte und die Zahl der apoptotischen Kardiomyozyten im Infarktareal. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich die kardiale Regeneration zu allen Zeitpunkten verbessern lässt, wobei die besten Effekte durch eine Transplantation eine Woche posttraumatisch erzielt wurden [164]. Hu et al. kamen auf dasselbe Ergebnis, dass im Vergleich einer 1 Stunde, 1 Woche und 2 Wochen auf einen Myokardinfarkt folgenden Transplantation der größte Benefit von der um eine Woche versetzten Transplantation zu erwarten ist [165]. Interessanterweise gelang es Krugliakov et al. sogar, mit einer Transplantation zwei Tage vor dem experimentellen Infarkt, einen positiven Effekt für den Heilungsverlauf zu erwirken [166].

Ein möglicher Kritikpunkt dieser Arbeit, dessen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse besprochen werden kann, besteht in unterschiedlichen, zeitlichen Abständen der Muskelkraftmessung zur Zelltransplantation abhängig von der Versuchsgruppe. Da die Muskelkraftmessung aller Tiere einheitlich 4 Wochen auf das Trauma folgend stattfand, hatten die transplantierten Zellen der ersten Versuchsgruppe eine Woche länger als die der zweiten Versuchsgruppe Zeit, auf die Muskelregeneration einzuwirken. Natsu et al. welche zwar nur zu einem Zeitpunkt transplantierten, aber über den Zeitraum von 10 Wochen auf die Transplantation die Fortschritte der Regeneration beobachteten, kamen zu dem Ergebnis, dass sich in Ihrem Fall meist nach vier Wochen die deutlichste Differenz der Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe zeigte. Über den Verlauf der ganzen zehn Wochen hatten sich die Unterschiede am Ende meist wieder größtenteils angeglichen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wäre es sicher interessant gewesen, den Unterschied der verschiedenen Transplantationszeitpunkte über einen längeren Zeitraum zu betrachten und an mehreren Zeitpunkten funktionelle Ergebnisse zu erheben. Dies ist auch interessant, wenn man davon ausgeht, dass MSCs zu verschiedenen Zeitpunkten über verschiedene Mechanismen wirken. Natsu et al. transplantierten direkt auf das Trauma folgend. Hier gehen wir davon aus, dass die Transplantation von MSCs einerseits das gesunde Muskelgewebe gegenüber weiterer Schädigung schützt und weiterhin die MSCs durch ihre trophischen Effekte die Bildung neuer, funktioneller Muskulatur unterstützen. Es ist durchaus denkbar, dass die regenerierende Muskulatur durch diese Effekte einen Vorsprung in der Heilung bekommt, der nach 4 Wochen zu einer signifikanten Differenz der Muskelkraft der behandelten vs. der nichtbehandelten Tiere führt. Weiterhin ist es aber auch möglich, dass eine nicht behandelte Muskulatur in der Lage ist, diesen ausschließlich auf einer geringeren Anzahl von Muskelfasern basierenden Unterschied, durch einfache Hypertrophie der verbleibenden Muskulatur auszugleichen. Dieser Mechanismus bietet einen möglichen Erklärungsansatz für

die Beobachtungen von Natsu et al. [137]. Geht man davon aus, dass Fibrosierungsreaktionen nach ungefähr 1-2 Wochen beginnen, kann man annehmen, dass antifibrotische Eigenschaften der MSCs zu diesem Zeitpunkt für einen gewissen Anteil des Benefits der Transplantation verantwortlich sind. Im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen quantitativen Mangel an Muskelfasern ist die Muskulatur nun nicht mehr in der Lage, die durch eine überschießende Bindegewebsnarbe entstandene, funktionelle Bewegungseinschränkung der Muskulatur durch muskuläre Hypertrophie auszugleichen. Besonders, wenn Adhäsionen der Muskulatur mit dem umgebenden Gewebe bestehen, ist nicht davon auszugehen, dass sich im Verlauf weiterer Wochen Differenzen dieser zu einer gesunden Muskulatur angleichen können. So bleibt als weitere Frage, welche Effekte eine zweizeitige Transplantation bewirken könnte, ob diese sich gegenseitig addieren, oder gleichwertig mit einer einzeitigen Transplantation sind. Mittels dieser Versuche ließe sich auch eine Aussage darüber treffen, ob mesenchymale Stammzellen zu verschiedenen Zeitpunkten über unterschiedliche Mechanismen wirken. Ist dies der Fall, müsste mit einer zusätzlich gesteigerten Regeneration bei einer mehrzeitigen Transplantation gerechnet werden, da sich unterschiedliche Effekte ergänzen könnten. Wirken zu jedem Zeitpunkt jedoch immer die gleichen Eigenschaften der Zellen, wäre bei einer mehrzeitigen Transplantation keiner Steigerung der Regenerationsfähigkeit zu erwarten.

Von dem Gesichtspunkt der Anwendung des Verfahrens in der Praxis sind zusätzliche Faktoren zu bedenken. Aus klinischer Sicht ergeben sich Nachteile für die sofortige Transplantation hauptsächlich durch den fehlenden zeitlichen Abstand eines operativen Eingriffes zum gewählten Transplantationszeitpunkt. Die von den Zellen benötigte Zeitspanne, sich in Kultur zu einer für die Transplantation suffizienten Zellzahl zu vermehren ist nicht gegeben. Der Vorteil einer sofortigen Transplantation der Zellen in den Muskel ist die sich daraus ergebende Möglichkeit eines einzeitigen Eingriffes, bestehend aus der ursächlichen Operation und der regenerationsunterstützenden Stammzelltransplantation. Im Gegensatz zum zweizeitigen Verfahren aus Operation und Transplantation bestehend, ergeben sich für den Patienten die Risiken eines Eingriffes (bspw. Wundinfektionen, Blutungen) nur einmalig. Der Patient wird wesentlich weniger belastet, sein Aufenthalt im Krankenhaus wird verkürzt. Somit kann dieses Verfahren Geld und Zeit sparen und ist von diesen Gesichtspunkten aus gesehen der verzögerten Transplantation vorzuziehen.

6.5 Weiterer Einfluss der Transplantation von MSCs auf die biomechanischen Fähigkeiten der Muskulatur

In der Skelettmuskulatur sind verschiedene Typen von Muskelfasern identifizierbar. Eine einfache Unterteilung unterscheidet bspw. zwischen langsamen, nach dem Aussehen roten Muskelfasern, welche eine große Ausdauerfähigkeit besitzen und schnellen, weißen Muskelfasern, die bei Belastung frühzeitig ermüden. Einen Hinweis auf das Zusammensetzungsverhältnis der Fasertypen innerhalb eines Muskels gibt die Twitch / Tetanus Ratio. Ein Anstieg des Anteils an langsamen Muskelfasertypen geht meistens mit einer niedrigeren Twitch / Tetanus Ratio einher. Desweiteren lassen sich aus der Twitch / Tetanus Ratio Aussagen über die Reservekapazitäten eines Muskels schließen. Durch häufige Stimulationen des Muskels bei der tetanischen Kontraktion können sich einzelne Aktionspotentiale summieren, und sämtliche Fasern der Muskulatur werden aktiviert. Dies gelingt bei einer einzelnen Twitch-Stimulation nicht. Eine niedrige Twitch / Tetanus Ratio bedeutet eine große Reservekapazität der Kraft des Muskels [3].

Durch die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Twitch / Tetanus Ratio der verletzten Muskeln im Vergleich zu den untransplantierten Tieren genommen werden. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass das Trauma an sich einen signifikanten Anstieg ($p < 0,005$) in der Twitch / Tetanus Ratio im Vergleich zu gesunder Muskulatur verursachte, unabhängig von einer Transplantation von MSCs.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Twitch / Tetanus Ratios der traumatisierten und gesunden Muskeln können auf verschiedenen den verletzten Muskel beeinflussenden Mechanismen begründet sein. Es wird angenommen, dass motorische Einheiten mit dickeren Muskelfasern eine höhere Twitch / Tetanus Ratio als solche mit dünneren Fasern aufweisen [3]. Im Falle des Muskeltraumas, in dem sich die Ratio während der Regeneration nach oben verschiebt ist es möglich, dass der sich regenerierende Muskel nicht in der Lage ist, alle geschädigten Muskelfasern zu ersetzen, sondern den Kraftverlust durch die Hypertrophie der noch erhaltenen Fasern ausgleicht. Weiterhin wird angenommen, dass eine Muskulatur mit einem hohen Anteil an schnellen Muskelfasern eine höhere Ratio aufzeigt als ein Muskel mit einem hohen Anteil an langsamen Fasern. Diesbezüglich herrscht bei einem großen Teil der Daten anderer Autoren Einigkeit [3, 167, 168]. Im Fall dieser Arbeit lässt dies sich so deuten, dass sich während der Regeneration das Faserverhältnis innerhalb des Muskels von langsamen Typ I Muskelfasern, welche im gesunden *M. soleus* der Ratte einen Anteil von 85 % einnehmen, zu Gunsten des schnellen Fasertypus II verschiebt [169]. Dieses physiologische Phänomen

war nicht durch die Transplantation von MSCs beeinflussbar. Bei Betrachtung der signifikant und gleichwertig höheren Kontraktionskräfte der Therapiegruppen verglichen mit den nicht-transplantierten Gruppen, ohne hier jedoch einen Einfluss auf die Twitch / Tetanus Ratio zu nehmen, kann zu dem Schluss gekommen werden, dass die Transplantation autologer MSCs den Prozess der physiologischen, funktionellen Regeneration nicht verändert, sondern nur fördert. Geht man von einem generellen, regenerationsunterstützenden Effekt von MSCs aus, ist es interessant zu beobachten, dass eine der transplantierten Gruppen einen geringeren Unterschied als die anderen transplantierten Gruppen der Regeneration verglichen zur Kontrollgruppe aufzeigen konnte. Dies war der Fall bei der ersten Gruppe und den tetanischen Kontraktionen. Da für ausdauernde, tetanische Kontraktionen größtenteils die langsamen und ausdauernden Muskelfasern verantwortlich sind, ist es durchaus nachvollziehbar, dass der regenerative Einfluss von MSCs auf die tetanische Funktion der Muskulatur nicht in dem gleichen Masse ausgeprägt ist wie auf FT-Kontraktionen. Bei Betrachtung der Reservekapazität der Muskulatur mit Hilfe der Twitch / Tetanus Ratio wurde eine Verringerung der Reservekapazität der Muskulatur beobachtet. Während gesunde *Mm. solei* der Ratten in der Lage waren, bei repetitiver Stimulation im tetanischen Stimulationsmodus ihre Kontraktionskräfte annähernd zu verdoppeln, zeigten die verletzten Muskeln lediglich eine Reserve von 25 % der aus den Kontraktionen im FT-Stimulationsmodus resultierenden Kräften. Erklärungsmöglichkeiten hierfür könnten bspw. in verringerten Speicherkapazitäten von traumatisierter Muskulatur für Ca^{++} zu suchen sein. Verschiedene Literatur sieht eine vermehrte Ausschüttung von Ca^{++} bei sukzessiver Stimulation als ursächlich für die Förderung der Kraftproduktion eines Muskels an [170]. Vermutungen, dass eine durch die vermehrte Stimulation entstehende Vorspannung des Muskels für den Anstieg der Kraft der Muskelkontraktion bei aufeinanderfolgenden Stimuli verantwortlich ist, konnten durch das standardisierte Messprotokoll, indem bereits im Voraus der Messungen eine festgelegte Vorspannung des Muskels geschaffen wird, weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Arbeit von Matziolis et al. kommt nach Messungen der Muskelkraft auf vergleichbare Ergebnisse. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der Twitch / Tetanus Ratio nach einem Muskeltrauma, auf die eine Transplantation von Stammzellen keinen Einfluss nahm [121]. Gleiches gilt für eine weitere bereits veröffentlichte Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe [31]. Eine Studie von Malicdan et al. untersuchte Versuchstiere mit einer chronischen Myopathie. In diesem Fall befindet sich die Muskulatur der Versuchstiere aufgrund anhaltender Schädigungen der Muskulatur durch die Erkrankung in einem ständigen Regenerationsprozess. Unseren Ergebnissen entsprechend zeigte sich hier mit zunehmendem Alter der Tiere ein messbarer

Anstieg der Twitch / Tetanus Ratio im *M. gastrocnemius*, der sicherlich auch teilweise den vorherbeschriebenen intrinsischen Veränderungen der Struktur des Muskelgewebes durch den Regenerationsprozess zuzuschreiben ist [171].

6.6 Fazit

Es wurde gezeigt, dass sowohl eine sofortige wie auch eine verspätete Transplantation autologer, mesenchymaler Stammzellen einen eindrucksvollen Vorteil für die Muskelregeneration erbringen. Dies erweitert das im Voraus erhoffte therapeutische Fenster einer potentiellen klinischen Nutzung der Stammzelltransplantation mit dem unmittelbar auf ein Trauma folgenden Zeitpunkt und vereinfacht in unsicheren Fällen die Indikation zu dieser Therapie. Die damit gewonnene Zeitersparnis und die Vereinfachung der klinischen Abläufe bzw. der mögliche Verzicht auf einen Zweiteingriff im klinischen Setting macht die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen zur Verbesserung der posttraumatischen Heilung und Regeneration damit für fast alle chirurgischen und traumatologischen Disziplinen noch interessanter.

Jedoch wären noch weiterführende Versuche zur Applikationsmethode sinnvoll, um einen möglicherweise schonenderen Zugangsweg für eine spätere Transplantation zu entwickeln. Wäre dieser gegeben, wird die verspätete Transplantation in entsprechenden Situationen der sofortigen Transplantation weiterhin überlegen bzw. unabdingbar sein. So z.B. im Fall der Traumatisierung durch Unfälle, wo aufgrund der Unmöglichkeit einer präoperativen Planung die benötigte Zeitspanne zur Anzucht einer suffizienten Zahl von MSCs zur Transplantation nicht gegeben ist. Naheliegend ist an eine systemische Applikation der MSCs ist zu denken. Ein arterieller, venöser oder intraperitonealer Zugang wäre denkbar. Weiterhin besteht die Möglichkeit, bei fehlendem Zeitfenster für die Zellkultur oder mangelnder Güte der Spenderzellen auf jederzeit verfügbare, allogene Zellen zurückzugreifen.

Selbstverständlich lassen sich aus den hier vorliegenden Daten auch keine Schlüsse über eine mögliche Potenzierung des positiven Effekts der Stammzelltransplantation an mehreren aufeinanderfolgenden Zeitpunkten ziehen. Somit ist mit einer einzeitigen Transplantation von MSCs deren therapeutisches Potential höchstwahrscheinlich nicht ausgereizt und weitere Studien sollten sich mit Sicherheit dieser Frage annehmen. Zudem lässt der Nachweis der Wirkung der MSC-Transplantation zu verschiedenen Zeitpunkten weiterführende Versuche zu deren Wirkmechanismus wünschen, um sämtliche Effekte von MSCs auf den Muskel besser verstehen und nutzen zu können. Sorgfältige histologische und immunologische Aufarbeitungen von Muskulatur in entsprechenden Versuchsreihen sind hier zur Klärung der vielfältigen

Wirkmechanismen von MSCs nach dem momentanen Forschungsstand weiterhin erforderlich. Vermutlich sind ein großer Teil der autokrinen und trophischen Effekte der MSCs auch ohne deren direkte Applikation reproduzierbar und somit schneller und ohne die risikobehaftete Zellgewinnung im klinischen Alltag anwendbar.

Die gewonnenen Ergebnisse ergänzen insgesamt eindrucklich die aktuelle Datenlage bezüglich des Potenzials von MSCs zur klinischen Nutzung. Sie liefern erstmalig Daten über den Einfluss der Transplantation von MSCs auf die Muskelregeneration nach einem Trauma in Abhängigkeit zu deren Transplantationszeitpunkt.

Literaturverzeichnis

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Celichowski, J. und Grottel, K. (1993): Twitch/tetanus ratio and its relation to other properties of motor units, *Neuroreport* 5 [3], Seite 201-4.
- [4] Scott, W.; Stevens, J. und Binder-Macleod, S. A. (2001): Human skeletal muscle fiber type classifications, *Phys Ther* 81 [11], Seite 1810-6.
- [5] Brockett, C. L.; Morgan, D. L. und Proske, U. (2004): Predicting hamstring strain injury in elite athletes, *Med Sci Sports Exerc* 36 [3], Seite 379-87.
- [6] Duda, G. N.; Schaser, K. D. und Haas, N. P. (2003): Significance of musculo-skeletal soft tissue trauma on pre-operative planning, surgery and healing, *Langenbecks Arch Surg* 388 [5], Seite 279-80.
- [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] Garrett, W. E., Jr. (1996): Muscle strain injuries, *Am J Sports Med* 24 [6 Suppl], Seite S2-8.
- [9] Crisco, J. J.; Jokl, P.; Heinen, G. T.; Connell, M. D. und Panjabi, M. M. (1994): A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology, *Am J Sports Med* 22 [5], Seite 702-10.
- [10] Jarvinen, M. J. und Lehto, M. U. (1993): The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries, *Sports Med* 15 [2], Seite 78-89.
- [11] Kaariainen, M.; Kaariainen, J.; Jarvinen, T. L.; Sievanen, H.; Kalimo, H. und Jarvinen, M. (1998): Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury, *J Orthop Res* 16 [2], Seite 197-206.
- [12] Jarvinen, T. A.; Jarvinen, T. L.; Kaariainen, M.; Aarimaa, V.; Vaittinen, S.; Kalimo, H. und Jarvinen, M. (2007): Muscle injuries: optimising recovery, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21 [2], Seite 317-31.
- [13] Hurme, T.; Kalimo, H.; Lehto, M. und Jarvinen, M. (1991): Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study, *Med Sci Sports Exerc* 23 [7], Seite 801-10.
- [14] Tidball, J. G. (1995): Inflammatory cell response to acute muscle injury, *Med Sci Sports Exerc* 27 [7], Seite 1022-32.
- [15] Junqueira (2002): *Histologie*, 5. Auflage, Springer, Berlin, ISBN: 3-540-41858-X.
- [16] St Pierre, B. A. und Tidball, J. G. (1994): Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension, *J Appl Physiol* 77 [1], Seite 290-7.
- [17] Toumi, H. und Best, T. M. (2003): The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury?, *Br J Sports Med* 37 [4], Seite 284-6.
- [18] Chazaud, B.; Sonnet, C.; Lafuste, P.; Bassez, G.; Rimaniol, A. C.; Poron, F.; Authier, F. J.; Dreyfus, P. A. und Gherardi, R. K. (2003): Satellite cells attract monocytes and

- use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth, *J Cell Biol* 163 [5], Seite 1133-43.
- [19] Hirata, A.; Masuda, S.; Tamura, T.; Kai, K.; Ojima, K.; Fukase, A.; Motoyoshi, K.; Kamakura, K.; Miyagoe-Suzuki, Y. und Takeda, S. (2003): Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin, *Am J Pathol* 163 [1], Seite 203-15.
- [20] Hurme, T. und Kalimo, H. (1992): Activation of myogenic precursor cells after muscle injury, *Med Sci Sports Exerc* 24 [2], Seite 197-205.
- [21] Anderson, J. E.; Mitchell, C. M.; McGeachie, J. K. und Grounds, M. D. (1995): The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice, *Exp Cell Res* 216 [2], Seite 325-34.
- [22] Charge, S. B. und Rudnicki, M. A. (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, *Physiol Rev* 84 [1], Seite 209-38.
- [23] Hayashi, S.; Aso, H.; Watanabe, K.; Nara, H.; Rose, M. T.; Ohwada, S. und Yamaguchi, T. (2004): Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle, *Histochem Cell Biol* 122 [5], Seite 427-34.
- [24] Perrone, C. E.; Fenwick-Smith, D. und Vandenburg, H. H. (1995): Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells, *J Biol Chem* 270 [5], Seite 2099-106.
- [25] Sambasivan, R. und Tajbakhsh, S. (2007): Skeletal muscle stem cell birth and properties, *Semin Cell Dev Biol* 18 [6], Seite 870-82.
- [26] Kasemkijwattana, C.; Menetrey, J.; Somogyi, G.; Moreland, M. S.; Fu, F. H.; Buranapanitkit, B.; Watkins, S. C. und Huard, J. (1998): Development of approaches to improve the healing following muscle contusion, *Cell Transplant* 7 [6], Seite 585-98.
- [27] Rantanen, J.; Hurme, T.; Lukka, R.; Heino, J. und Kalimo, H. (1995): Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells, *Lab Invest* 72 [3], Seite 341-7.
- [28] Zammit, P. S.; Golding, J. P.; Nagata, Y.; Hudon, V.; Partridge, T. A. und Beauchamp, J. R. (2004): Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?, *J Cell Biol* 166 [3], Seite 347-57.
- [29] Rouger, K.; Brault, M.; Daval, N.; Leroux, I.; Guigand, L.; Lesoeur, J.; Fernandez, B. und Chereil, Y. (2004): Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently, *Cell Tissue Res* 317 [3], Seite 319-26.
- [30] Caplan, A. I. (2007): Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine, *J Cell Physiol* 213 [2], Seite 341-7.
- [31] 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*.
- [32] Aarimaa, V.; Kaariainen, M.; Vaittinen, S.; Tanner, J.; Jarvinen, T.; Best, T. und Kalimo, H. (2004): Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus, *Neuromuscul Disord* 14 [7], Seite 421-8.

- [33] Vaittinen, S.; Hurme, T.; Rantanen, J. und Kalimo, H. (2002): Transected myofibres may remain permanently divided in two parts, *Neuromuscul Disord* 12 [6], Seite 584-7.
- [34] Hurme, T.; Kalimo, H.; Sandberg, M.; Lehto, M. und Vuorio, E. (1991): Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle, *Lab Invest* 64 [1], Seite 76-84.
- [35] Lehto, M.; Duance, V. C. und Restall, D. (1985): Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat, *J Bone Joint Surg Br* 67 [5], Seite 820-8.
- [36] Lehto, M. und Jarvinen, M. (1985): Collagen and glycosaminoglycan synthesis of injured gastrocnemius muscle in rat, *Eur Surg Res* 17 [3], Seite 179-85.
- [37] Hurme, T. und Kalimo, H. (1992): Adhesion in skeletal muscle during regeneration, *Muscle Nerve* 15 [4], Seite 482-9.
- [38] Jarvinen, T. A.; Jozsa, L.; Kannus, P.; Jarvinen, T. L.; Hurme, T.; Kvist, M.; Peltto-Huikko, M.; Kalimo, H. und Jarvinen, M. (2003): Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle, *J Cell Sci* 116 [Pt 5], Seite 857-66.
- [39] Morla, A.; Zhang, Z. und Ruoslahti, E. (1994): Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin, *Nature* 367 [6459], Seite 193-6.
- [40] Lehto, M.; Jarvinen, M. und Nelimarkka, O. (1986): Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats, *Arch Orthop Trauma Surg* 104 [6], Seite 366-70.
- [41] Jarvinen, M. (1975): Healing of a crush injury in rat striated muscle. 2. a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes, *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83 [3], Seite 269-82.
- [42] Lehto, M.; Sims, T. J. und Bailey, A. J. (1985): Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing, *Res Exp Med (Berl)* 185 [2], Seite 95-106.
- [43] Garrett, W. E., Jr.; Seaber, A. V.; Boswick, J.; Urbaniak, J. R. und Goldner, J. L. (1984): Recovery of skeletal muscle after laceration and repair, *J Hand Surg Am* 9 [5], Seite 683-92.
- [44] Buckwalter, J. A. (1995): Should bone, soft-tissue, and joint injuries be treated with rest or activity?, *J Orthop Res* 13 [2], Seite 155-6.
- [45] Bily, W. und Kern, H. (1998): [Diagnosis, first aid and classification of muscle injuries in sports medicine], *Sportverletz Sportschaden* 12 [3], Seite 87-93.
- [46] Bleakley, C.; McDonough, S. und MacAuley, D. (2004): The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials, *Am J Sports Med* 32 [1], Seite 251-61.
- [47] Schaser, K. D.; Disch, A. C.; Stover, J. F.; Lauffer, A.; Bail, H. J. und Mittlmeier, T. (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.
- [48] Thorsson, O.; Hemdal, B.; Lilja, B. und Westlin, N. (1987): The effect of external pressure on intramuscular blood flow at rest and after running, *Med Sci Sports Exerc* 19 [5], Seite 469-73.

- [49] Thorsson, O.; Lilja, B.; Nilsson, P. und Westlin, N. (1997): Immediate external compression in the management of an acute muscle injury, *Scand J Med Sci Sports* 7 [3], Seite 182-90.
- [50] Jarvinen, M. (1976): Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth, *Acta Pathol Microbiol Scand A* 84 [1], Seite 85-94.
- [51] Jarvinen, M. (1976): Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle, *Acta Chir Scand* 142 [1], Seite 47-56.
- [52] Ljungqvist, A.; Schweltnus, M. P.; Bachl, N.; Collins, M.; Cook, J.; Khan, K. M.; Maffulli, N.; Pitsiladis, Y.; Riley, G.; Golspink, G.; Venter, D.; Derman, E. W.; Engebretsen, L. und Volpi, P. (2008): International Olympic Committee consensus statement: molecular basis of connective tissue and muscle injuries in sport, *Clin Sports Med* 27 [1], Seite 231-9, x-xi.
- [53] Richard-Bulteau, H.; Serrurier, B.; Crassous, B.; Banzet, S.; Peinnequin, A.; Bigard, X. und Koulmann, N. (2008): Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity, *Am J Physiol Cell Physiol* 294 [2], Seite C467-76.
- [54] Benoit, P. W. und Belt, W. D. (1972): Some effects of local anesthetic agents on skeletal muscle, *Exp Neurol* 34 [2], Seite 264-78.
- [55] Almekinders, L. C. (1999): Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies, *Sports Med* 28 [6], Seite 383-8.
- [56] Almekinders, L. C. und Gilbert, J. A. (1986): Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication, *Am J Sports Med* 14 [4], Seite 303-8.
- [57] Obremsky, W. T.; Seaber, A. V.; Ribbeck, B. M. und Garrett, W. E., Jr. (1994): Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam, *Am J Sports Med* 22 [4], Seite 558-61.
- [58] Thorsson, O.; Rantanen, J.; Hurme, T. und Kalimo, H. (1998): Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration, *Am J Sports Med* 26 [2], Seite 172-6.
- [59] Rahusen, F. T.; Weinhold, P. S. und Almekinders, L. C. (2004): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury, *Am J Sports Med* 32 [8], Seite 1856-9.
- [60] O'Grady, M.; Hackney, A. C.; Schneider, K.; Bossen, E.; Steinberg, K.; Douglas, J. M., Jr.; Murray, W. J. und Watkins, W. D. (2000): Diclofenac sodium (Voltaren) reduced exercise-induced injury in human skeletal muscle, *Med Sci Sports Exerc* 32 [7], Seite 1191-6.
- [61] Beiner, J. M.; Jokl, P.; Cholewicki, J. und Panjabi, M. M. (1999): The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury, *Am J Sports Med* 27 [1], Seite 2-9.
- [62] 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.
- [63] Schertzer, J. D.; Gehrig, S. M.; Ryall, J. G. und Lynch, G. S. (2007): Modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein interactions enhances skeletal muscle regeneration and ameliorates the dystrophic pathology in mdx mice, *Am J Pathol* 171 [4], Seite 1180-8.

- [64] Stratos, I.; Rotter, R.; Eipel, C.; Mittlmeier, T. und Vollmar, B. (2007): Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats, *J Appl Physiol* 103 [5], Seite 1857-63.
- [65] Le Roith, D. (1997): Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors, *N Engl J Med* 336 [9], Seite 633-40.
- [66] 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.
- [67] Li, Y.; Foster, W.; Deasy, B. M.; Chan, Y.; Prisk, V.; Tang, Y.; Cummins, J. und Huard, J. (2004): Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis, *Am J Pathol* 164 [3], Seite 1007-19.
- [68] Sato, K.; Li, Y.; Foster, W.; Fukushima, K.; Badlani, N.; Adachi, N.; Usas, A.; Fu, F. H. und Huard, J. (2003): Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis, *Muscle Nerve* 28 [3], Seite 365-72.
- [69] Evans, C. H. und Robbins, P. D. (1999): Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system, *Clin Orthop Relat Res* [367 Suppl], Seite S410-8.
- [70] Lamsam, C.; Fu, F. H.; Robbins, P. D. und Evans, C. H. (1998): Gene therapy in sports medicine, *Sports Med* 25 [2], Seite 73-7.
- [71] Takahashi, T.; Ishida, K.; Itoh, K.; Konishi, Y.; Yagyu, K. I.; Tominaga, A.; Miyazaki, J. I. und Yamamoto, H. (2003): IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model, *Gene Ther* 10 [8], Seite 612-20.
- [72] Markert, C. D.; Merrick, M. A.; Kirby, T. E. und Devor, S. T. (2005): Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration, *Arch Phys Med Rehabil* 86 [7], Seite 1304-10.
- [73] Rantanen, J.; Thorsson, O.; Wollmer, P.; Hurme, T. und Kalimo, H. (1999): Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury, *Am J Sports Med* 27 [1], Seite 54-9.
- [74] Wilkin, L. D.; Merrick, M. A.; Kirby, T. E. und Devor, S. T. (2004): Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion, *Int J Sports Med* 25 [1], Seite 73-7.
- [75] Tibbles, P. M. und Edelsberg, J. S. (1996): Hyperbaric-oxygen therapy, *N Engl J Med* 334 [25], Seite 1642-8.
- [76] Best, T. M.; Loitz-Ramage, B.; Corr, D. T. und Vanderby, R. (1998): Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries. Results in an animal model, *Am J Sports Med* 26 [3], Seite 367-72.
- [77] Gregorevic, P.; Lynch, G. S. und Williams, D. A. (2000): Hyperbaric oxygen improves contractile function of regenerating rat skeletal muscle after myotoxic injury, *J Appl Physiol* 89 [4], Seite 1477-82.
- [78] Rotter, R.; Menshykova, M.; Winkler, T.; Matziolis, G.; Stratos, I.; Schoen, M.; Bittorf, T.; Mittlmeier, T. und Vollmar, B. (2008): Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue, *J Orthop Res* 26 [12], Seite 1618-26.
- [79] 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.
- [80] 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.

- [81] Almekinders, L. C. (1991): Results of surgical repair versus splinting of experimentally transected muscle, *J Orthop Trauma* 5 [2], Seite 173-6.
- [82] Menetrey, J.; Kasemkijwattana, C.; Fu, F. H.; Moreland, M. S. und Huard, J. (1999): Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model, *Am J Sports Med* 27 [2], Seite 222-9.
- [83] Mazzarello, P. (1999): A unifying concept: the history of cell theory, *Nat Cell Biol* 1 [1], Seite E13-5.
- [84] 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.
- [85] Mauro, A. (1961): Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J Biophys Biochem Cytol* 9, Seite 493-5.
- [86] Song, L.; Young, N. J.; Webb, N. E. und Tuan, R. S. (2005): Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone, *Stem Cells Dev* 14 [6], Seite 712-21.
- [87] Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D. und Kai, T. (2001): Stem cells find their niche, *Nature* 414 [6859], Seite 98-104.
- [88] Battula, V. L.; Treml, S.; Bareiss, P. M.; Gieseke, F.; Roelofs, H.; de Zwart, P.; Muller, I.; Schewe, B.; Skutella, T.; Fibbe, W. E.; Kanz, L. und Buhring, H. J. (2009): Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1, *Haematologica* 94 [2], Seite 173-84.
- [89] Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S. und Marshak, D. R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 [5411], Seite 143-7.
- [90] Pittenger, M.; Vanguri, P.; Simonetti, D. und Young, R. (2002): Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy, *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2 [4], Seite 309-20.
- [91] Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D. J. und Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 [4], Seite 315-7.
- [92] Buhring, H. J.; Battula, V. L.; Treml, S.; Schewe, B.; Kanz, L. und Vogel, W. (2007): Novel markers for the prospective isolation of human MSC, *Ann N Y Acad Sci* 1106, Seite 262-71.
- [93] Pittenger, M. F. (2008): Mesenchymal stem cells from adult bone marrow, *Methods Mol Biol* 449, Seite 27-44.
- [94] Caplan, A. I. (1994): The mesengenic process, *Clin Plast Surg* 21 [3], Seite 429-35.
- [95] Sekiya, I.; Larson, B. L.; Smith, J. R.; Pochampally, R.; Cui, J. G. und Prockop, D. J. (2002): Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality, *Stem Cells* 20 [6], Seite 530-41.
- [96] Spitkovsky, D. und Hescheler, J. (2008): Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications, *Minim Invasive Ther Allied Technol* 17 [2], Seite 79-90.
- [97] Psaltis, P. J.; Zannettino, A. C.; Worthley, S. G. und Gronthos, S. (2008): Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair, *Stem Cells* 26 [9], Seite 2201-10.

- [98] Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H. und Bieback, K. (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells* 24 [5], Seite 1294-301.
- [99] Seeger, F. H.; Tonn, T.; Krzossok, N.; Zeiher, A. M. und Dimmeler, S. (2007): Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction, *Eur Heart J* 28 [6], Seite 766-72.
- [100] Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K. und Lalykina, K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet* 3 [4], Seite 393-403.
- [101] Vassilopoulos, G.; Wang, P. R. und Russell, D. W. (2003): Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion, *Nature* 422 [6934], Seite 901-4.
- [102] Sato, Y.; Araki, H.; Kato, J.; Nakamura, K.; Kawano, Y.; Kobune, M.; Sato, T.; Miyanishi, K.; Takayama, T.; Takahashi, M.; Takimoto, R.; Iyama, S.; Matsunaga, T.; Ohtani, S.; Matsuura, A.; Hamada, H. und Niitsu, Y. (2005): Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion, *Blood* 106 [2], Seite 756-63.
- [103] 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.
- [104] Abdallah, B. M. und Kassem, M. (2009): The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives, *J Cell Physiol* 218 [1], Seite 9-12.
- [105] Horwitz, E. M.; Gordon, P. L.; Koo, W. K.; Marx, J. C.; Neel, M. D.; McNall, R. Y.; Muul, L. und Hofmann, T. (2002): Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [13], Seite 8932-7.
- [106] Le Blanc, K.; Gotherstrom, C.; Ringden, O.; Hassan, M.; McMahon, R.; Horwitz, E.; Anneren, G.; Axelsson, O.; Nunn, J.; Ewald, U.; Norden-Lindeberg, S.; Jansson, M.; Dalton, A.; Astrom, E. und Westgren, M. (2005): Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta, *Transplantation* 79 [11], Seite 1607-14.
- [107] Le Blanc, K.; Frassoni, F.; Ball, L.; Locatelli, F.; Roelofs, H.; Lewis, I.; Lanino, E.; Sundberg, B.; Bernardo, M. E.; Remberger, M.; Dini, G.; Egeler, R. M.; Bacigalupo, A.; Fibbe, W. und Ringden, O. (2008): Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study, *Lancet* 371 [9624], Seite 1579-86.
- [108] Taupin, P. (2006): OTI-010 Osiris Therapeutics/JCR Pharmaceuticals, *Curr Opin Investig Drugs* 7 [5], Seite 473-81.
- [109] Semont, A.; Francois, S.; Mouiseddine, M.; Francois, A.; Sache, A.; Frick, J.; Thierry, D. und Chapel, A. (2006): Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury, *Adv Exp Med Biol* 585, Seite 19-30.
- [110] Kunter, U.; Rong, S.; Djuric, Z.; Boor, P.; Muller-Newen, G.; Yu, D. und Floege, J. (2006): Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis, *J Am Soc Nephrol* 17 [8], Seite 2202-12.

- [111] Dezawa, M.; Hoshino, M. und Ide, C. (2005): Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons, *Expert Opin Biol Ther* 5 [4], Seite 427-35.
- [112] Bang, O. Y.; Lee, J. S.; Lee, P. H. und Lee, G. (2005): Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients, *Ann Neurol* 57 [6], Seite 874-82.
- [113] Gussoni, E.; Pavlath, G. K.; Lanctot, A. M.; Sharma, K. R.; Miller, R. G.; Steinman, L. und Blau, H. M. (1992): Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation, *Nature* 356 [6368], Seite 435-8.
- [114] Partridge, T. A.; Morgan, J. E.; Coulton, G. R.; Hoffman, E. P. und Kunkel, L. M. (1989): Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts, *Nature* 337 [6203], Seite 176-9.
- [115] 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.
- [116] DeRosimo, J. F.; Washabaugh, C. H.; Ontell, M. P.; Daood, M. J.; Watchko, J. F.; Watkins, S. C.; Ameredes, B. T. und Ontell, M. (2000): Enhancement of adult muscle regeneration by primary myoblast transplantation, *Cell Transplant* 9 [3], Seite 369-77.
- [117] Amado, L. C.; Saliaris, A. P.; Schuleri, K. H.; St John, M.; Xie, J. S.; Cattaneo, S.; Durand, D. J.; Fitton, T.; Kuang, J. Q.; Stewart, G.; Lehrke, S.; Baumgartner, W. W.; Martin, B. J.; Heldman, A. W. und Hare, J. M. (2005): Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [32], Seite 11474-9.
- [118] Silva, G. V.; Litovsky, S.; Assad, J. A.; Sousa, A. L.; Martin, B. J.; Vela, D.; Coulter, S. C.; Lin, J.; Ober, J.; Vaughn, W. K.; Branco, R. V.; Oliveira, E. M.; He, R.; Geng, Y. J.; Willerson, J. T. und Perin, E. C. (2005): Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model, *Circulation* 111 [2], Seite 150-6.
- [119] Toma, C.; Pittenger, M. F.; Cahill, K. S.; Byrne, B. J. und Kessler, P. D. (2002): Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart, *Circulation* 105 [1], Seite 93-8.
- [120] Valina, C.; Pinkernell, K.; Song, Y. H.; Bai, X.; Sadat, S.; Campeau, R. J.; Le Jemtel, T. H. und Alt, E. (2007): Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction, *Eur Heart J* 28 [21], Seite 2667-77.
- [121] 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.
- [122] (2008): National inpatient sample, Rockville, Agency for Healthcare Research and Quality, U.S. Department of Health & Human Services, <http://hcupnet.ahrq.gov/HCUPnet.jsp>
- [123] Huo, M. H.; Parvizi, J.; Bal, B. S. und Mont, M. A. (2009): What's new in total hip arthroplasty, *J Bone Joint Surg Am* 91 [10], Seite 2522-34.
- [124] Togel, F. E. und Westenfelder, C. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI, *Nat Rev Nephrol* 6 [3], Seite 179-83.
- [125] Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Limana, F.; Jakoniuk, I.; Quaini, F.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A. und Anversa, P. (2001): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [18], Seite 10344-9.

- [126] Caplan, A. I. (2009): Why are MSCs therapeutic? New data: new insight, *J Pathol* 217 [2], Seite 318-24.
- [127] Mishra, P. K. (2008): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation?, *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 9 [2], Seite 122-8.
- [128] Drapeau, C.; Antarr, D.; Ma, H.; Yang, Z.; Tang, L.; Hoffman, R. M. und Schaeffer, D. J. Mobilization of bone marrow stem cells with StemEnhance improves muscle regeneration in cardiotoxin-induced muscle injury, *Cell Cycle* 9 [9], Seite 1819-23.
- [129] White, J. P.; Baltgalvis, K. A.; Sato, S.; Wilson, L. B. und Carson, J. A. (2009): Effect of nandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced muscle injury, *J Appl Physiol* 107 [5], Seite 1420-30.
- [130] Winkler, T.; von Roth, P.; Schuman, 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* 14 [7], Seite 1149-60.
- [131] Gierer, P.; Rother, J.; Mittlmeier, T.; Gradl, G. und Vollmar, B. Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat, *J Trauma* 68 [4], Seite 853-8.
- [132] Alameddine, H. S.; Louboutin, J. P.; Dehaupas, M.; Sebille, A. und Fardeau, M. (1994): Functional recovery induced by satellite cell grafts in irreversibly injured muscles, *Cell Transplant* 3 [1], Seite 3-14.
- [133] Lecourt, S.; Marolleau, J. P.; Fromigue, O.; Vauchez, K.; Andriamanalijaona, R.; Ternaux, B.; Lacassagne, M. N.; Robert, I.; Boumediene, K.; Chereau, F.; Marie, P.; Larghero, J.; Fiszman, M. und Vilquin, J. T. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro, *Exp Cell Res* 316 [15], Seite 2513-26.
- [134] Otto, A.; Collins-Hooper, H. und Patel, K. (2009): The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations, *J Anat* 215 [5], Seite 477-97.
- [135] Tremblay, J. P.; Malouin, F.; Roy, R.; Huard, J.; Bouchard, J. P.; Satoh, A. und Richards, C. L. (1993): Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy, *Cell Transplant* 2 [2], Seite 99-112.
- [136] 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.
- [137] 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.
- [138] Huard, J.; Cao, B. und Qu-Petersen, Z. (2003): Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration, *Birth Defects Res C Embryo Today* 69 [3], Seite 230-7.
- [139] Huard, J.; Roy, R.; Guerette, B.; Verreault, S.; Tremblay, G. und Tremblay, J. P. (1994): Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection, *Muscle Nerve* 17 [2], Seite 224-34.
- [140] (1997): Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting, *Bull World Health Organ* 75 [6], Seite 505-13.

- [141] Spees, J. L.; Gregory, C. A.; Singh, H.; Tucker, H. A.; Peister, A.; Lynch, P. J.; Hsu, S. C.; Smith, J. und Prockop, D. J. (2004): Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy, *Mol Ther* 9 [5], Seite 747-56.
- [142] Arai, Y.; Arai, H.; Aoyagi, A.; Yamagata, T.; Mitani, K.; Kubota, K.; Kawamata, H. und Imai, Y. (2006): A solid tumor of donor cell-origin after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, *Am J Transplant* 6 [12], Seite 3042-3.
- [143] Djouad, F.; Ponce, P.; Bony, C.; Tropel, P.; Apparailly, F.; Sany, J.; Noel, D. und Jorgensen, C. (2003): Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals, *Blood* 102 [10], Seite 3837-44.
- [144] Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Bertolotto, M.; Montecucco, F.; Busca, A.; Dallegri, F.; Ottonello, L. und Pistoia, V. (2008): Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche, *Stem Cells* 26 [1], Seite 151-62.
- [145] Maggini, J.; Mirkin, G.; Bognanni, I.; Holmberg, J.; Piazzon, I. M.; Nepomnaschy, I.; Costa, H.; Canones, C.; Raiden, S.; Vermeulen, M. und Geffner, J. R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile, *PLoS One* 5 [2], Seite e9252.
- [146] Rampino, T.; Gregorini, M.; Bedino, G.; Piotti, G.; Gabanti, E.; Ibatici, A.; Sessarego, N.; Piacenza, C.; Balenzano, C. T.; Esposito, P.; Bosio, F.; Soccio, G.; Frassoni, F. und Dal Canton, A. Mesenchymal stromal cells improve renal injury in anti-Thy 1 nephritis by modulating inflammatory cytokines and scatter factors, *Clin Sci (Lond)* 120 [1], Seite 25-36.
- [147] 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.
- [148] 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.
- [149] 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.
- [150] 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.
- [151] 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.
- [152] 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.

- [153] Fukushima, K.; Badlani, N.; Usas, A.; Riano, F.; Fu, F. und Huard, J. (2001): The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration, *Am J Sports Med* 29 [4], Seite 394-402.
- [154] Li, L.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Yu, B.; Xu, Y. und Guan, Z. (2009): Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure, *Mol Biol Rep* 36 [4], Seite 725-31.
- [155] Ohnishi, S.; Sumiyoshi, H.; Kitamura, S. und Nagaya, N. (2007): Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions, *FEBS Lett* 581 [21], Seite 3961-6.
- [156] Ortiz, L. A.; Dutreil, M.; Fattman, C.; Pandey, A. C.; Torres, G.; Go, K. und Phinney, D. G. (2007): Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [26], Seite 11002-7.
- [157] Semedo, P.; Correa-Costa, M.; Antonio Cenedeze, M.; Maria Avancini Costa Malheiros, D.; Antonia dos Reis, M.; Shimizu, M. H.; Seguro, A. C.; Pacheco-Silva, A. und Saraiva Camara, N. O. (2009): Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model, *Stem Cells* 27 [12], Seite 3063-73.
- [158] Li, Z.; Wei, H.; Deng, L.; Cong, X. und Chen, X. Expression and secretion of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells, *Febs J*.
- [159] Pulavendran, S.; Vignesh, J. und Rose, C. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice, *Int Immunopharmacol* 10 [4], Seite 513-9.
- [160] Estrada, R.; Li, N.; Sarojini, H.; An, J.; Lee, M. J. und Wang, E. (2009): Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61, *J Cell Physiol* 219 [3], Seite 563-71.
- [161] Carvalho, K. A.; Guarita-Souza, L. C.; Hansen, P.; Rebelatto, C. L.; Senegaglia, A. C.; Miyague, N.; Olandoski, M.; Francisco, J. C.; Furuta, M. und Gremski, W. (2006): Cell transplantation after the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells in the regeneration of the myocardium scar: an experimental study in rats, *Transplant Proc* 38 [5], Seite 1596-602.
- [162] 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.
- [163] Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P. G. und Tredget, E. E. (2007): Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis, *Stem Cells* 25 [10], Seite 2648-59.
- [164] Jiang, C. Y.; Gui, C.; He, A. N.; Hu, X. Y.; Chen, J.; Jiang, Y. und Wang, J. A. (2008): Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction, *J Zhejiang Univ Sci B* 9 [8], Seite 630-7.
- [165] 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.
- [166] Krugliakov, P. V.; Sokolova, I. B.; Amineva Kh, K.; Nekrasova, N. N.; Viide, S. V.; Cherednichenko, N. V.; Zaritskii, A.Iu; Semerin, E. N.; Kisliakova, T. V. und Polyntsev, D. G. (2005): [The influence of mesenchymal stem cell transplantation time on

- myocardial reparation in rat experimental heart failure], *Tsitologiia* 47 [5], Seite 404-16.
- [167] Buller, A. J.; Kean, C. J. und Ranatunga, K. W. (1987): Transformation of contraction speed in muscle following cross-reinnervation; dependence on muscle size, *J Muscle Res Cell Motil* 8 [6], Seite 504-16.
- [168] Cramer, K. S. und Van Essen, D. C. (1995): Maturation of fast and slow motor units during synapse elimination in the rabbit soleus muscle, *Dev Biol* 171 [1], Seite 16-26.
- [169] Darr, K. C. und Schultz, E. (1987): Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle, *J Appl Physiol* 63 [5], Seite 1816-21.
- [170] Parmiggiani, F. und Stein, R. B. (1981): Nonlinear summation of contractions in cat muscles. II. Later facilitation and stiffness changes, *J Gen Physiol* 78 [3], Seite 295-311.
- [171] Malicdan, M. C.; Noguchi, S.; Hayashi, Y. K. und Nishino, I. (2008): Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM, *Physiol Genomics* 35 [1], Seite 106-15.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
Ca	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenstoffmonoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FT	Fast-Twitch
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein
GvHD	Graft-versus-host disease
HBOT	Hyperbare Sauerstofftherapie
HGF	Hepatocyte growth factor
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
ISCT	International Society for Cellular Therapy
M.	Musculus
Mm.	Musculi
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MTJ	Myotendinous junctions
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2H-Tetrazolium
N.	Nervus

N ₂ O	Distickstoffmonoxid
NaCl	Natrium Chlorid
NGF	Nerve growth factor
NOD	Non-obese diabetic
NSAID	Nicht-steriodale, anti-inflammatorische Medikamente
OI	Osteogenesis imperfecta
P / S	Penicillin / Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RICE	Rest, ice, compression, elevation
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immunodeficiency
ST	Slow-Twitch
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF	Tumornekrosefaktor

Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Tobias Winkler und Dr. Philip von Roth bedanken, die mir im Verlauf der gesamten Arbeit hilfreich zur Seite standen, und ohne die diese Arbeit nicht existieren würde.

Weiterhin waren mir bei meinen Arbeiten im molekularbiologischen und histologischen Labor des Julius-Wolff-Instituts Yasmin Müller und Gabriela Korus eine große Hilfe.

Meiner Familie, meiner Schwester Katharina Urbanski und meinen Eltern, Betina Storm-Urbanski und Dieter Urbanski, welche mich mein ganzes Studium unterstützt haben gilt, besonders großer Dank. Ohne sie wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen.

Erklärung

„Ich, Alexander Urbanski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Vergleich unmittelbarer versus verzögerter Transplantation autologer, mesenchymaler Stammzellen nach schwerem Muskeltrauma 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