

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät und dem BIH Center for Regenerative  
Therapies der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Histologische Analyse traumatisierter Skelettmuskulatur der  
Ratte nach Transplantation mesenchymaler Stromazellen  
mittels computergestütztem Segmentationsverfahren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Monika Christine Ehrentraut  
aus Dresden

Datum der Promotion: 21.06.2020

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	5
2	Zusammenfassung.....	6
3	Einleitung.....	8
3.1	Das chirurgische Dilemma.....	8
3.1.1	Iatrogene Traumata .....	8
3.1.2	Minimalinvasive Chirurgie.....	9
3.1.3	Auflösung des chirurgischen Dilemmas? .....	11
3.2	Das intrinsische Regenerationspotenzial des Skelettmuskels .....	12
3.2.1	Degenerativen Phase – der essentielle Beitrag der Immunzellen zur Regeneration.....	13
3.2.2	Regenerative Phase – Satellitenzellen dienen als Quelle neuer Muskelzellen .....	14
3.2.3	Remodeling – Bindegewebe und junge Muskelzellen beeinflussen sich gegenseitig .....	16
3.2.4	Fazit: das intrinsische Regenerationspotenzial ist limitiert .....	17
3.3	Bisherige Therapieoptionen.....	17
3.3.1	Konservative und chirurgische Behandlung .....	17
3.3.2	Medikamentöse Behandlung .....	18
3.3.3	Fazit: bisherige Therapien sind nicht ausreichend .....	19
3.4	Innovative Therapiekonzepte .....	19
3.4.1	Mesenchymale Stromazellen .....	19
3.4.2	Direkter vs. indirekter Wirkmechanismus .....	21
3.4.3	Tissue Engineering: eine synthetische Nische für MSC.....	22
3.5	Klinisch relevantes Muskeltrauma .....	23
3.6	Offene Fragen.....	23
3.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	24
4	Material und Methoden.....	25
4.1	Überblick Versuchsaufbau und Behandlungsgruppen .....	25
4.2	Versuchstiere.....	26
4.3	Gewinnung der mesenchymalen Stromazellen.....	26
4.3.1	Durchführung der Knochenmarksbiopsie .....	26
4.3.2	Isolation, Kultivierung und Expansion der mesenchymalen Stromazellen.....	27
4.4	Bereitstellung der Alginategele .....	27

4.4.1	Herstellung der Alginatepolymere .....	27
4.4.2	Erzeugung der makroporösen Alginategel-Struktur .....	28
4.4.3	Inkubation der Alginategele .....	28
4.5	Trauma und Transplantation .....	28
4.5.1	Quetschtrauma des M. soleus.....	28
4.5.2	Transplantation der Alginategele.....	29
4.6	Gewinnung der histologischen Proben und Kryokonservierung .....	29
4.7	Konzept der histologischen Auswertung .....	30
4.7.1	Herstellung der Kryoschnitte .....	31
4.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	31
4.7.3	Digitalisierung der histologischen Proben .....	32
4.8	Datenerhebung.....	32
4.8.1	Voraussetzungen für die Verwendung von ImageJ.....	32
4.8.2	Entwicklung der Programmabläufe in ImageJ.....	33
4.8.3	Validierung des halbautomatischen Segmentationsverfahrens in ImageJ.....	38
4.8.4	Erfassung der totalen Muskelzellichte und Differenzierung der Regeneratzellen.....	39
4.9	Statistische Auswertung .....	40
5	Ergebnisse .....	42
5.1	Methodische Ergebnisse – Validierung des computergestützten Verfahrens.....	42
5.1.1	Vergleich beider Verfahren in 15 Bildausschnitten.....	42
5.1.2	Systematische Beurteilung der Auswertung von Bildausschnitten mittels CSV .....	45
5.1.3	Vergleich beider Verfahren in drei kompletten Skelettmuskelquerschnitten.....	51
5.1.4	Zusammenfassung der methodischen Ergebnisse .....	52
5.2	Experimentelle Ergebnisse – Erfassung der totalen Muskelzellichte und Differenzierung der Regeneratzellen in regenerierenden Skelettmuskeln.....	52
5.2.1	Auswertung der totalen Muskelzellichte – Betrachtung des gesamten Muskels .....	53
5.2.2	Auswertung der totalen Muskelzellichte – Betrachtung der drei Verletzungsregionen .....	57
5.2.3	Auswertung der Regeneratzellichte und des Anteils der Regeneratzellen – Betrachtung des gesamten Muskels .....	60
5.2.4	Auswertung der Regeneratzellichte und des Regeneratzellanteils – Betrachtung der drei Verletzungsregionen .....	61
6	Diskussion .....	66

6.1	Diskussion der methodischen Ergebnisse .....	66
6.2	Diskussion der experimentellen Ergebnisse .....	73
6.3	Methodenkritik .....	79
6.4	Ausblick .....	81
7	Literaturverzeichnis .....	83
8	Eidesstattliche Versicherung .....	90
9	Lebenslauf .....	91
10	Publikationsliste .....	93
11	Danksagung .....	94

# 1 Abkürzungsverzeichnis

BMSC	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells</i>
CSV	computergestütztes Segmentationsverfahren
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
FAPs	<i>Fibro-adipogenic progenitor cells</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IHC	Immunhistochemie
MALDI-IMS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ ionization imaging mass spectrometry</i>
Mio.	Millionen
MIS	<i>Minimally invasive surgery</i>
MSC	<i>Mesenchymal stromal cells</i> - mesenchymale Stromazellen
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PLX	<i>Placenta-expanded adherent stromal cell product</i>
PRP	Plättchenreiches Plasma
RICE	Akronym für <i>rest, ice, compression, elevation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
SaC	<i>Satellite cells</i>
SE	<i>Standard error</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

## 2 Zusammenfassung

### *Deutsche Version*

**Einleitung:** Wiederholte und schwerwiegende Schädigungen der Skelettmuskulatur resultieren in einer unvollständigen Heilung, wobei die kontraktile Einheiten durch Fett- und Narbengewebe ersetzt werden. Aktuelle Therapieansätze zielen auf die Selbstheilungskapazität verletzter Skelettmuskulatur ab. Insbesondere zellbasierte Therapien mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) zeigten einen positiven funktionellen Einfluss in Form einer gesteigerten Muskelkraft. Welche Effekte auf histologischer Ebene durch MSC hervorgerufen werden, ist weitestgehend ungeklärt, da kaum standardisierte Verfahren für die Analyse zur Verfügung stehen. Mit dem Ziel, den Effekt der MSC anhand von zwei wichtigen histologischen Parametern — der totalen Muskelzellendichte sowie der Dichte der Zellen mit binnenständigen Kernen (Regeneratzellendichte) — näher untersuchen zu können, wurde daher für die hier vorgelegte Arbeit ein halbautomatisches, computergestütztes Segmentationsverfahren (CSV) entwickelt.

**Methodik:** Das zur Erfassung der beiden histologischen Parameter entwickelte CSV wurde zunächst anhand von fünf histomorphologischen Kriterien mit der manuellen Erfassung verglichen. Im experimentellen Teil erfolgte bei 36 weiblichen Sprague-Dawley Ratten ein standardisiertes Quetschtrauma im linken Musculus soleus. Unmittelbar nach Traumatisierung des Muskels wurde der Interventionsgruppe ( $n = 18$ ) ein Alginatgel mit 1 Mio. autologen MSC transplantiert, während der Kontrollgruppe ( $n = 18$ ) nur das Alginatgel transplantiert wurde. Nach 7, 28 sowie 56 Tagen (jeweils  $n = 6$ ) erfolgte die Entnahme der Mm. solei für die histologische Analyse. Zur Erfassung der totalen Muskelzell- und Regeneratzellendichte wurde das zuvor getestete CSV angewendet.

**Ergebnisse:** Zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Erfassung der histologischen Parameter. Mittels CSV konnte ein deutlicher Anstieg der totalen Muskelzellendichte im posttraumatischen Verlauf beobachtet werden. Sowohl in linken, verletzten als auch rechten, unverletzten Mm. solei der MSC-Gruppe wurde ein signifikanter Anstieg der totalen Muskelzellendichte nach 28 und 56 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. In der Kontroll- und MSC-Gruppe zeigte sich bis zu acht Wochen nach dem Trauma eine deutliche Erhöhung der Regeneratzellendichte in verletzten gegenüber unverletzten Muskeln. Während der Regeneratzellanteil der Muskeln aus der Kontrollgruppe an Tag 56 wieder stark abgefallen war, zeigte sich in der MSC-Gruppe ein gradueller Anstieg des Regeneratzellanteils.

**Schlussfolgerungen:** Das CSV stellt eine geeignete Methode zur Erfassung der totalen Muskelzell- und Regeneratzellendichte dar. MSC erhöhen die totale Muskelzellendichte in verletzten Muskeln, was eine mögliche Erklärung für die Kraftsteigerung darstellen kann. Die gleichzeitige Erhöhung der Zelldichte in unverletzten Muskeln deutet zudem auf einen systemischen Effekt der MSC hin. Unter MSC-Einfluss lässt sich eine anhaltende Regeneration beobachten.

## **English version**

**Introduction:** Severe muscle injury can result in an incomplete healing whereby the contractile fibers are replaced by fat and scar tissue. Current therapeutic approaches aim to support the regenerative capacity of skeletal muscle through the delivery of regenerative cells. In particular, cell-based therapies with mesenchymal stromal cells (MSC) already showed improved muscle function. However, the effects of MSC on the histological level are still unclear, as there are hardly any standardized methods available for analysis. The aim of this work is to investigate the influence of MSC-based therapy on two histological parameters — the total muscle cell density, and the differentiation of cells with centrally located nuclei (regenerated cells) — with a semi-automated algorithm (CSV) which was developed for the presented work.

**Methods:** The CSV developed to record the two histological parameters was first compared to manual assessment using five histomorphological criteria. In the experimental part, 36 female Sprague-Dawley rats underwent a standardized crush injury in the left soleus muscle. Immediately after traumatization of the muscle, the intervention group ( $n = 18$ ) was transplanted with an alginate gel with  $1 \times 10^6$  autologous MSC, while the control group ( $n = 18$ ) received only the alginate gel. After 7, 28, and 56 days ( $n = 6$ , respectively), the muscles were harvested for histological analysis. The previously tested CSV was then used to determine the total muscle cell density and the density of regenerated cells.

**Results:** The results indicated no significant difference between the manual detection and computer-assisted procedure of histological parameters. Using the CSV, a significant increase in total muscle cell density after trauma was observed. In both left, injured and right, uninjured muscles of the MSC-treated group, a significant increase in total muscle cell density was observed at 28 and 56 days, compared to the control group. Regenerated cell density of injured muscles in both groups increased significantly up to eight weeks after trauma compared to uninjured muscles. In the control group, a strong increase in the percentage of regenerated cells was observed on day 28. The MSC-treated muscles, however, showed a gradual increase in regenerated cell fraction along the entire recovery course.

**Conclusion:** The CSV is a suitable method for recording the total muscle cell density and regenerate cell density. MSC increase the total muscle cell density in injured muscles, possibly explaining the increase in muscle strength. The simultaneous increase in cell density in uninjured muscles indicates a systemic effect of the MSC. Under MSC influence, a prolonged regeneration can be observed.

## 3 Einleitung

### 3.1 Das chirurgische Dilemma

Eine 73-jährige Frau leidet an einer Arthrose des rechten Hüftgelenks. Daher muss sie mit einer Hüftendoprothese versorgt werden. Ein Eingriff, wie er tausendfach jährlich an deutschen Kliniken durchgeführt wird [1]. Eigentlich nicht weiter bemerkenswert, wäre da nicht das Problem der Zugangsmorbidität, welches jeden Chirurgen vor ein Dilemma stellt: *Um einen Schaden zu beseitigen, wird zunächst ein Schaden verursacht.*

Im oben dargestellten Fall bedeutet das konkret die Traumatisierung der Skelettmuskulatur, die das Hüftgelenk umgibt. Diese sogenannten iatrogenen Traumata bleiben oft nicht ohne Folgen für den Patienten. Trotz größter medizinischer Anstrengungen können sie nicht ganz verhindert werden. Die Skelettmuskulatur besitzt zwar ein natürliches Regenerationspotenzial, die vollständige Heilung ist jedoch durch das Ausmaß des Traumas begrenzt. Übersteigt dieses die Selbstheilungskapazität des Muskels, kommt es zu bleibenden Schäden. Bei der Behandlung von Muskelverletzungen wird daher versucht, dieses intrinsische Regenerationspotenzial des Muskels zu fördern. Die bisherigen konservativen Behandlungsmethoden zielen jedoch zu einseitig auf die Unterstützung der Selbstheilung ab. In jüngster Zeit wurden daher innovative zellbasierte Therapiekonzepte entwickelt, die auf multimodale Weise Einfluss auf die Muskelregeneration nehmen sollen [2].

#### 3.1.1 Iatrogene Traumata

Zugangsbedingte Schäden durch Operationen sind kaum zu vermeiden. Wie im oberen Abschnitt angedeutet, müssen für eine ausreichende Exploration des Operationsgebietes Verletzungen an verschiedenen Geweben in Kauf genommen werden. Neben der Inzision der Haut erfordert der operative Zugang zum jeweiligen OP-Gebiet auch die Durchtrennung von Gefäßen, Bindegewebe und Muskeln. Eine Traumatisierung betrifft die Skelettmuskulatur vor allem dann, wenn Operationen an Gelenken oder anderen anatomisch tief liegenden Strukturen durchgeführt werden. Neben der eingangs erwähnten Hüftendoprothetik sei etwa ein elektiver Eingriff an der Wirbelsäule als weiteres Beispiel angeführt. Bei diesen Operationen muss die Muskulatur zur Seite gedrückt, retrahiert oder sogar durchtrennt werden. Letzteres ist z. B. der Fall beim sogenannten transglutealen Zugang zum Hüftgelenk, bei dem es durch die notwendige iatrogene Inzision u. a. zur Schädigung des Musculus gluteus medius kommt [3]. Zu den postoperativen Komplikationen gehören eine Schwäche der Hüftabduktion mit Einschränkungen des Gangbildes und Schmerzen [4]. Die Glutealinsuffizienz mit dem für sie typischen Trendelenburg-Hinken kann zudem verstärkt werden, wenn der Nervus gluteus superior versehentlich verletzt wird [3].

Funktionelle Einschränkungen dieser Art zeigen sich auch nach Wirbelsäulenoperationen wie z. B. der lumbalen Lendenwirbelfusion. Das morphologische Korrelat in Form einer fettigen Atrophie und Degeneration im betroffenen Muskelareal konnte dabei von Hartwig et al. auch 12 Monate nach OP nachgewiesen werden [5].



### 3.1.2 Minimalinvasive Chirurgie

Während bis Ende des letzten Jahrhunderts vornehmlich auf die Verbesserung prothetischer Materialien und die Entwicklung von abriebarmen Gleitpaarungen hingearbeitet wurde, rückte zuletzt auch die Zugangsmorbidität ins Zentrum des Interesses der Orthopädie [3]. Um zugangsbedingte Schäden am gesunden Gewebe so gering wie möglich zu halten, wurde daher die Entwicklung der minimalinvasiven Chirurgie stark vorangetrieben. Diese ist mittlerweile in allen chirurgischen Fachdisziplinen als Alternative zu vielen konventionellen OP-Verfahren fest etabliert, weil sie zu weniger Schmerzen und zu einer schnelleren Genesung führen soll.

Während in der Öffentlichkeit der kleinere Schnitt hinsichtlich der Ästhetik in den Vordergrund gerückt wird, besteht der wesentliche Vorteil des minimalinvasiven Zugangs in der Schonung der Weichteile wie Muskulatur und Muskelansätze. In der Studie von Kulkarni et al. konnte gezeigt werden, dass die Anwendung einer minimalinvasiven Technik zur Versteifung von Wirbelsäulensegmenten im Gegensatz zur offenen Durchführung mit geringerem Blutverlust, verkürztem Krankenhausaufenthalt und vor allem mit einem weniger ausgeprägten Gewebstrauma einherging [6]. Weitere Vorteile sind weniger postoperative Schmerzen und die Möglichkeit zur früheren Mobilisation [7].

Der Effekt minimalinvasiver Techniken auf die Schonung der Weichteile wurde auch im Zusammenhang mit der Implantation von Hüftendoprothesen vielfach diskutiert. Müller et al. gelang in einer randomisierten Studie der Nachweis, dass der minimalinvasive anterolaterale Zugang einem modifizierten transglutealen Zugang in Hinsicht auf das funktionelle Resultat und auf morphologische Veränderungen des M. gluteus medius überlegen war [8]. Letzteres zeigte sich in der signifikant verringerten Darstellung von fettiger Atrophie des Muskels sowohl nach drei als auch nach 12 Monaten in einer Magnetresonanztomographie-Analyse. Auch Böhm et al. konnten im Vergleich zum konventionellen Zugang eine signifikant schnellere Rückkehr zu einem normalen Gangbild auf die Anwendung der minimalinvasiven anterolateralen Yale-Technik zurückführen [9]. Ihre Ergebnisse unterstrichen einen Zusammenhang zwischen einer geringeren Verletzung der Muskulatur durch die günstigere Schnittführung des minimalinvasiven Zugangs (MIS) und einer dadurch schnelleren Rehabilitation.

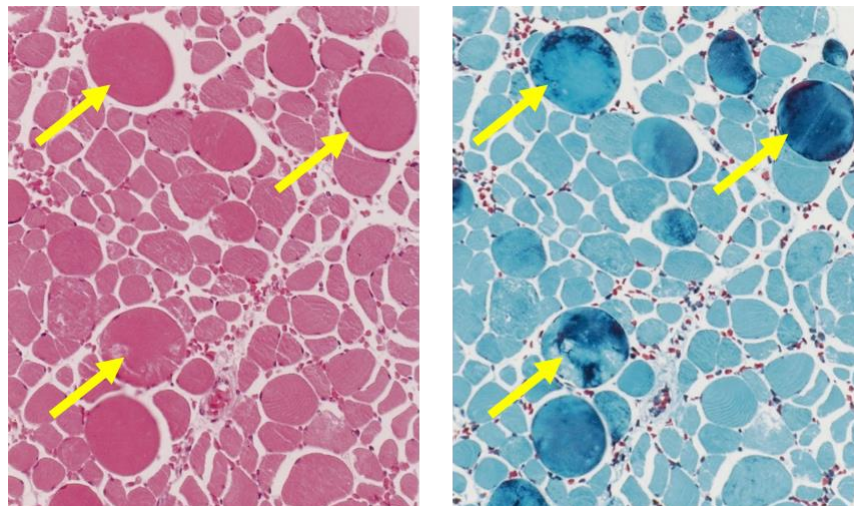
Wie ausgeprägt der Schaden an der Muskulatur nach einem operativen Eingriff ist, kann nicht nur in Form der oben beschriebenen Läsionen nachgewiesen, sondern auch indirekt nachvollzogen werden. So weist beispielsweise der Anstieg der biochemischen Marker Myoglobin und Creatin-Kinase auf eine Schädigung der Skelettmuskulatur hin [10]. Die Bestimmung dieser Marker ist daher neben funktionellen und bildgebenden Parametern eine weitere Größe, die zur Evaluation eines Muskelschadens nach Durchführung einer Hüftendoprothetik herangezogen werden kann [10]. Dabei scheint es in Hinsicht auf die Erhöhung der Marker auf die jeweilige Technik anzukommen, wobei die minimalinvasiven Techniken im Vergleich zu den konventionellen Zugängen mit einer geringeren Erhöhung einhergehen [8, 10, 11].

Die Evaluation des Muskelschadens kann neben der Untersuchung indirekter Marker oder bildgebender Verfahren auch in Form der direkten Begutachtung des Gewebes erfolgen. In einer Kadaverstudie verglichen van Oldenrijk et al. den postoperativen Weichteil- und Nervenschaden verschiedener MIS mit dem konventionellen transglutealen Zugang bei Hüftoperationen. Dabei erwies sich jedoch keine der

ausgeführten minimalinvasiven Schnitttechniken als signifikant besser im Vergleich zum konventionellen transglutealen Zugang in Hinsicht auf den prozentualen Anteil beschädigter Muskelzellen [12].

Der klinische Nutzen minimalinvasiver Techniken wird zudem durch intra- und postoperative Komplikationen relativiert. Es wird befürchtet, dass es aufgrund der beschränkten Einsehbarkeit des OP-Gebiets zu einer erhöhten Fehlpositionierung der Implantate kommt [13]. Manche Techniken zeigten sich außerdem anfälliger für Nervenschädigungen, wie beispielsweise das versehentliche Durchschneiden des N. cutaneus femoris lateralis beim *MIS anterior approach* und beim *MIS 2-Incision approach* [12]. Das Risiko für eine Nervendurchtrennung kann durch die stumpfe Präparation des OP-Gebiets minimiert werden. Allerdings können Nerven, die die Oberschenkelmuskulatur versorgen, allein schon durch den erhöhten Druck der Retraktoren auf die Wundränder in Mitleidenschaft gezogen werden. Bei Anwendung der posterioren und anterolateralen Minischnitttechnik wurde ein doppelt so hoher Druck zwischen Wundrändern und Retraktoren im Vergleich zur konventionellen Annäherung gemessen [14].

In histologischen Untersuchungen lassen sich wie in der Magnetresonanztomographie fettige Muskelatrophien und -degenerationen durch die Anwendung verschiedener Präparations- und Färbemethoden charakterisieren. Die Studie von Gille et al. erbrachte den Nachweis, dass die Dauer der Dehnung negative Auswirkungen auf die Gewebestruktur hat. Demnach lag eine positive Korrelation zwischen der Zeit, die der Muskel vom Wundspreizer gedehnt wurde, und dem Ausmaß histologisch nachweisbarer Läsionen in der Dehnungsregion vor [15]. Diese konnten unmittelbar nach OP in Form von Ödemen und hyperkontrahierten, abgerundeten Muskelzellen in der konventionellen Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) nachgewiesen werden [15]. Tabata entdeckte diese morphologischen Veränderungen auch in der Skelettmuskulatur des Halses, nachdem diese intravital gequetscht worden war (Abb. 1) [16].



**Abbildung 1: Hyperkontrahierte Skelettmuskelzellen nach Kompression.** Tabata entdeckte hyperkontrahierte Muskelzellen (*opaque fibers*; gelbe Pfeile) in der Skelettmuskulatur des Halses, nachdem diese intravital gequetscht worden war; links HE-Färbung, rechts modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung, 200-fache Vergrößerung; modifiziert aus Tabata [16], abgebildet mit Erlaubnis von Elsevier.

Von Kawaguchi liegen detaillierte Beschreibungen vor, mit welchen histologischen Veränderungen nach operativen Eingriffen an der Skelettmuskulatur zu rechnen ist. Bereits 1994 führte er histologische Untersuchungen nach Eingriffen an der lumbalen Wirbelsäule durch. Sowohl im Tierexperiment an Ratten, als auch unter klinischen Bedingungen bei Patienten konnte eine gesteigerte Formation von Narbengewebe und Muskelzellatrophie der Rückenmuskulatur im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden [17, 18].

Neben den oben beschriebenen intraoperativen Problemen, können Minischnitttechniken auch das Risiko für postoperative Komplikationen wie etwa Wundinfektionen erhöhen [13]. In einer Studie von Woolson et al. wurde der Einfluss einer max. 10 cm langen Inzision während einer Hüftprothesenimplantation auf die Dauer des Krankenhausaufenthalts untersucht. Sie fanden weder einen Hinweis auf einen geringeren Blutverlust noch auf einen geringeren Gewebeschaden im Vergleich zur Standardinzision. Jedoch ließen sich in der Gruppe, die den Minischnitt erhalten hatte, signifikant häufiger postoperative Infektionen nachweisen, die mit Antibiotikagabe therapiert werden mussten und damit schlussendlich zu einem längeren Aufenthalt geführt hatten [13].

Einige Meta-Analysen betonen nach wie vor, die entscheidenden Vorteile der minimalinvasiven Chirurgie lägen in einem kürzeren Krankenhausaufenthalt und einem verbesserten funktionellen Ergebnis [19, 20]. Zu diesem Urteil kommen auch die Autoren einer Gesamtübersicht zur Relevanz minimalinvasiver Zugangswege in der Hüftendoprothetik. In ihrer Zusammenschau präzisieren Schmolders et al. jedoch, dass sich diese oben genannten verbesserten funktionellen Ergebnisse meist nur auf einen kurzen Beobachtungszeitraum von einem Jahr beziehen [21]. Über diesen Zeitraum hinaus konnten sie keine Überlegenheit der minimalinvasiven Zugangswege gegenüber dem Standardzugang feststellen, weil Studien der Evidenzgrade I und II zu Mittel- und Langzeitergebnissen schlichtweg nicht existent sind. Weiterhin mangelte es den Studien an ergänzenden bildmorphologischen Untersuchungen zu den tatsächlich entstehenden Muskelschäden bei Minischnitten. Kennon et al. bemerkten dazu: „*A smaller skin incision is desirable for cosmetic reasons and decreased healing times, but what goes on beneath the skin is far more important*“ [22].

Die mangelhafte Beweisführung steht damit im Widerspruch zu dem allgemein erklärten Ziel der Muskel- und Weichteilschonung [23]. Manche Fachleute gehen sogar soweit, den Erfolg der OP nicht vom Zugangsweg, sondern gänzlich von der Erfahrung des Operateurs abhängig zu machen – getreu dem Motto, minimalinvasiv ist gut, aber mach das, was du am besten kannst [3]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Einführung der Minischnitttechnik im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie bisher nur ungenügend zu einer Entschärfung der Problematik iatrogenen Traumata beigetragen hat.

### **3.1.3 Auflösung des chirurgischen Dilemmas?**

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung ist davon auszugehen, dass die Zahl der Primärimplantationen von Hüftendoprothesen im nächsten Jahrzehnt weiter ansteigen wird [24]. Auch die Frequenz der Revisionseingriffe wird entsprechend zunehmen [24], da aseptische Lockerungen der Prothesen, allgemeine Instabilität oder tiefe Infektionen dem Ziel einer dauerhaften Prothesenverankerung im Hüftbereich entgegen wirken [25]. Wie von Roth et al. zeigen konnten, wirkten sich wiederholte Prothesenwechsel jedoch negativ

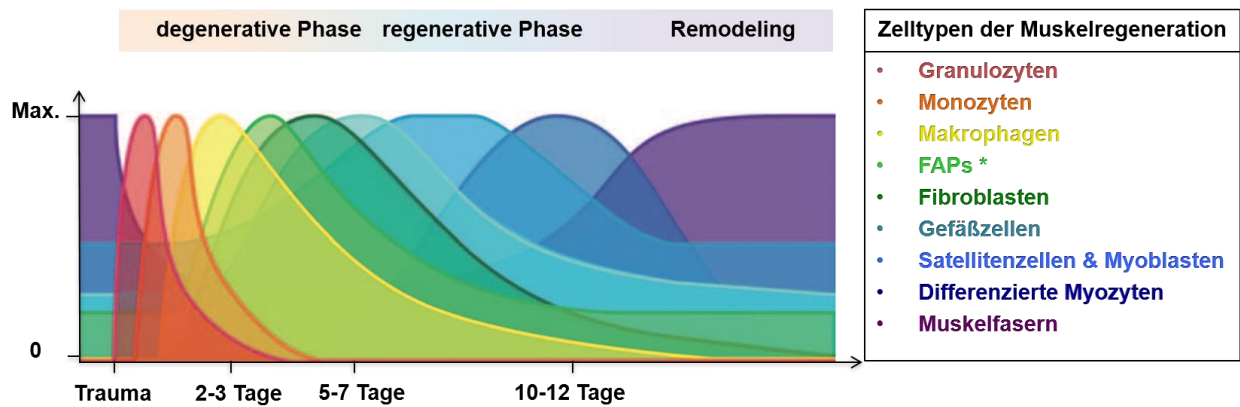
auf die hüftumgebende Muskulatur aus, da Revisionen eine signifikante fettige Atrophie der Muskulatur und damit ein eingeschränktes funktionelles Ergebnis hervorriefen [26].

Posttraumatisch beginnen biologische Prozesse, die normalerweise die Rückbildung der pathologischen Gewebeveränderung bewirken. Die Skelettmuskulatur kann mit ihrem effizienten Reparatursystem sogar eine vollständige Heilung ohne bleibende Narben erreichen [27]. Warum jedoch gerade wiederholte chirurgische Interventionen bzw. schwere Gewebstraumata einen Verlust kontraktile Einheiten provozieren, soll im Folgenden erläutert werden.

### 3.2 Das intrinsische Regenerationspotenzial des Skelettmuskels

Die Reparaturen lokaler Schäden, die durch den täglichen Verschleiß an subzellulären Strukturen der Muskelzellen entstehen, laufen nahezu ständig, unbemerkt und rasch ab [28, 29]. Auch der ziehende Schmerz, der sogenannte Muskelkater, der einem nach körperlicher Überanstrengung in die Glieder fährt, verschwindet nach ein paar Tagen wieder, ohne dass dieser einer größeren Behandlung bedürfte [30]. Diese Formen von lokal begrenzten Zellschäden sind reversible Geschehen, die nur transitorisch inflammatorische Prozesse und keine bleibenden histologischen Veränderungen hervorrufen [29].

Anders verhält es sich bei schweren Muskeltraumata. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Szenarien kann es bei Kontusions- und Kompressionsverletzungen zum Untergang ganzer Muskelzellen bis hin zu mehreren Fasersegmenten kommen [31, 32]. Diese Art von Verletzung triggert eine ganze Reihe gut orchestrierter Vorgänge, die zusammenfassend als **Regeneration** bezeichnet werden. Der Regenerationsprozess lässt sich im Wesentlichen in drei Phasen einteilen [29]. Der Untergang der Muskelzellen, auch als Nekrose bezeichnet, stimuliert eine inflammatorische Antwort [33], die mit der Ausschüttung verschiedener Botenstoffe und der Invasion von Makrophagen einhergeht [34]. Dieser Abschnitt der Regeneration wird als **degenerative Phase** bezeichnet [33]. Fast zeitgleich und in ständiger Wechselwirkung mit den vorangegangenen Ereignissen beginnt die sogenannte **regenerative Phase** [35]. Diese wird durch die Phagozytose des Zelldebris eingeleitet [33]. Charakterisiert ist dieser Vorgang vor allem durch die proliferierenden Satellitenzellen (SaC) [36]. Aus diesen muskelspezifischen Stammzellen gehen fusionskompetente Myoblasten hervor [33], die drei bis fünf Tage nach Trauma schließlich neue Muskelzellen formen [37, 38]. Damit ist die dritte Phase der Muskelregeneration, das **Remodeling**, erreicht, während der die Reorganisation aller muskelbildenden Zellen und Gewebekomponenten im Vordergrund steht [38]. Welche Bedeutung der einzelnen Phasen innerhalb der Muskelregeneration zukommt, soll im Folgenden eingehend erläutert werden.



**Abbildung 2: Phasen der Muskelregeneration.** Zeitlicher Ablauf der einzelnen Phasen der Muskelregeneration mit relativer Präsenz der jeweiligen phasenspezifischen Zelltypen; FAPs\* - fibro-adipogene Vorläuferzellen; modifiziert aus Bentzinger et al. [39], abgebildet mit Erlaubnis von John Wiley and Sons.

### 3.2.1 Degenerativen Phase – der essentielle Beitrag der Immunzellen zur Regeneration

Ausschlaggebend für die Nekrose einer Muskelzelle ist die Unterbrechung der Zellmembran [37]. Dadurch kommt es zum pathologischen Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Zelle. Es werden calcium-abhängige, verdauende Enzyme aktiviert, die eine Dissoziation der kontraktilen Elemente (Myofibrillen) und den Abbau anderer zellulärer Bestandteile bewirken [37]. Der Zerfall zellulärer Strukturen aktiviert die inflammatorischen Immunzellen, die sich innerhalb des Muskels befinden [37]. Diese wiederum locken über chemotaktische Signale weitere im Blut zirkulierende Entzündungszellen an [34]. Typisch für diese erste Phase der Inflammation ist zunächst das Auftreten von neutrophilen Granulozyten, wie in der Abbildung 2 dargestellt. Sie reichern sich in den ersten ein bis sechs Stunden in hoher Zahl im Traumagebiet an, wo sie mit der Phagozytose nekrotischer Zellen beginnen [34, 37]. Etwa 48 Stunden später dominieren dann Makrophagen das Areal [37]. Diesen ebenfalls phagozytierenden Zellen hatte man lange bloß die Rolle der *Scavenger* zugestanden, die lediglich mit dem Wegräumen von Zelldebris beauftragt sind. Mittlerweile weiß man, dass Makrophagen sogar entscheidend die Muskelregeneration fördern [27, 29]. Man unterscheidet zwei Subpopulationen. Der Typ 1 ist für die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), verantwortlich [29]. Diese Faktoren halten zunächst die Entzündungsreaktion weiter aufrecht. Sie haben aber auch einen proliferationsfördernden Effekt auf die muskelspezifischen Stammzellen [40], was die Bedeutung der Makrophagen für die Einleitung der regenerativen Phase verdeutlicht. Werden diese Zellen unterdrückt, kommt es zu einer insuffizienten Muskelheilung [41, 42]. Nach etwa vier bis sieben Tagen sorgt schließlich der Typ 2, der durch einen Phänotypenwechsel aus Typ 1 hervorgeht, für die Beendigung der inflammatorischen Phase [29, 39, 43]. Das geschieht vordergründig durch die Sekretion anti-inflammatorischer Faktoren wie Interleukin-10 und Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) [29, 41]. Diese Botenstoffe stimulieren die Differenzierung myogener Zellen [40, 41], was den Übergang zur regenerativen Phase kennzeichnet.

Eine weitere inflammatorische Zellpopulation sollte im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Phänotypenwechsel nicht unerwähnt bleiben. Die CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Lymphozyten (Treg), die gemeinsam mit anderen T-Zellen das Traumagebiet infiltrieren, scheinen den Wechsel vom Makrophagen Typ 1 zu Typ 2 zu fördern [44]. Auf diese Weise nehmen Treg indirekt Einfluss auf die Einleitung der regenerativen Phase. Darüber hinaus lässt sich aus verschiedenen Studien auch ein direkter Einfluss dieser T-Zellen

auf die Wiederherstellungsphase ableiten [43, 45]. Dabei soll der mit Treg assoziierte Wachstumsfaktor Amphiregulin eine Rolle bei der Vermehrung der muskelspezifischen Stammzellen spielen [43].

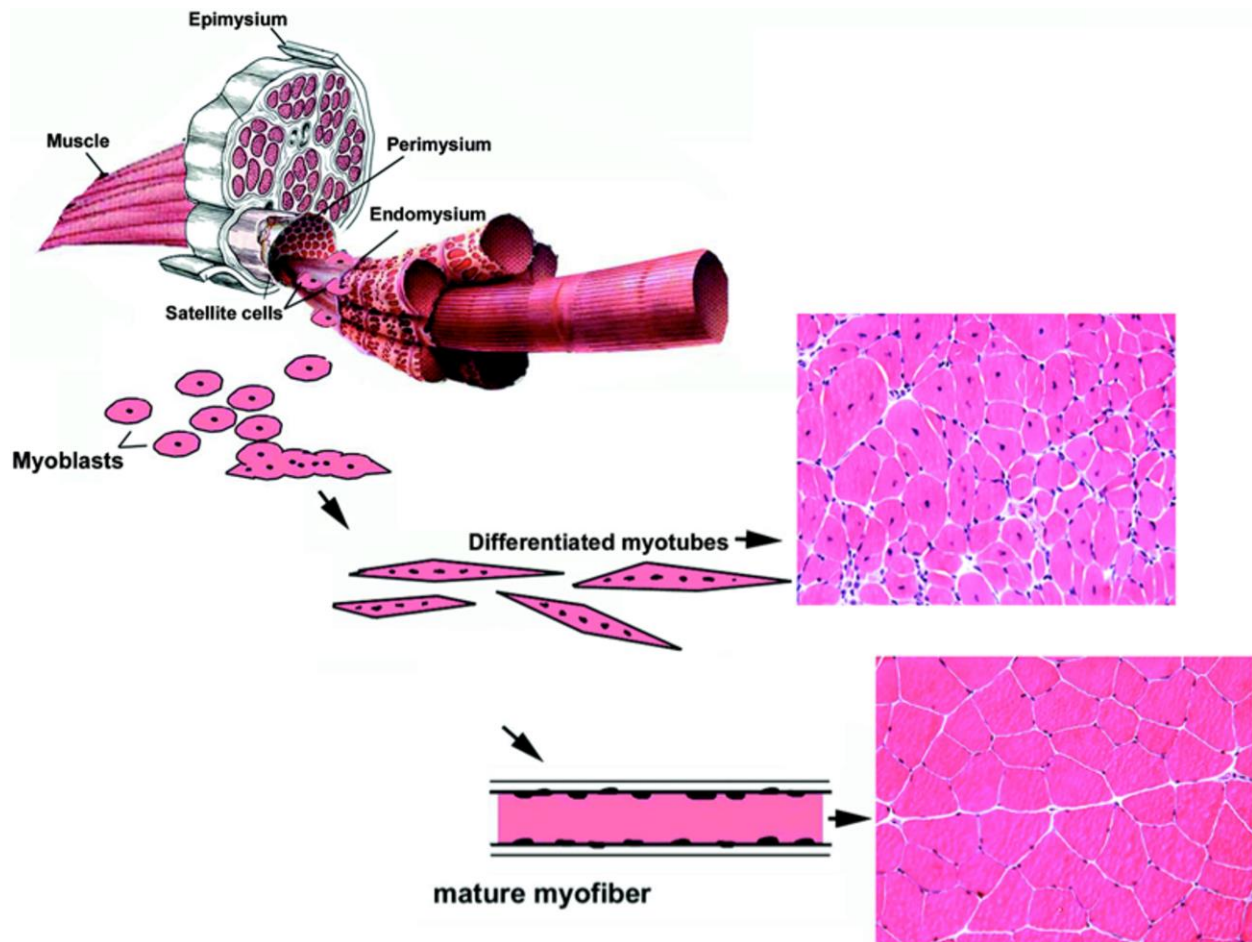
### **3.2.2 Regenerative Phase – Satellitenzellen dienen als Quelle neuer Muskelzellen**

Die regenerative Phase wird von den muskelspezifischen Stammzellen, den SaC geprägt. Sie befinden sich in einer spezialisierten Nische zwischen Sarkolemm und Basallamina der Muskelzellen. Unter normalen Bedingungen liegen sie dort in einem ruhenden Zustand vor. Bereits 1961 vermutete Mauro, dass es sich bei diesen mononukleären Zellen um eine Art Stammzelle handelt, die an der Wiederherstellung von Muskelzellen beteiligt ist [46]. Diese Vermutung konnte u. a. durch die in vivo Experimente von Collins et al. bestätigt werden, in welchen sie abladiertes Muskelgewebe durch die Transplantation von SaC wieder zur Regeneration anregen konnten [47].

Auch unter nicht experimentellen Bedingungen kommt es zu einer Reaktivierung der zuvor mitotisch inaktiven Zellen. Die tägliche Beanspruchung der Muskulatur macht einen basalen Stoffwechsel erforderlich, der der Erhaltung der vielkernigen Muskelzellen dient [29]. Für diesen Grundbedarf stehen SaC als Quelle von Zellkernen zur Verfügung [48]. Wachstumsfördernde Signalstoffe wie z. B. Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) und Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) veranlassen, dass sie aus ihrem inaktiven Zustand austreten [49, 50]. Sie beginnen sich symmetrisch oder asymmetrisch zu teilen [28, 51]. Im ersten Fall entstehen zwei Tochterzellen mit den Eigenschaften einer Satellitenzelle [52]. Bei der asymmetrischen Teilung verbleibt eine Zelle mit den Merkmalen einer SaC, was zum Erhalt des Stammzellpools beiträgt [52]. Die andere Zelle differenziert zu einer Muskelvorläuferzelle [28]. Dieser sogenannte Myoblast fusioniert mit bereits bestehenden Muskelzellen [53]. Mehrere dieser Vorläuferzellen können zu einem mehrkernigen Synzytium verschmelzen, um so eine neue Muskelzellen zu bilden [53]. Welche Art der Differenzierung die aktivierte SaC letztlich eingeht, ist u. a. von den myogenen Regulatorfaktoren Myf5 und MyoD abhängig [54].

Während die Zellkerne reifer Muskelzellen peripher angeordnet sind, können regenerierende Muskelzellen anhand ihrer binnenständigen Kerne identifiziert werden [55]. Dieses Phänomen von einem Kern bis zu mehreren Kernen im Zytoplasma kann sowohl in Muskellängs- als auch in Muskelquerschnitten beobachtet werden, sobald die ersten Myoblasten fusionieren. In Abhängigkeit des Traumas können Zellen mit binnenständigen Kernen mehrere Wochen im Muskel beobachten werden [56]. In Querschnitten sind junge Muskelzellen aufgrund ihres geringen Kalibers besonders gut von reifen Muskelzellen abzugrenzen [28]. Binnenständige Kerne und ein geringer Zelldurchmesser werden daher in histologischen Muskelschnitten als Regenerationszeichen interpretiert [57]. Zudem enthält das Zytoplasma von regenerierenden Muskelzellen viel ribosomale RNA, welche Ausdruck einer erhöhten Proteinsynthese ist. In der HE-Färbung zeigen junge Muskelzellen daher ein violette Zytoplasma [58]. Vollständig wiederhergestellte Muskelzellen lassen sich morphologisch nicht mehr von unverletzten Zellen unterscheiden [33].





**Abbildung 3: Binnenständige Kerne in regenerierenden Muskelzellen.** In Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Muskelquerschnitten lassen sich unreife Muskelzellen besonders gut an ihren binnenständigen Kernen erkennen; Abbildung aus Huard et al. [35], abgebildet mit Erlaubnis von Wolters Kluwer Health, Inc.

Unter bestimmten Bedingungen kann die Bildung neuer Muskelzellen jedoch auch unvollendet bleiben. Obwohl innerhalb derselben Basallamina gelegen, bleibt die Fusion von Myoblasten aus, was schließlich zur Bildung von Myoblastenclustern führt [29]. Die laterale Fusion von Myotuben mit intakten Muskelzellen kann auch unvollständig bleiben, was sich in Muskelquerschnitten gut nachvollziehen lässt. Bei dieser Erscheinung spricht man von *forked fibers* - gegabelten Muskelzellen [29]. Ursächlich dafür ist möglicherweise eine unzureichende Phagozytose während der degenerativen Phase [57]. Neben diesen beschriebenen Fehlentwicklungen hat auch die ausbleibende Fusion zweier gegenüberliegender Zellstümpfe negative Auswirkungen auf die muskuläre Kontraktilität [57].

Viele weitere Zellarten sind mittlerweile identifiziert worden, die wie SaC zur Muskelregeneration beitragen [49]. Ortständige Zellen wie Perizyten, Endothelzellen und interstitielle Zellen offenbarten in verschiedenen Experimenten myogene Kapazitäten [53, 59]. Auch Zellen mit Stammzellcharakter, die nicht unmittelbar aus der Umgebung des Muskels stammen, sind in der Lage, sich in eine myogene Linie zu entwickeln oder Muskelzellen durch Fusion aufzubauen. Zu ihnen gehören z. B. die im peripheren Blut zirkulierenden Zellen mit hämatopoetischen Oberflächenmarkern [37, 60]. Unter experimentellen Bedingungen konnte zwar nach Verletzung ein Anstieg der Fusionsrate dieser Zellen registriert werden [61], wie groß jedoch die

physiologische Relevanz dieser Fusionen der Nicht-Satellitenzellen im Rahmen der Muskelregeneration ist, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden [39].

### **3.2.3 Remodeling – Bindegewebe und junge Muskelzellen beeinflussen sich gegenseitig**

Die abschließende Phase ist durch die Reorganisation des muskulären Stützgewebes charakterisiert. Dieses Gewebe besteht hauptsächlich aus Bindegewebszellen (Fibroblasten), welche für die Bildung der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, und aus Fettzellen (Adipozyten) und fibro-adipogenen Vorläuferzellen (FAPs) [38]. In gesundem Skelettmuskel überziehen drei verschiedene Bindegewebschichten die longitudinal angeordneten Muskelzellen: Das Endomysium umgibt die einzelnen Muskelzellen, das Perimysium bündelt wiederum mehrere Muskelzellen zu Faszikeln und das Epimysium umhüllt den gesamten Muskel [62]. Diese Schichten haben eine stützende und schützende Funktion bei der muskulären Kontraktion [62]. Außerdem ermöglichen sie die Kraftübertragung auf die Sehnen [39].

Während der Regeneration findet ein intensiver Austausch zwischen den Stützzellen und den jungen Muskelzellen statt. Die FAPs beginnen nach dem Trauma zu proliferieren, wobei sie trophische Faktoren sezernieren, die die Myoblasten zur Differenzierung anregen [38]. Umgekehrt konnte während in vitro Experimenten festgestellt werden, dass der direkte Zellkontakt mit sich differenzierenden Muskelzellen wiederum die Entwicklung von FAPs in Adipozyten hemmt [54]. Während der Remodeling-Phase nehmen die jungen Muskelzellen an Umfang zu und ihre Kerne wandern vom Zentrum in die Peripherie [55]. Aufgrund der erhöhten Proteinsynthese haben wachsende Muskelzellen einen starken Nährstoffbedarf, der ein umfangreiches Stoffaustauschsystem notwendig macht. Winkler et al. konnten bereits vier Tage nach Quetschtrauma erste Kapillargefäße im Muskel nachweisen, die sich während des Remodelings zu einem gleichmäßig verzweigten Gefäßsystem entwickelten [63]. Zudem kommt es in dieser Phase zur Reinnervation der neuen Muskelzellen, welche von den Nervenästen der nicht beschädigten Muskelzellen ausgeht [54]. Neu gebildete myotendinöse Verbindungen zwischen den Muskelzellen und Sehnen ermöglichen schließlich die Kraftübertragung auf den Knochen [39]. Nach Beendigung der regenerativen Antwort geht die Zahl der FAPs und Fibroblasten wieder zurück auf ihre ursprüngliche Anzahl [38]. Das Skelettmuskelgewebe kehrt in einen homöostatischen Zustand zurück, in welchem auch die Satellitenzellen wieder ihre ruhende Position einnehmen [39].

Im Idealfall ist der Aufbau der ursprünglichen Gewebearchitektur nach etwa einem Monat abgeschlossen [38]. Eine ungestörte Reorganisation des muskulären Stützgewebes ist notwendig, weil es als Gerüst für die präzise Anordnung der regenerierenden Muskelzellen dient, um so eine optimale Kraftübertragung zu erreichen [54, 64]. Treten jedoch wiederholt Verletzungen auf, kommt es zu einer übersteigerten Proliferation der extrazellulären Matrix (ECM), was auch als Fibrose bezeichnet wird [38]. Dabei hemmt der profibrogene Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  1 die Aktivierung und Differenzierung der Satellitenzellen [62]. Unter dem Einfluss dieses Signalmoleküls kommt es zudem zur Transformation der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche ECM Proteine produzieren, darunter auch Kollagen I und III [65]. Bei schweren Muskeltraumata persistiert dieser Zelltyp im Zuge der anhaltenden Entzündung durch die lokale Ausschüttung von TGF- $\beta$  1, was vor allem zur abnormalen Anhäufung von Kollagen I führt [65]. Daraus resultiert ein irreversibles Narbengewebe, welches nun eine Barriere für die sich entwickelnden Muskelzellen darstellt und somit zu einem Verlust der ursprünglichen muskulären Kontraktilität führt [66, 67].



### 3.2.4 Fazit: das intrinsische Regenerationspotenzial ist limitiert

Das intrinsische Regenerationspotenzial des Skelettmuskels genügt, um eine vollständige Heilung lokaler Schäden bis hin zu kleineren Verletzungen wie Zerrungen zu gewährleisten [37]. Bei eingehender Untersuchung der drei Phasen wird jedoch ersichtlich, dass jegliche Abweichung, sei es in der inflammatorischen Antwort, der Aktivierung der Satellitenzellen oder innerhalb der Signalkaskaden, zu einer unvollendeten Regeneration führen kann [68]. Verletzungen mit ausgedehntem Substanzverlust übersteigen schlicht die muskuläre Regenerationskapazität [69]. Repetitive Verletzungen, wie sie bei Revisionen von Hüftprothesen vorkommen, sorgen durch die wiederkehrende Entzündungsreaktion für die Bildung von minderwertigem Bindegewebe [67]. Das Regenerationspotenzial der Skelettmuskulatur ist demnach begrenzt und stößt in Folge der eingangs erwähnten Interventionen an seine natürlichen Grenzen [35].

## 3.3 Bisherige Therapieoptionen

Der vorangegangene Abschnitt beschreibt neben den Limitationen der Muskelregeneration auch die Vielfalt der am Regenerationsprozess beteiligten Zellpopulationen, Signalwege und Botenstoffe [38], welche verschiedene therapeutische Ansätze ermöglichen. Momentan kann man zwischen konservativer, chirurgischer und medikamentöser Behandlung unterscheiden.

### 3.3.1 Konservative und chirurgische Behandlung

Das Therapiekonzept *RICE* stellt eine konservative Methode dar, bei der unmittelbar nach Verletzung der betroffene Muskel nicht weiter beansprucht werden soll (*R = rest*), lokale Kühlung empfohlen wird (*I = ice*), ein Druckverband auf die Begrenzung der Schwellung abzielt (*C = compression*) sowie die betroffene Extremität hochgelagert werden soll (*E = elevation*). Die Kombination dieser einfachen Maßnahmen hat breite Anwendung in der Sportmedizin gefunden, obwohl keine evidenzbasierten Untersuchungen deren Wirksamkeit belegen [70], bzw. die Methoden im Einzelnen kritisch betrachtet werden. Beispielsweise ist auf der einen Seite eine sofortige Immobilisation notwendig, um das Risiko eines *rerupture* der Muskelfasern zu verringern [71]. Auf der anderen Seite ist eine langfristige Immobilisation wiederum nicht förderlich, weil sie zu einer deutlichen Muskelatrophie des betroffenen Areals führt [71]. Zudem wird das Konzept der Kryotherapie momentan kontrovers diskutiert. Während in einer Studie an Ratten die Anwendung von Kälte nach Quetschtrauma durch eine reduzierte Leukozyten-Endothel Interaktion zu einer geringeren Ausdehnung des Ödems führte [72], zeigte die Applikation von Kälte in einer anderen Studie eine erschwerte Regeneration der Muskelzellen sowie mehr Kollagenablagerung, was auf eine verzögerte Aktivität der Makrophagen zurückgeführt wurde [73]. Während das Konzept *RICE* zwar insgesamt darauf abzielt, die Ausbreitung von Blutergüssen und Ödemen einzudämmen, erscheinen die regenerativen Effekte der einzelnen Maßnahmen auf molekularer Ebene zum Teil noch widersprüchlich.

Im Falle von voluminösen Hämatomen oder schweren Muskeltraumata greifen die oben beschriebenen konservativen Methoden zudem nicht mehr. Zum Beispiel erfordern schwere Verletzungen häufig eine Entfernung von nekrotischem Gewebe. Dem irreversiblen Substanzverlust begegnet man mit der nachträglichen Defektdeckung durch benachbartes Ersatzgewebe. Diese sogenannten Muskellappenplastiken

haben wiederum Funktionseinbußen an der Entnahmestelle zur Folge und erzielen auch im Zielgebiet nie die ursprüngliche Funktion [74].

### 3.3.2 Medikamentöse Behandlung

Sofern die Verletzung keine chirurgische Intervention erforderlich macht, wird versucht durch den Gebrauch von Medikamenten Einfluss auf die Muskelregeneration zu nehmen. Der Einsatz von Nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wie etwa Ibuprofen oder Diclofenac wird dabei kontrovers diskutiert. Ihr schmerzlindernder Effekt erscheint einerseits im Sinne einer frühzeitigen Mobilisation durchaus wünschenswert, allerdings kaschiert er auch protektive Schmerzreize und begünstigt durch eine verfrühte Belastung Rezidivverletzungen [75]. Neben analgetischer Wirkung modulieren NSAR durch ihre Hemmung der Prostaglandinsynthese auch entzündliche Prozesse. Eine kurzfristige Einnahme von NSAR über zwei bis drei Tage nach Muskeltrauma wird demnach grundsätzlich befürwortet [71, 75]. Vor einer langfristigen Einnahme dieser Heilungsmodulatoren wird jedoch generell gewarnt, da sie nachteilige Auswirkungen auf die Chemotaxis und Interaktion inflammatorischer Zellen haben könnten [76], welche zur Einleitung der regenerativen Phase gebraucht werden [34, 75].

Neben NSAR ist auch die Gabe von synthetischen Glukokortikosteroiden nach Muskelverletzung in der Sportmedizin sehr populär, da auch zu ihrem Wirkungsprofil anti-inflammatorische Effekte gehören. Während die intramuskuläre und systemische Anwendung aufgrund von Nebenwirkungen überwiegend abgelehnt wird [75, 77], wird einer Studie an amerikanischen Footballspielern zufolge die Injektion von Glukokortikoiden nach Muskelzerrung weiterhin als erfolgsversprechende Therapie empfohlen [78]. Kurzzeiterfolge im Sinne einer Muskelkraftsteigerung nach Injektion wurden auch in Tierstudien beobachtet [79]. Allerdings offenbarten sich irreversible Muskelschädigungen als Langzeitnebenwirkung [79]. Klinisch relevante, interventionelle Studien fehlen nach wie vor.

Bisweilen werden neben Glukokortikosteroiden und NSAR auch Lokalanästhetika oder Plasmaproducte direkt in den Muskel gespritzt. Kurios erscheinen dabei die diskrepanten Erwartungen, die beispielsweise an Bupivacain gestellt werden: Einerseits wird von Seiten der Sportmedizin nach lokaler Injektion von Bupivacain eine Verbesserung der Muskelregeneration nach Verletzungen erwartet, andererseits wird in der experimentellen Medizin die lokale Injektion desselben zur Erzeugung von Muskeltraumata gebraucht [80, 81].

Ein Novum in der Injektionstherapie stellt dagegen die Versorgung mit plättchenreichem Plasma (PRP) dar. Intramuskulär oder intravenös verabreicht, sollen die im PRP enthaltenden Wachstumsfaktoren die Muskelregeneration fördern [81]. PRP enthält aber auch das Gewebshormon TGF- $\beta$ , welchem fibrosefördernde Eigenschaften zugesprochen werden [75].

Gegen die überschießende Narbenproduktion können wiederum anti-fibrotische Stoffe wie Losartan helfen. Der aus der Bluthochdrucktherapie bekannte Wirkstoff hebt die pro-fibrogene Wirkung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 auf [82], wodurch die Stimulation der Myofibroblasten gebremst und die Produktion der Extrazellulären Matrix gehemmt wird [62]. Neben Losartan existieren weitere anti-fibrotisch wirksame Substanzen wie z. B. Suramin oder Decorin. Sie haben jedoch die Nachteile, dass sie nicht oral gegeben werden

können oder erhebliche Nebenwirkungen aufweisen [82]. Ob Antifibrotika künftig zum Kanon der erfolgreichen Muskeltherapeutika gezählt werden dürfen, muss noch durch klinische Studien bestätigt werden.

Anders verhält es sich bei dem Medikament Actovegin oder dem homöopathischen Mittel Traumeel®. Sie finden bereits breite Anwendung in der Klinik, aber zu ihrer Wirksamkeit auf die Muskelregeneration fehlen bisher präklinische und randomisierte kontrollierte Studien [75]. Gleiches gilt auch für physikalische Heilmethoden wie dem therapeutischen Ultraschall oder die hyperbare Sauerstofftherapie. Sie werden im klinischen Alltag zur Behandlung von Muskeltraumata eingesetzt, wobei ihr Nutzen teilweise nur durch Tierversuche wissenschaftlich belegt ist [66, 75, 83].

### **3.3.3 Fazit: bisherige Therapien sind nicht ausreichend**

Die derzeitigen Therapieoptionen von Skelettmuskelverletzungen liefern kaum zufriedenstellende Ergebnisse. Bei dem Versuch, das intrinsische Regenerationspotenzial des Skelettmuskels zu verbessern, stützen sie sich meist auf Ergebnisse aus experimentellen Studien oder auf einzelne Erfahrungswerte [71]. Zum Teil werden auch Ansätze verfolgt, denen nachweislich kein Nutzen zugesprochen werden kann oder die sogar die Muskelregeneration erschweren. Keine der bisherigen Therapieoptionen bietet einen kausalen Ansatz, um den Untergang von Muskelzellen und gleichzeitig die Bildung von Narbengewebe langfristig zu verhindern. Gesucht ist eine zielgerichtete, phasenspezifische Therapie mit dem Potenzial, auf mehrere molekulare Ebenen einzuwirken.

## **3.4 Innovative Therapiekonzepte**

Die Entwicklung innovativer, zellbasierter Therapiekonzepte zur Behandlung von Muskelverletzungen ist in den letzten Jahren stark vorangetrieben worden. Die Idee vom Transfer muskelspezifischer Stammzellen zur Auffrischung des regenerativen Zellpools versprach zunächst einen erfolgreichen Ansatz. Bereits eine einzelne, in einen verletzten Mausmuskel transplantierte Satellitenzelle war in der Lage, sich um ein Vielfaches zu vermehren und sich in Muskelzellen zu differenzieren [52].

Der Ansatz, verletzten Skelettmuskel mit transplantierten Muskelvorläuferzellen wiederaufzubauen, stößt jedoch an seine Grenzen. Wie Borselli et al. in einem Rechenbeispiel veranschaulichten, wären ca. 100 bis 200 Mio. primäre Muskelstammzellen zur Regeneration eines verletzten menschlichen Schienbeinmuskels notwendig [84]. Um diese Anzahl bereitstellen zu können, müssten 2-4 kg gesunder Muskel aufbereitet werden. Alternativ versuchte man daher, kultivierte Muskelvorläuferzellen zu transplantieren. Allerdings zeigte sich, dass ex vivo expandierte murine Myoblasten ein erhöhtes Transplantationsversagen im Vergleich zu den direkt dem Muskel entnommenen Stammzellen aufwiesen [84].

Da weder die Gewinnung von genügend primären Stammzellen praktikabel ist, noch die Transplantation von kultivierten Vorläuferzellen erfolgreich war [69], hat man begonnen, eine andere Zellpopulation auf ihr therapeutisch myogenes Potenzial hin zu überprüfen.

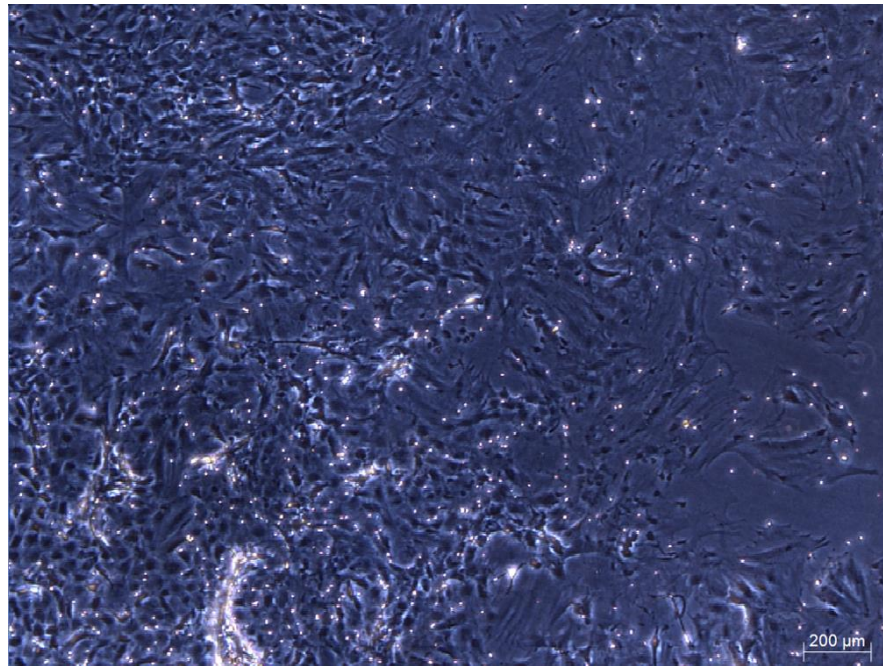
### **3.4.1 Mesenchymale Stromazellen**

Bei dieser Zellgattung handelt es sich um multipotente, adulte Stammzellen, die erstmals im Knochenmark identifiziert wurden [85]. Im Gegensatz zu SaC können sie sich abhängig von äußeren Stimulanzen in

myogene, adipogene, chondrogene oder osteogene Zellen entwickeln [86]. Zudem können sie in einer Zellkultur expandiert werden, ohne ihr Differenzierungspotenzial zu verlieren [87]. Zu ihren weiteren in vitro Charakteristika zählen ihre Plastikadhärenz und ein spezifisches Oberflächenmarkerprofil (Abb. 4). Analog zu ihren Differenzierungsmöglichkeiten in vitro zeigte sich in vivo, dass sich MSC an der Regeneration diverser Gewebe, darunter Knochen, Knorpel und Muskel, beteiligen können [88]. Eindeutige Hinweise ihrer Mitwirkung an der Muskelregeneration wurden erstmals durch die von Ferrari et al. durchgeführten Experimente geliefert [89]. Sie zeigten, dass murines Knochenmark transplantierbare Vorläuferzellen enthält, die sich nach systemischer Gabe in die Muskelzellen eines verletzten Areals integrieren. Allerdings entspricht das von Ferrari et al. angewandte Muskeltrauma kaum den klinisch relevanten Verletzungsmustern, wie sie in Orthopädie und Unfallchirurgie vorkommen [89].

Das von Matziolis et al. entwickelte stumpfe Quetschtrauma kommt hingegen der klinischen Realität eines Muskeltraumas sehr nahe [90]. Im Gegensatz zu injizierbaren Toxinen provoziert die Quetschung den Untergang von Muskelzellen durch eine Zerstörung der Zellmembran und Basallamina [91]. Ergänzend zu den morphologischen Erkenntnissen von Ferrari et al., beschäftigte sich die Arbeitsgruppe um Matziolis mit den funktionellen Aspekten der MSC-Therapie. In ihrer Analyse konnten die Forscher trotz des schweren Traumas zeigen, dass die lokale Injektion von autologen, knochenmarksstämmigen MSC (BMMSC) in einen traumatisierten Skelettmuskel zu einer signifikanten Steigerung der Muskelkraft im Vergleich zu der mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppe führte [90].

Mit dem Ziel späterer klinischer Studien folgten weitere Experimente zur Charakterisierung der MSC-basierten Therapie. Winkler et al. beschrieben in ihrem Experiment einen dosisabhängigen Effekt, wonach die Injektion von 1 Mio. MSC bereits ausreichend war, um einen signifikanten Anstieg der Muskelkraft im Vergleich zur Placebo-Gruppe herbeizuführen [92]. Die Arbeitsgruppe verfolgte weiterhin die Bestimmung des günstigsten Transplantationszeitpunktes. Diese Studie zeigte, dass die unmittelbare Transplantation nach dem Trauma ebenso zu einem bedeutsamen Anstieg der Muskelkraft führte, wie eine um sieben Tage zeitversetzte Injektion [93]. Entgegen der primären Annahme, dass sich MSC in einem inflammatorischen Milieu nicht durchsetzen würden, zeigten die Ergebnisse, dass MSC insbesondere nach Verletzung einen Beitrag zur Wiederherstellung der muskulären Kontraktilität leisten können [94]. Die kraftsteigernde Wirkung der MSC wurde daraufhin auch in ähnlichen Tierversuchen von externen Arbeitsgruppen beobachtet [95-97]. Andrade et al. zeigten zuletzt in einem vergleichbaren Setting ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Anwendung von BMMSC und einem Anstieg der maximalen Muskelkontraktionskraft [97].



**Abbildung 4: Mesenchymale Stromazellen in Kultur im Phasen-Kontrast-Mikroskop (nativ).** Diese Zellpopulation ist positiv ( $\geq 95$  % aller Zellen) für CD29, CD44, CD105, CD73, CD166, CD90 und RT1A, und negativ ( $\geq 98$  %) für CD45, CD34 und RT1B. Ihr Differenzierungspotenzial wurde durch Stimulation mit adipogenen und osteogenen Medium mit Hilfe der Nilrot- und Alizarinrot-Färbung bestätigt [98]; aufgenommen von Christine Ehrentraut.

### 3.4.2 Direkter vs. indirekter Wirkmechanismus

Nachdem bereits mehrere experimentelle Studien einen positiven Effekt der MSC bei der Behandlung von Muskeltraumata demonstrieren konnten [90, 92, 93, 95-97], stellt sich nach wie vor die Frage, auf welche Art und Weise sich MSC an der Muskelregeneration beteiligen.

Die Differenzierung der MSC in Muskelzellen und deren Fusion mit Muskelzellen als mögliche, direkte Wirkmechanismen wurden kontrovers diskutiert. Beide Prozesse sind von mehreren Studien, sowohl in vitro als auch in vivo, beschrieben worden [89, 99, 100]. Allerdings betonen einige Autoren die schwache Beweislage dieser Wirkmechanismen, da Fusions- und Differenzierungsrate zu gering seien, um die signifikant gesteigerte Kontraktilität ausreichend erklären zu können [69, 101]. Anderen Arbeitsgruppen gelang es überhaupt nicht, Fusionsereignisse nachzuweisen [93, 102]. Ihre Ergebnisse leiteten schließlich einen Paradigmenwechsel in Bezug auf die Wirkungsweise der MSC ein.

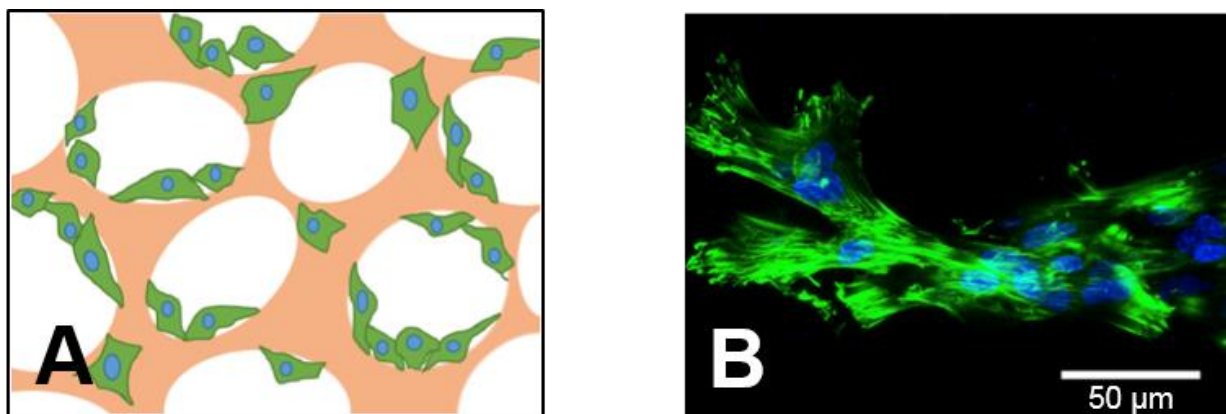
Als führender Mechanismus wird aktuell ein parakriner Einfluss auf die Muskelregeneration angenommen, da MSC eine Vielzahl bioaktiver Moleküle ausschütten, darunter Zytokine und Wachstumsfaktoren [103]. Ein Teil dieser trophischen Faktoren ist stark mit dem Muskelwachstum assoziiert [69]. Zum Beispiel fördert IGF die Aktivierung der Satellitenzellen und spielt damit eine Schlüsselrolle in der Regeneration von geschädigten Muskelzellen [50]. Weiterhin wird das Wachstum neuer Gefäße über die Ausschüttung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) begünstigt [104]. Die Zellen entfalten darüber hinaus immunmodulatorische Effekte über ihr Sekretom [87]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sie gezielt

zum Trauma migrieren [105], um dort einen auf das sie umgebende Mikromilieu abgestimmten Wachstumsfaktor-Cocktail zu sezernieren [69].

### 3.4.3 Tissue Engineering: eine synthetische Nische für MSC

Um den parakrinen Wirkmechanismus der MSC für den therapeutischen Einsatz zu optimieren, hat man sich auf die Kombination von Zellen mit Biomaterialien fokussiert [84]. Hydrogele, die aus vernetzten, wasserlöslichen Polymeren bestehen, haben sich als besonders geeignete Materialien herausgestellt. Sie sind leicht herzustellen und können entsprechend ihren Anforderungen in verschiedenen Formen und Größen produziert sowie mit diversen chemischen und physikalischen Eigenschaften ausgestattet werden [2]. Das Spektrum reicht von injizierbaren Gelen bis hin zu formflexiblen Zellträgern, auch *Scaffolds* genannt [84, 106].

Die Funktion der Hydrogele besteht jedoch nicht nur in der reinen Übertragung der Zellen. In der hier vorliegenden Studie wurde ein biokompatibles Alginatgel eingesetzt [107, 108], welches durch seine spezifischen Eigenschaften das regenerative Potenzial der MSC gezielt fördert [109]. Das dreidimensionale Gel weist eine besondere Struktur mit 70-150  $\mu\text{m}$  großen Poren auf, die als synthetische Nische für die MSC fungieren. Inkubiert in dieser Scaffold-Struktur konnte beobachtet werden, dass sich MSC ausbreiten und über die Poren physische Kontakte zu benachbarten Zellen herstellen, im Unterschied zu den kugelig geformten MSC, die von Hydrogel komplett umschlossen wurden [109]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im porösen Scaffold N-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Interaktionen in einem gesteigerten Sekretionsprofil der MSC resultierten [109]. Weitere in vitro Untersuchungen der mit MSC beladenen Alginatgele zeigten, dass nur wenige Zellen aus ihrer künstlichen Nische migrierten sowie über 90 % der Zellen nach sieben Tagen noch immer vital waren [110]. Im Gegensatz zur systemischen Injektion in Gefäße, bei der es zu einer unkontrollierten Zellverteilung kommt, ermöglicht das Alginatgel eine konzentrierte Transplantation der MSC in nächster Nähe zum Gewebedefekt, von wo aus die Zellen ihre parakrine, regenerative Wirkung entfalten können.



**Abbildung 5: Zusammenführung von Zellen und Biomaterialien.** Um ihren parakrinen Wirkmechanismus optimal zu nutzen, werden MSC mit einem Alginatgel kombiniert. Bild A zeigt ein Schema der makroporösen Struktur des Alginatgels mit anhaftenden Zellen. Bild B zeigt eine repräsentative Aufnahme der MSC gefärbt mit Phalloidin (grün = Aktinfilamente) und DAPI (blau = Zellkerne). Das Gel mit seinen 70-150  $\mu\text{m}$  großen Poren fungiert als synthetische Nische und bietet daher optimale Bedingungen für den parakrinen Effekt der MSC; modifiziert aus Qazi [111], abgebildet mit Erlaubnis von Taimoor H. Qazi.

### 3.5 Klinisch relevantes Muskeltrauma

Ziel der experimentellen Stammzellforschung ist die Translation in die Klinik. Um die therapeutische Wirkung der MSC auf die Muskelregeneration zu testen, bedarf es eines klinisch relevanten Traumamodells. Das in dieser Studie angewandte Trauma ist angelehnt an das von Matziolis et al. etablierte Quetschtrauma des Musculus soleus der Ratte [90]. Dabei wurde der Muskel im proximalen Drittel einmal und im distalen Drittel zweimal gequetscht, womit das proximale Drittel stellvertretend für die einfach verletzte Region stand, während das distale Drittel die zweifach verletzte Region repräsentierte. Das mittlere Drittel mit Insertion des neurovaskulären Bündels blieb verschont und stellte die vom Trauma indirekt betroffene Region dar. Im Gegensatz zu toxischen oder ischämischen Modellen simuliert dieses Trauma klinische Verletzungsmuster, wie sie bei iatrogenen Traumata vorkommen [63]. Die Aussparung der Gefäß- und Leitungsbahnen reduziert das Auftreten von ischämischer und neuraler Muskeldegeneration. Dies ist erwünscht, da zum einen die Regenerationsprozesse unterschiedlich ablaufen, zum anderen der Skelettmuskel sich per se gut nach ischämischen oder toxischen Traumata erholt [56, 63, 112]. Dies würde die Unterscheidung zwischen dem tatsächlichen therapeutischen Einfluss der MSC und dem natürlichen Regenerationspotenzial des Muskels erschweren. Weiterhin ermöglicht die Wahl dieses Traumas die Vergleichbarkeit mit den Vorstudien unserer Arbeitsgruppe [63, 99].

### 3.6 Offene Fragen

Zellbasierte Therapien bieten einen erfolgsversprechenden Ansatz für die Behandlung von Skelettmuskeltraumata [87]. Wie verschiedene Studien bereits belegten, führte die Anwendung von BMSC im traumatisierten Muskel zu einer funktionellen Verbesserung der Muskelkraft [90, 92, 93, 95-97]. Momentan wird von einem primär parakrinen Wirkmechanismus der MSC ausgegangen, bei dem sie durch die Freisetzung verschiedener trophischer Faktoren das intrinsische Regenerationspotenzial des Skelettmuskels unterstützen [69, 103, 113]. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist jedoch nicht geklärt, welche strukturellen, morphologischen Veränderungen durch MSC hervorgerufen werden, die die signifikante Kraftsteigerung erklären können [105].

Aktuell wird diskutiert, ob die verbesserte Muskelregeneration durch eine erhöhte Anzahl von Gefäßen bedingt ist [96, 114]. Helal et al. vermuten eine Reduktion der Fibrose als Grund für eine gesteigerte Kraftentwicklung [114]. Weder eine Erhöhung der Gefäßdichte, noch eine Reduktion des Narbengewebes durch die Behandlung mit MSC konnte allerdings in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden [93, 115].

Neben Narbenbildung und Gefäßdichte wird auch die Anzahl von Muskelzellen mit binnenständigen Kernen standardmäßig als Indikator für eine effektive Muskelregeneration herangezogen, da zentralständige Kerne auf regenerierende bzw. neu entstehende Zellen hindeuten [35]. Mehrere Studien kamen zu dem Schluss, dass es nach Stammzell-Applikation zu einer Erhöhung von Zellen mit binnenständigen Kernen im Muskel kommt [114, 116]. Diesen Studien nach zu urteilen, fördern Stammzellen folglich die Präsenz von regenerierenden Muskelzellen. Diese Beobachtung steht jedoch im Kontrast zu den Ergebnissen von Andrade und Natsu et al., die eine verringerte Anzahl von Zellen mit zentralständigen Kernen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellten [97, 102].

An dieser Stelle sei Folgendes hervorgehoben: Sämtliche hier aufgeführte histologische Analysen sind lediglich an Bildausschnitten mit bioptischen Charakter durchgeführt worden. Diese Ausschnitte, sogenannte *regions of interest* (ROI), transportieren jedoch nur einen Teil der im gesamten Muskelquerschnitt enthaltenen Informationen. Die Analyse von solchen Bildausschnitten stellt ein Problem bei Verletzungsmodellen dar, in denen gesunde und verletzte Areale parallel vorkommen können [63]. Bei diesen heterogenen Verletzungsmustern lässt sich das Risiko einer Stichprobenverzerrung selbst durch eine randomisierte Verteilung der ROI nicht vollständig eliminieren [117, 118]. Ferner erfolgt die Erfassung der regenerierenden Muskelzellen meist manuell, was zeitaufwendig, arbeitsintensiv und fehleranfällig ist [117, 119]. Möglicherweise ergeben sich allein durch die subjektive Beurteilung widersprüchliche Beobachtungen zur Anzahl von Zellen mit binnenständigen Kernen [119, 120]. Um den Einfluss der MSC-Behandlung auf die Muskelregeneration auf einem zellulären Level nachvollziehen zu können, bedarf es daher einer neuen Art der Annäherung an die histologische Analyse.

### **3.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Für die hier vorliegende Studie wurde ein spezielles, halbautomatisches computergestütztes Segmentationsverfahren entwickelt, welches die totale Anzahl der Muskelzellen und die Anzahl der Zellen mit binnenständigen Kernen, kurz Regeneratzellen, in einer Standardfärbung (HE-Färbung) analysieren kann. Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurde so die histologische Analyse von mehreren kompletten Muskelquerschnitten aus der einfach, indirekt und zweifach verletzten Region ermöglicht. Der Beobachtungszeitraum wurde im Vergleich zu Vorstudien neben den Zeitpunkten 7 und 28 Tage zusätzlich auf acht Wochen ausgedehnt, um die Dynamik der Muskelregeneration unter MSC-Einfluss zu dokumentieren. Mit diesem experimentellen Ansatz sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Die Transplantation von autologen mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark verbessert das funktionelle Heilungsergebnis einer schweren Skelettmuskelverletzung durch eine Erhöhung der totalen Anzahl an Muskelzellen und der Anzahl an Regeneratzellen.
2. Die Effekte der MSC-basierten Therapie sind in den verschiedenen Regionen des verletzten Muskels unterschiedlich.

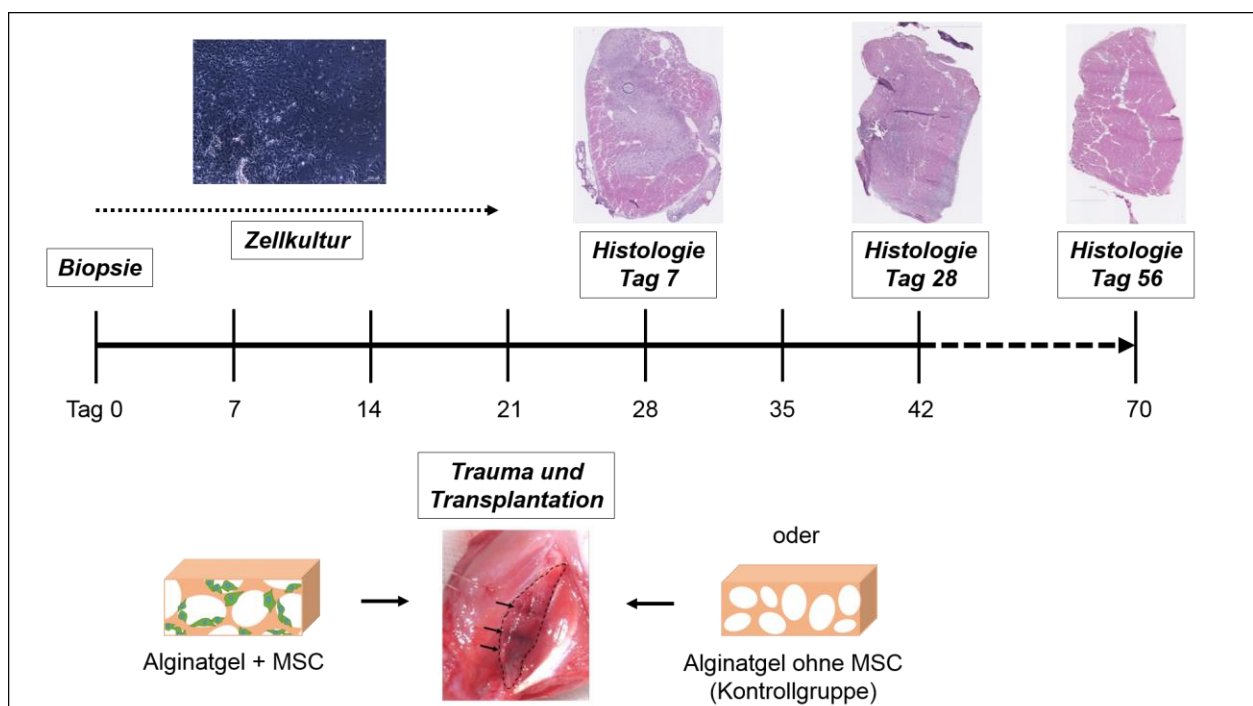


## 4 Material und Methoden

### 4.1 Überblick Versuchsaufbau und Behandlungsgruppen

Um die Wirkung der MSC auf die Muskelregeneration zu untersuchen, wurde eine experimentelle Studie mit zwei Versuchstiergruppen konzipiert. An Tag 0 erfolgte zunächst die Entnahme von Knochenmark aus den Schienbeinen beider Gruppen (Knochenmarksbiopsie). Aus den Biopsien wurden primäre MSC isoliert und in einer Zellkultur expandiert. Die Zellen wurden anschließend in ein Alginatgel ausgesiedelt, welches während des Herstellungsprozesses mit spezifischen Eigenschaften ausgestattet wurde.

Im weiteren Verlauf wurde der M. soleus in beiden Versuchstiergruppen einem Quetschtrauma unterzogen, wobei unmittelbar im Anschluss die Transplantation erfolgte. Dabei wurde der Behandlungsgruppe das Alginatgel mit autologen, inkubierten MSC transplantiert. Die andere Gruppe diente als Kontrollgruppe, daher wurde nur das Alginatgel transplantiert. Für die histologische Auswertung wurden sieben, 28 und 56 Tage nach Trauma und Transplantation die linken, verletzten und die kontralateralen, unverletzten Mm. solei entnommen. Aus den kryokonservierten Muskeln wurden mehrere Schnitte angefertigt, welche in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt wurden. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem eigens entwickelten computergestützten Segmentationsverfahren.



**Abbildung 6: Zeitleiste der Versuchsdurchführung.** An Tag 0 erfolgte die Knochenmarksbiopsie zur Gewinnung der mesenchymalen Stromazellen (MSC). Nach ca. drei Wochen standen 1 Mio. MSC für die Transplantation zur Verfügung. Direkt nach Anwendung des Quetschtraumas erhielt die Kontrollgruppe ( $n = 6$ ) nur das Alginatgel, während der Behandlungsgruppe ( $n = 6$ ) das Alginatgel mit inkubierten MSC transplantiert wurde. Verletzte, wie auch unverletzte Muskeln wurden an Tag 7, 28 und 56 nach Trauma und Transplantation für die histologische Auswertung entnommen; Darstellung Trauma und Alginatgel modifiziert aus Qazi [111], abgebildet mit Erlaubnis von Taimoor H. Qazi.

## **4.2 Versuchstiere**

Für die Studie wurden 36 weibliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, DE) mit einem Gewicht von 200 - 240 g verwendet. Vor Versuchsbeginn wurde allen Tieren eine Eingewöhnungszeit von mindestens sieben Tagen gewährt. Sie wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und einem Tag/Nachtrhythmus von je 12 Stunden mit freiem Zugang zu Wasser und Futter-Pellets (Altromin Pellets, Altromin-GmbH, Lage, DE) in Gruppen von bis zu fünf Tieren artgerecht gehalten.

Die Versuchsreihen unterlagen den Richtlinien der Durchführung von Tierversuchen nach §8 und §2 des Tierschutzgesetzes. Sie wurden vom Landesamt Berlin für Gesundheit und Soziales genehmigt (G 0119/12). Sie erfolgten in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin am Standort Campus Virchow Klinikum Charité, Berlin. Alle Eingriffe wurden in tiefer Narkose und mit adäquater Schmerzmittelapplikation durchgeführt.

## **4.3 Gewinnung der mesenchymalen Stromazellen**

Zunächst erfolgte bei allen Tieren die Entnahme von Knochenmark. Daraus wurden anschließend durch Isolation, Kultivierung und Expansion MSC gewonnen (Abb. 6). Um eine korrekte Zuordnung der autologen MSC zu gewährleisten, wurden alle Tiere vor der Knochenmarksbiopsie an der Schwanzbasis mit farbigen Markern gekennzeichnet.

### **4.3.1 Durchführung der Knochenmarksbiopsie**

Zur Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung wurde eine Isofluran-Inhalationsnarkose (Isofluran-N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-Gemisch, Flow 0,6, 2,5-3 % Isofluran, Forene®, Abott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) eingesetzt. Anschließend wurden beide Schienbeine mit einer Schermaschine (Remington Modell MB-320C, Ellwangen, DE) rasiert. Nach Applikation der Schmerzmedikation mit Rimadyl 15 mg/kg KG (Pfizer, Pharma GmbH, Karlsruhe, DE) in die Nackenfalte, wurde das Tier auf den Rücken platziert. Die kontinuierliche Narkosegas-Zufuhr wurde mit Hilfe einer Kopfmaske (hauseigene Anfertigung) sichergestellt. Die Vitalparameter, sichtbare Atmung und Rosigkeit der Pfoten, wurden während des Eingriffs in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Nach gründlicher Hautdesinfektion (Braunoderm®, B. Braun Melsungen AG, DE) wurde zunächst das rechte Schienbein bioptiert. Nach Aufsuchen der Patellarsehne wurde eine 4 - 6 mm lange Inzision mit einer 15er Skalpellklinge (Aesculap, Tuttlingen, DE) mediokaudal der Tuberositas tibiae durchgeführt. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des Bindegewebes sowie die Perforation der Kortikalis medial der Tuberositas mit einer 11er Skalpellklinge (Aesculap, Tuttlingen, DE). Eine sterile 20 ml Spritze mit einer 20 Gauge Kanüle (Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) diente zur Aspiration des Knochenmarks und wurde vorsichtig in das Perforationsloch vorgeschoben. Dabei musste unter ständigem Rotieren der Spritze der Eintrittswinkel dem Achsenverlauf der Tibia angepasst werden. Die Kanüle wurde vorsichtig unter ständigem Sog in den Markraum der Tibia eingeführt. Es erfolgte die sofortige Überführung des Aspirats in ein steriles 50 ml Gefäß (Falcon Tube, Falcon, Corning Science, S.A. de C.V MX) mit 20 ml Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), welches mit 10 %igem

fetalem Kälberserum (FCS Superior, Biochrom AG, Berlin, DE) und 100 IU/ml Penicillin+100 mg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, DE) versetzt wurde.

Die Blutung der Wunde wurde mit einem sterilen Tupfer gestoppt, die Haut über der Knochenperforation nach Spülung mit NaCl mittels mehrerer Einzelknopfnähte verschlossen (2-0 Vicryl Plus, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, DE). Nach Durchführung desselben Vorgangs am linken Schienbein unter Verwendung einer zweiten sterilen Spritze, wurde die Narkose beendet und die Tiere zum Aufwachen zurück in den Käfig gelegt. Zuvor wurden beide Wundbereiche gründlich mit NaCl gesäubert.

#### **4.3.2 Isolation, Kultivierung und Expansion der mesenchymalen Stromazellen**

Um autologe MSC für die Transplantation zu gewinnen, wurden die Knochenmarksbiopsien unter standardisierten Bedingungen in einem Zelllabor kultiviert. Dazu erfolgte zunächst die Überführung des in Nährmedium gelösten Knochenmarks in Kulturflaschen (T-25 Zellkulturflaschen, TPP, CH). Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelang die Selektion der angestrebten Zellpopulation durch plastische Adhäsion. Der Phänotyp und das Differenzierungspotenzial der MSC wurden, wie zuvor beschrieben, anhand der Expression ihrer Oberflächenmarker mittels *flow cytometry* überprüft [98]. Das Wachstum der Zellkulturen wurde alle zwei Tage im Phasen-Kontrast-Mikroskop kontrolliert. Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche ausgetauscht. Um eine Differenzierung sowie einen Wachstumsstopp der Zellen zu verhindern, wurden die Kulturen trypsiniert, sobald sie eine Konfluenz von 70-80 % erreichten. Beim Passagieren wurden 1 Mio. Zellen in die nächst größerer Kulturflasche überführt. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt (CASYton™, Schärfe Systeme, Reutlingen, DE). Die MSC wurden nicht mehr als dreimal passagiert. Nach dreiwöchiger Expansion wurden die Zellen am Tag des operativen Eingriffs trypsiniert, durch Zentrifugieren und dreimaliges Waschen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco AG, Karlsruhe, DE) gereinigt sowie davon 1 Mio. MSC in einer 0,9 %igen NaCl-Suspension für die Inkubation mit den Alginatgelen vorbereitet. Die Zuordnung der Tiere in die jeweiligen Gruppen erfolgte randomisiert.

### **4.4 Bereitstellung der Alginatgele**

Das Alginatgel diente als synthetische Nische für die MSC. Um die dafür benötigten Eigenschaften zu erhalten, bedurfte es bestimmter Herstellungsschritte, die im Folgenden erläutert werden.

#### **4.4.1 Herstellung der Alginatpolymere**

Für die Produktion der Alginatmatrix wurde ultrapures Alginat in Pulverform verwendet (Novamatrix, Oslo, NO). Als hochmolekulare Gewichtskomponente wurde MVG Alginat (250 kDa), als niedermolekulare Gewichtskomponente LVG Alginat (50 kDa) verwendet, um die Matrix herzustellen. Beide Alginat-Pulver wurden in doppelt destillierten H<sub>2</sub>O gelöst um eine 1 %ige w/v Lösung zu erhalten. Anschließend wurde 1 % der Zuckerseitenketten der Alginate mit Natriumperodat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oxidiert, wobei die Lösungen für 17 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln konstant gerührt wurden [108]. Danach wurde die Reaktion mit einer äquivalenten Menge Ethylenglycol (Fischer, Pittsburgh, USA) gestoppt.

Anschließend wurden die Lösungen über drei Tage dialysiert (MWCO 3500 Da, Spectra/Por®), gefriergetrocknet und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Alginatpolymere wurden anschließend mit zell-adhäsiven Eigenschaften ausgestattet. Dazu wurden zur Matrix G<sub>4</sub>RGDSP Peptide, eine spezifische Aminosäuresequenz (Commonwealth Biotechnology, Richmond, USA) hinzugefügt, wobei mittels Carbodiimid Modifikation jeweils 20 Peptidmoleküle pro Alginatkette ersetzt wurden [107]. Die modifizierten Alginat-Lösungen wurden wiederum dialysiert, mit Aktivkohle entfärbt, steril gefiltert, lyophilisiert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

#### **4.4.2 Erzeugung der makroporösen Alginatgel-Struktur**

Um die charakteristischen Alginat-Zellträger mit der spezifischen Porengröße von 70-150 µm zu erhalten, wurden gleiche Mengen an lyophilisierten MVG und LVG Alginat gemischt, anschließend mit DMEM mit einem hohen Glukoseanteil versetzt, um eine 4 %ige Polymerlösung zu erhalten. Um das Alginatgemisch ionisch zu vernetzen, musste eine wässrige Calciumsulfat Suspension hinzugefügt werden (40 µl CaSO<sub>4</sub> pro 1 ml Alginatgemisch). Dazu wurden zwei Spritzen über einen Spritzenkonnektor miteinander verbunden, um den Alginatmix und das CaSO<sub>4</sub> intensiv zu mischen, sodass anschließend ein Gel mit einer Konzentration von 2 % (v) entstand.

Die fertige Mixtur wurde schließlich zwischen zwei sterile Glasplatten mit einem 2 mm Abstand gegeben, wo sie innerhalb von 30 min gelierte. Die Gele wurden mit Hilfe einer Form mit den Maßen 8 x 3 mm ausgestochen und sofort bei -80 °C für 24 Stunden tiefgefroren. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Gele bei -80 °C aufbewahrt.

#### **4.4.3 Inkubation der Alginatgele**

Für die Transplantation der Zellen wurden 50 µl einer 20 x 10<sup>6</sup> MSC/ml Suspension (1 Mio. Zellen) direkt auf die gefriergetrockneten Alginatgele pipettiert und für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Vorbereitung der Alginatgele erfolgte jeweils unmittelbar vor der Versuchsreihe Trauma und Transplantation.

### **4.5 Trauma und Transplantation**

Alle Versuchstiere erhielten ein Quetschtrauma des linken Musculus soleus, woraufhin unmittelbar die Transplantation mit einem Alginatgel mit oder ohne MSC erfolgte.

#### **4.5.1 Quetschtrauma des M. soleus**

Die Narkoseeinleitung, -aufrechterhaltung und Applikation der Schmerzmedikamente erfolgte bei den Versuchstieren in identischer Weise wie bei der Versuchsreihe Knochenmarkbiopsie. Zusätzlich wurden 0,07 ml 2 %iges Xylazine (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen, DE) und 0,09 ml 10 %iges Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, DE) pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE) wurde zum Schutz vor Austrocknung auf die Hornhaut der Augen aufgetragen. Beide Hinterläufe wurden gründlich rasiert, die Tiere auf dem Bauch platziert und der linke Hinterlauf mit einem Faden angeschlungen, um eine leichte

Streckung im Kniegelenk zu erreichen. Mit einem Skalpell wurde ein etwa 2,5 cm posterolateraler longitudinaler Hautschnitt bis zum Ansatz der Achillessehne durchgeführt.

Anschließend wurde der Hautmuskel vorsichtig freigelegt und mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet. Verwachsungen zwischen Hautmuskel und dem M. gastrocnemius wurden stumpf gelöst. Es galt nun den M. soleus zu identifizieren, der gemeinsam mit dem M. gastrocnemius in die Achillessehne einstrahlt. Diese beiden Muskeln wurden an ihrer gemeinsamen Faszie auseinander präpariert. Dabei war insbesondere darauf zu achten, das neurovaskuläre Bündel des M. soleus zu schonen, welches etwa im mittleren Drittel des Muskels von medial ausgehend inseriert. Danach musste der Muskel nach kranial und kaudal soweit präpariert werden, um ihn für das Quetschtrauma mobilisieren zu können. Das Trauma wurde mittels einer gebogenen Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, DE) durchgeführt, deren Branchen mit Polyethylenröhrchen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) überzogen waren. Dieser Überzug diente dem Schutz der Muskelfaszie. Die Klemme wurde dabei von lateral unter den M. soleus geschoben, beim dritten Zahn geschlossen und für 20 Sekunden gehalten. Der Druck der Branchen entsprach  $112 \pm 5,1$  N (Daten aus Vorversuchen erhoben mit dem Materialprüfgerät Zwick 1455, Zwick GmbH, Ulm, DE [63]). Es erfolgten dabei zwei Quetschungen distal des neurovaskulären Bündels und eine Quetschung kranial davon. Es ergab sich so eine Aussparung mit den Maßen 3 mm am medialen und 2 mm am lateralen Rand des Muskels. Anschließend erfolgte eine gründliche Spülung des OP-Gebietes mit NaCl.

#### **4.5.2 Transplantation der Alginatgele**

Die Transplantation des Alginatgels erfolgte unmittelbar nach Durchführung des Traumas. Die Tiere wurden randomisiert folgenden Versuchsgruppen zugeordnet:

- 18 Tiere erhielten das Alginatgel + autologe MSC mit  $n = 6$  pro Zeitpunkt
- 18 Tiere dienten als Kontrolle und erhielten nur das Alginatgel mit  $n = 6$  pro Zeitpunkt

Das Gel wurde direkt längs auf dem verletzten M. soleus in einer Faszientasche zwischen dem M. soleus und dem intakten M. gastrocnemius platziert. Es waren keine zusätzlichen Nähte notwendig, um das Gel zu fixieren. Der Hautmuskel wurde mit einer Einzelknopfnah, die darüberliegende Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Zum Abschluss erfolgte die gründliche Reinigung der Wunde mit NaCl sowie eine postoperative Schmerzprophylaxe mit Rimadyl.

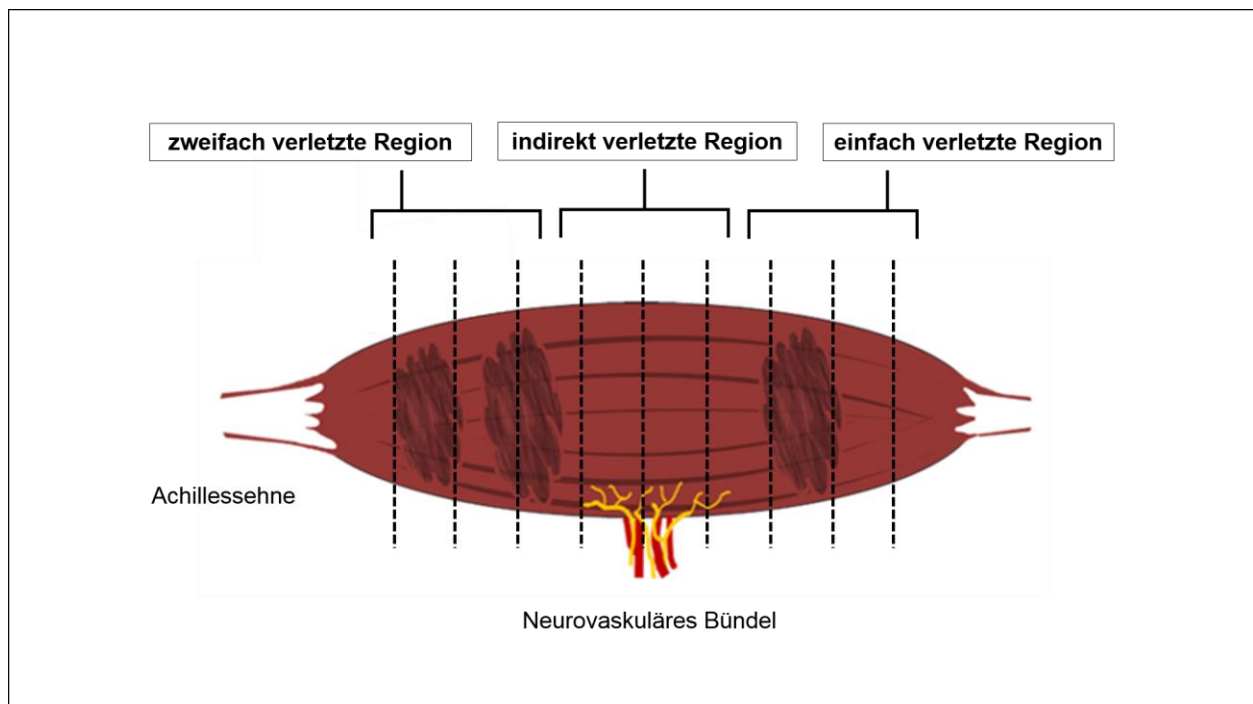
#### **4.6 Gewinnung der histologischen Proben und Kryokonservierung**

Sowohl sieben, 28 als auch 56 Tagen nach Quetschtrauma und Transplantation wurden die Tiere narkotisiert, analgesiert und der linke M. soleus, wie in 4.5.1. beschrieben, vorsichtig freigelegt. Bei jeweils drei Tieren pro Gruppe wurde auch der rechte, unverletzte M. soleus freigelegt. Unmittelbar vor der Muskelentnahme wurden die Tiere durch transkardiale Punktion mit Entbluten getötet. Zudem wurde eine Überdosis Ketamin intrakardial verabreicht. Anschließend erfolgte die rasche Entnahme der Muskeln. Um Kontraktionen der Muskulatur zu reduzieren, wurden die Muskeln kurz mit eiskaltem NaCl gespült, vorsichtig trockengetupft (KIMTECH, Kimberly-Clark, Reigate, GB) und in ein Förmchen (Tissue-Tek Cryomold, Sakura, Torrance, USA) mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL)

gelegt. Anschließend wurden sie mit einer dünnen Schicht Tissue-Tek bedeckt. Die in den Förmchen befindlichen Muskeln wurden in einen vorgekühlten Metallbehälter, welcher ca. 100 ml Isomethylbutan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enthielt, unter leicht kreisenden Bewegungen komplett untergetaucht und so schockgefroren. Das Isomethylbutan wurde vorher in flüssigen Stickstoff auf ca. -160 °C heruntergekühlt. Die korrekte Temperatur war erreicht, sobald das Isomethylbutan an den Rändern des Metallbehälters eine weiße Gefrierschicht gebildet hatte. Nach ca. 20-30 sec wurden die Förmchen aus dem Isomethylbutan entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.7 Konzept der histologischen Auswertung

In Anlehnung an das Quetschtraumamodell wurde im Rahmen der histologischen Auswertung eine Einteilung des M. soleus in drei Verletzungsregionen vorgenommen: Das proximale Drittel, welches einmal gequetscht wurde, spiegelte die einfach verletzte Region wider. Das distale Drittel, welches zweimal gequetscht wurde, bildete die zweifach verletzte Region ab. Das mittlere Drittel mit der Insertion des neurovaskulären Bündels stellte die indirekt verletzte Region dar. In jedem Bereich wurden drei Ebenen bestimmt, sodass insgesamt neun Querschnittsebenen für die Analyse vorbereitet wurden. Ziel dieses Einteilungsmodells war es, ein detailliertes, histologisches Bild des Regenerationsgeschehens im traumatisierten Muskel wiedergeben zu können (Abb. 7).



**Abbildung 7: Schematisches Einteilungsmodell des M. soleus.** In Anlehnung an das Quetschtrauma wurde der Muskel in drei Regionen eingeteilt, wobei jede Region durch drei Querschnitte repräsentiert wurde. Das mittlere Drittel des M. soleus mit der Insertion des neurovaskulären Bündels wurde verschont. Proximal davon wurde der Muskel durch eine Quetschung verletzt, distal davon durch zwei Quetschungen traumatisiert; modifiziert aus Qazi [111], abgebildet mit Erlaubnis von Taimoor H. Qazi.

#### **4.7.1 Herstellung der Kryoschnitte**

Die tiefgefrorenen Proben wurden zunächst im Kryostaten (Leica CM 1950 Ag Protect, DE) auf -20 °C akklimatisiert. Für die Bestimmung der Querschnittsebenen wurde anschließend die Länge des gefrorenen Muskels gemessen. Start- und Endpunkt der Querschnittsebenen wurden so gewählt, dass eine Muskel­fläche von mindestens 2,5 mm<sup>2</sup> abgebildet wurde. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass eine verlässliche Anzahl von Muskelzellen für die histologische Analyse zur Verfügung stand. Die übrigen sieben Ebenen wurden gleichmäßig zwischen Start- und Endschnitt verteilt. Vor Abnahme einer Schnittserie wurde im Nativschnitt die korrekte Ausrichtung des Muskelpräparats anhand der Orientierung der Muskelzellen überprüft, sodass nur Querschnitte auf den Objektträger gezogen wurden. In jeder der neun Ebenen wurden fünf bis zehn konsekutive 7 µm dünne Querschnitte u. a. als Reserve mit dem Kryotom abgenommen und durch Wärme auf Objektträger (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, DE) gezogen. Die Schnitte wurden 30 min an der Luft getrocknet und in Objektträgerkästen bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

#### **4.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE-Färbung diente der Übersichtsdarstellung und Erfassung der totalen Anzahl an Muskelzellen sowie Differenzierung der Regeneratzellen in kompletten Muskelquerschnitten. Alle Schnitte wurden vor Beginn des Färbeprozesses mindestens 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend folgte die Postfixierung durch Einstellen der Schnitte in eine 4 %ige Formaldehyd-Lösung (Herbeta, Berlin, DE) für die Dauer von 10 min.

Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Sie besteht aus zwei Einzelfärbungen, die hintereinander durchgeführt werden. Hämalan, ein aus Blauholz gewonnener Pflanzenfarbstoff (Hämatoxylin + Beize), färbt die Zellkerne blau. Es lagert sich als stark positiv geladener, basischer Farblack an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren (DNA) des Zellkerns. Eosin (Tetrabrom-Fluorescein-Natrium) ist ein negativ geladener synthetischer Farbstoff. Es färbt die positiv geladenen Proteine des Zytoplasmas und extrazytoplasmatische Strukturen wie z. B. Kollagen rosa bis rot an. Bei Betrachtung eines Muskelquerschnitts stellen sich demnach reife Muskelzellen als rundliche bis polygonale, aneinandergrenzende rosafarbene Strukturen dar, während die bläulichen Zellkerne, die unter dem Sarkolemm liegen, auf die Zellgrenzen hindeuten. Unreife Muskelzellen erscheinen hingegen bläulich-violett, da sich bei aktiver Proteinsynthese, wie es beispielsweise während des Wachstums der Fall ist, viele negativ geladene Proteine wie Ribosomen und RNA im Zytoplasma befinden [91].

Charakteristisch für die HE-Färbung ist zunächst eine rötlich-braune Färbung der Zellkerne bedingt durch das Hämalan. Dies ist auf den niedrigen pH-Wert der Färbelösung zurückzuführen. Im darauffolgenden Schritt werden die Schnitte mit HCl-Ethanol sukzessive entfärbt, was zu einer kontrastreichen Darstellung der Zellkerne führt. Um nun die typisch blauviolette Färbung der Kerne zu erreichen, erhöht man den pH-Wert mittels Spülen in Leitungswasser. Dies bedeutet zugleich eine Fixierung der Färbung, da der Farblack bei einem pH-Wert > 3 schlechter löslich ist.

#### **Durchführung der HE-Färbung (nach SOP des Julius Wolff Instituts):**

- Hämalalaun (Merck, Darmstadt, DE) nach Harris für 7 min für die Kernfärbung
- 3x Spülen in Aqua dest.
- Einstellen in HCl-Ethanol (Merck, Darmstadt, DE) 0,25 % zur Differenzierung
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min
- 3-4x Eintauchen in Eosin (CHROMA, Waldeck, Münster, DE) für die Zytoplasmafärbung
- Einstellen in 1x 96 % Ethanol und 2x 100 % Ethanol für 2 min zur Entwässerung
- Einstellen in 2x Xylol für je 5 min

Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Vitro-Clud, R. Langenbrick, Emmendingen, DE) benetzt und mit einem Deckglas (R. Langenbrick, Emmendingen, DE) bedeckt.

#### **4.7.3 Digitalisierung der histologischen Proben**

Für die Erfassung der totalen Muskelzellendichte und Regeneratzellendichte wurden insgesamt 324 Schnitte angefertigt (Abb. 12). Alle HE-Schnitte wurden mit einem Whole Slide-based Scanner (Hamamatsu, NanoZoomer 2.OHT, JP) mit der Software NanoZoomer Digital Pathology mit dem 40er Objektiv eingescannt. Dabei wurde der gesamte Objektträger abfotografiert und das Bild im ndpi-Format gespeichert. Die Gesamtaufnahmen wurden anschließend mit der freiverfügbaren NDP.2view Software bearbeitet. Dazu wurden die einzelnen Schnitte in der Programmmaske anvisiert, ein Maßstabsbalken mit 1 mm Länge eingefügt und in 20-facher Vergrößerung als JPEG-Dateien abgespeichert. Parallel erfolgte eine erste Beurteilung der Schnittqualität in Hinsicht auf Gefrier-, Färb- und Schnittartefakte.

### **4.8 Datenerhebung**

Da zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kein computergestütztes Analyseverfahren für komplette Skelettmuskelquerschnitte in der HE-Färbung zur Verfügung stand, erfolgte die Erfassung aller Muskelzellen und Differenzierung der Regeneratzellen bisher manuell. Dieses Vorgehen war jedoch aufgrund der umfangreichen Stichprobe von über 400 geplanten Schnitten nicht realisierbar. Die korrekte Differenzierung von sich regenerierenden Muskelzellen in HE-gefärbten Muskelquerschnitten zeigte sich zudem stark von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängig.

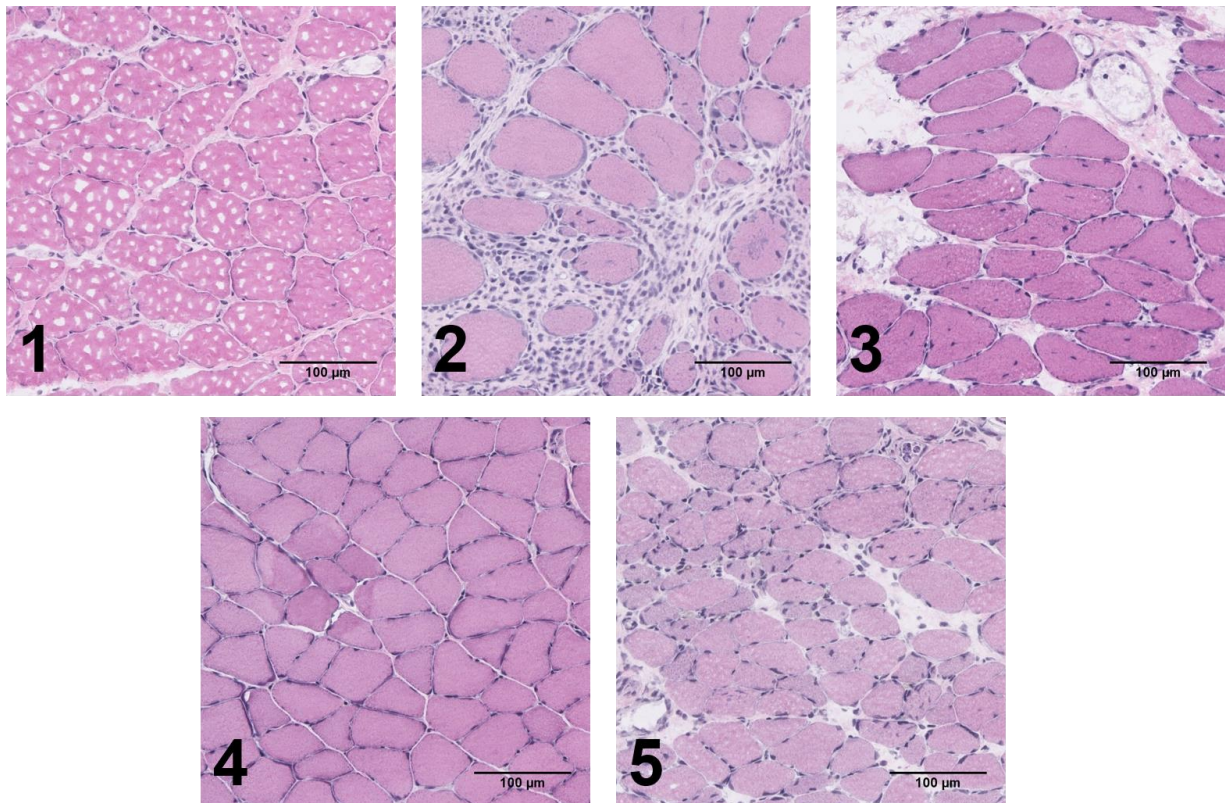
Daher wurde ein computergestütztes Bildanalyseverfahren entwickelt, welches den Untersucher zeitsparend und zuverlässig bei der Erfassung und der korrekten Differenzierung der Muskelzellen in kompletten Muskelquerschnitten unterstützte. Für die Erhebung der benötigten Daten fiel nach Sondierung verschiedener Programme die Wahl auf ImageJ.

#### **4.8.1 Voraussetzungen für die Verwendung von ImageJ**

Für die Entwicklung eines computergestützten Bildanalyseverfahrens mussten technischen Faktoren wie Bildgröße und Auflösung berücksichtigt werden. Weiterhin wurde insbesondere auf fünf



histomorphologische Merkmale eingegangen, die in HE-gefärbten Skelettmuskelquerschnitten vor allem zu einer irregulären Zerlegung zusammenhängender Bildstrukturen während der Bildanalyse mit segmentierenden Algorithmen führen können (Abb. 8): Vorkommen von Gefrierartefakten (1), unterschiedlich große Muskelzellen (2), verschiedene Zellformen (3), Unterschiede in der Farbintensität (4) und schwer zu differenzierende Zellgrenzen (5).



**Abbildung 8: Histologische Muskelquerschnitte mit verschiedenen Merkmalen.** Die folgenden Merkmale können segmentierenden Algorithmen Schwierigkeiten bereiten: 1 = Gefrierartefakte, 2 = unterschiedlich große Muskelzellen, 3 = verschiedene Zellformen, 4 = Unterschiede in der Farbintensität und 5 = schwer zu differenzierende Zellgrenzen.

#### 4.8.2 Entwicklung der Programmabläufe in ImageJ

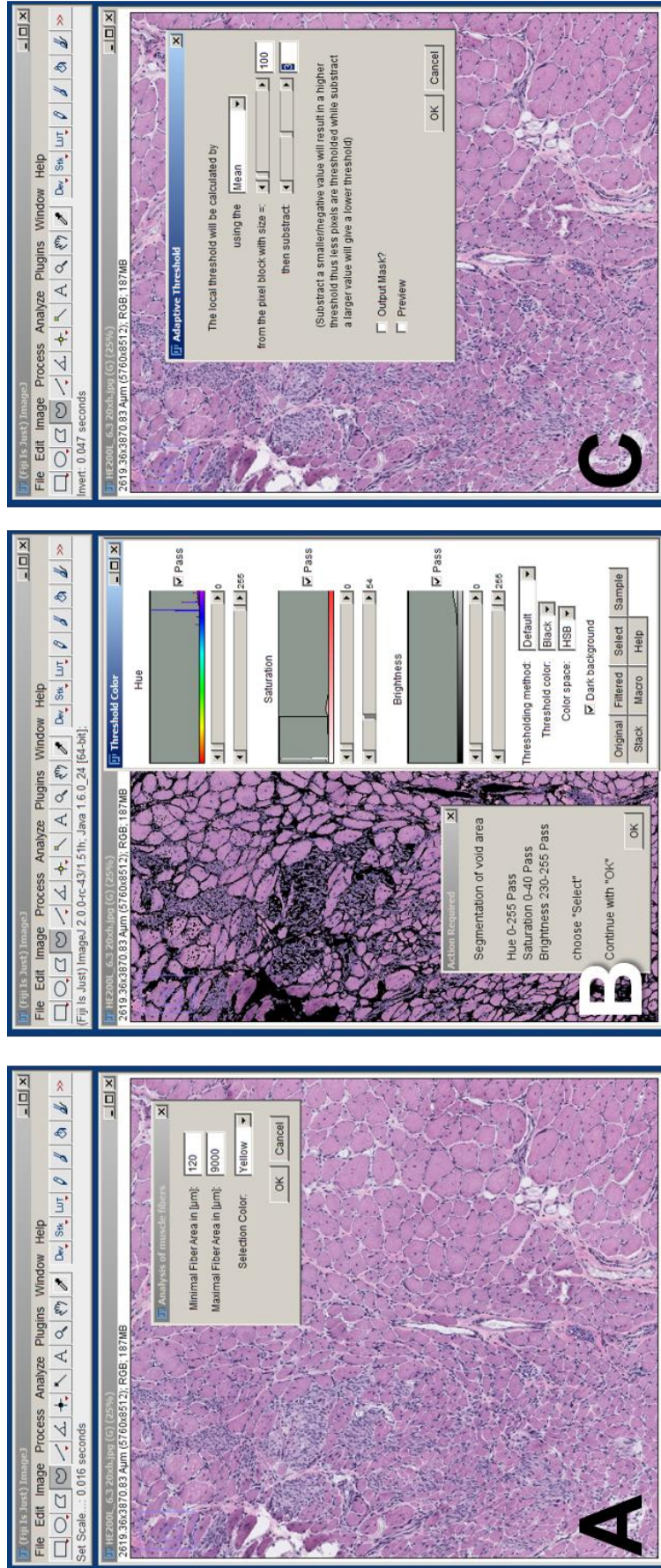
Basierend auf der Open-Source Software ImageJ entwickelte ich mit Unterstützung von Mario Thiele (Medizinisch-Technischer Assistent, Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration) ein halbautomatisches computergestütztes Segmentationsverfahren mit zwei aufeinander aufbauenden Makros, welche auf dem frei verfügbaren Plugin „Adaptive Threshold“ von Qingzong Tseng (letzter Zugriff: 04.05.2019, 14:08 Uhr: <https://sites.google.com/site/qingzongtseng/adaptivethreshold>) beruhen. Der entsprechende Quellcode ist der digitalen Version dieser Arbeit beigelegt bzw. auf Nachfrage verfügbar. Segmentierung bedeutet in der Bildverarbeitung die Erstellung von zusammenhängenden Regionen durch das Zusammenfassen von Pixeln nach einem definierten Homogenitätskriterium. Bis auf die „Adaptive Threshold“-Funktion wurden in diesem Makro nur Basiscodes verwendet, die zum Zeitpunkt der Auswertung mit ImageJ ebenfalls frei verfügbar waren. Neben der automatischen Abfolge von Basisbefehlen beinhalten diese Makros auch Masken zur manuellen Bearbeitung. Die Aufteilung aller Befehle auf zwei

Programmabfolgen ermöglichte die Berücksichtigung der unter 4.8.1 beschriebenen histomorphologischen Charakteristika.

Das erste Makro (muscle.fiber.analysis\_1.52.ijm©) konzentrierte sich dabei auf die Erfassung aller Muskelzellen, während das zweite Makro (muscle.fiber.analysis.adapt\_1.2.ijm©) die Differenzierung der Regeneratzellen ermöglichte. Im Folgenden werden die Schritte beider Programmabläufe beschrieben.

### ***Erstes Makro: Erstellung der Primärmaske mit vorläufiger Angabe der Anzahl aller Muskelzellen***

1. Öffnen des Originalbildes in ImageJ und Starten des Makros. Kalibration des Bildes anhand des eingefügten Maßstabsbalkens (1000  $\mu\text{m}$   $\approx$  2196pixel).
2. Abfrage von Minimum und Maximum der zu erwartenden Muskelzellflächen in  $\mu\text{m}^2$ , außerdem Festlegung der Farbe für die ausgewählten Bildelemente (Abb 9, Bild A).
3. Über die Threshold-Color-Funktion (Abb. 9, Bild B) wurde der Bereich eingegrenzt, der berechnet werden sollte. Mit Hilfe einer manuellen Nachbearbeitungsmaske wurde die *void area* (Leermaske) definiert. Dies diente dem Ausschluss von Bindegewebe.
4. Zur Vorbereitung für die Anwendung des Adaptive-Threshold-Tools wurden die Originalbilder in verschiedene Color-Stacks zerlegt. Aus dem RGB-Stack (R = red, G = green, B = blue) wurde die Rotmaske beibehalten, invertiert und ein Medianfilter zur Tilgung von Unebenheiten angewendet. Der HSB-Stack (H = hue, S = saturation, B = brightness) umfasste Informationen zu Farbton, Sättigung und Helligkeit der Bildpixel. Hier wurde die Farbtonmaske, ähnlich der Rotmaske, zur weiteren Bearbeitung verwendet.
5. Mit den Bildinformationen dieser beiden Masken isolierte das Adaptive-Threshold-Plugin anschließend die zu berücksichtigenden Strukturen von den übrigen Bildelementen (Abb. 9, Bild C). Dieses Plugin benutzt spezifische Algorithmen zur Formanalyse, die unabhängig vom Farbwert der Pixel eine Segmentation ermöglichen. Darüber hinaus war eine manuelle Eingabe eines Pixelumfangs notwendig, mit dem die Zellgrenzen genau bestimmt werden konnten.
6. Im letzten Schritt erfolgte die Anzeige der primären Ergebnismaske und Ausgabe der Ergebnisse in Form einer txt.-Datei. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in einer Excel-Tabelle festgehalten.

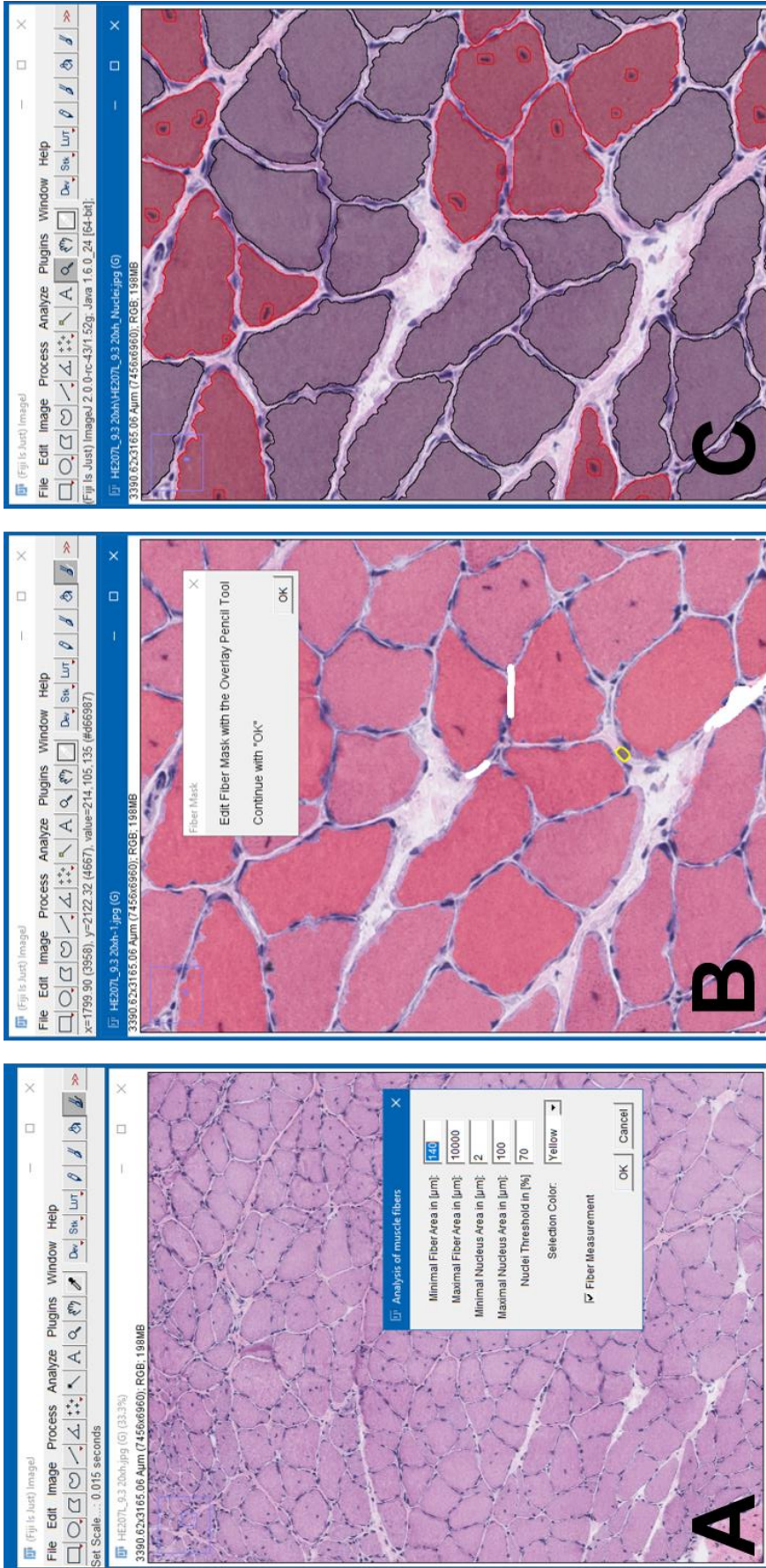


**Abbildung 9: Auszüge aus dem ersten Programmablauf.** Es werden die Muskelzelloberflächen festgelegt (A), Bildhintergrund wie z. B. Bindegewebe über die Threshold-Color-Funktion ausgeschlossen (B) und das Adaptive-Threshold-Plugin zur Erkennung und Segmentierung der Muskelzellen verwendet (C).



### **Zweites Makro: Erstellung der Sekundärmaske mit korrigierter Anzahl aller Zellen und der Differenzierung der Regeneratzellen**

1. Das Originalbild wurde geöffnet, wie oben bereits beschrieben. Das Programm griff dabei automatisch auf die schon erstellten Informationen aus den Berechnungen des ersten Makros zurück.
2. Abfrage der Muskelzellflächen in  $\mu\text{m}^2$  (min. und max.), Festlegung der Zellkerngrößen in  $\mu\text{m}^2$  (min. und max.) und des Nuclei-Thresholds in Prozent (min. 20 %, max. 80 %). Dieser Wert grenzte zusätzlich zur Flächenangabe die als Zellkerne zu berücksichtigenden Strukturen ein (Abb. 10, Bild A).
3. Manuelles Editieren: mit dem Overlay Pencil Tool konnten zusammenhängende Zellen als Ergebnis der Primärmaske manuell getrennt werden oder Flächen hinzugefügt werden (Abb. 10, Bild B).
4. Erstellung einer Rotmaske aus einem RGB-Stack wie oben beschrieben. Anschließend wurde ein Minimumfilter angewandt, um Kontraste im Bild zu verstärken. Dieser Schritt diente zur Isolation der Zellkerne im Zytoplasma. Die Überprüfung der zuvor definierten Größe und eine Abfrage zur Zirkularität der isolierten Strukturen grenzte die Auswahl weiter ein.
5. Die „bereinigte“ Zellkernmaske und die editierte Primärmaske wurden kombiniert. Daraus wurde eine Maske mit Zellen und „Löchern“, den isolierten Zellkernen, konstruiert. Zellen mit „Löchern“ konnten so vom Makro differenziert und gesondert gezählt werden.
6. Im letzten Schritt erfolgte die Anzeige der finalen Ergebnismaske (Abb. 10, Bild C) und Ausgabe der Ergebnisse (Anzahl aller Muskelzellen, Anzahl der Regeneratzellen) in Form einer txt.-Datei. Diese Zellen wurden in der Ergebnismaske zur besseren Identifikation rosa eingefärbt. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen.



**Abbildung 10: Auszüge aus dem zweiten Programmablauf.** Abfrage der Muskelzellflächen und Charakteristika der Zellkerne (A), manuelles Editieren mit dem Overlay Pencil Tool, um zusammenhängende Zellen zu trennen (B) und die Ergebnismaske mit Markierung aller Muskelzellen und Differenzierung der Zellen mit binnenständigen Kernen eingefärbt in rot (C).

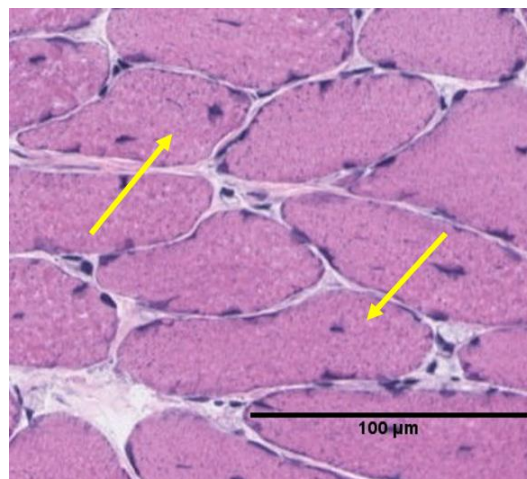
Die zum Bildquerschnitt dazugehörige Fläche wurde bei der Auswertung der gesamten Muskelquerschnitte separat mit dem Freihand-Lasso-Tool in ImageJ erfasst und in einer Excel-Tabelle abgespeichert. Im letzten Schritt wurde der Quotient aus der totalen Muskelzellanzahl bzw. Regeneratzellanzahl und der Fläche berechnet, woraus sich die totale Muskelzell- und Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> ergab.

#### 4.8.3 Validierung des halbautomatischen Segmentationsverfahrens in ImageJ

Das halbautomatische, computergestützte Segmentationsverfahren in ImageJ wurde in Hinblick auf die Bildverarbeitungsgeschwindigkeit und Zuverlässigkeit bei der Erfassung der Muskelzellen untersucht. Die Ergebnisse der totalen Muskelzell- und Regeneratzelldichte wurden mit denen der manuellen Erfassung durch zwei Untersucher verglichen. Dabei wurde angenommen, dass das manuelle Verfahren bei der Erfassung dieser histologischen Parameter den Goldstandard darstellt. Die Validierung des halbautomatischen Segmentationsverfahrens in ImageJ wurde in mehreren Schritten durchgeführt.

##### ***Vergleich beider Verfahren in 15 Bildausschnitten***

Für den Vergleich beider Verfahren wurden zunächst 15 Bildausschnitte verschiedener Muskelquerschnitte des M. soleus in der HE-Färbung mit einer Größe von 1000 x 1000 µm herangezogen. Die Auswahl der Bildausschnitte erfolgte unter Berücksichtigung verschiedener histomorphologischer Merkmale (Abb. 8), wobei jedes Merkmal in mindestens drei Ausschnitten vertreten war. Zudem enthielt jeder Ausschnitt mindestens 150 Muskelzellen. Die Gesamtanzahl der zu zählenden Zellen orientierte sich dabei an einer Publikation von Liu et al. [118]. Muskelzellen, die durch den Bildrand angeschnitten dargestellt waren, wurden sowohl vom Segmentationsverfahren als auch von den Untersuchern ausgeschlossen. Als Zellen mit binnenständigen Kernen bzw. Regeneratzellen wurden Muskelzellen definiert, die mindestens einen, deutlich von Zytoplasma umschlossenen Zellkern aufwiesen (Abb. 11).



**Abbildung 11: Definition von Zellen mit binnenständigem Zellkern.** Nur Muskelzellen, die mindestens einen, vollständig von Zytoplasma umschlossenen Zellkern aufwiesen (gelbe Pfeile), wurden als Zellen mit binnenständigem Kern, kurz Regeneratzellen, berücksichtigt.

### ***Systematische Beurteilung der Auswertung von Bildausschnitten mittels CSV***

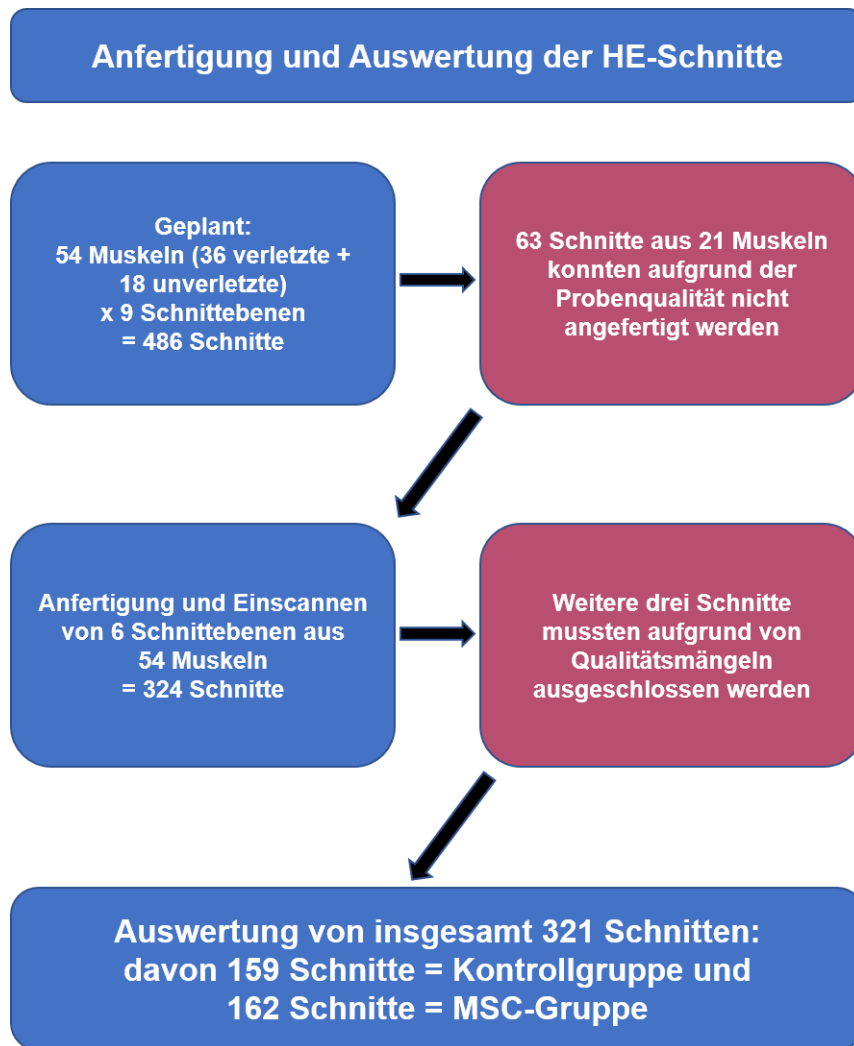
Im zweiten Schritt der Validierung des computergestützten Segmentationsverfahrens erfolgte die systematische Beurteilung der im Programmablauf integrierten Arbeitsschritte. Hier wurde insbesondere auf den Einfluss eingegangen, den die fünf histomorphologischen Merkmale Gefrierartefakte, unterschiedlich große Muskelzellen, verschiedene Zellformen, Unterschiede in der Farbintensität und schwer zu differenzierende Zellgrenzen auf die Auswertung mit dem computergestützten Segmentationsverfahren haben.

### ***Vergleich beider Verfahren in drei kompletten Skelettmuskelquerschnitten***

Anschließend wurden die totale Muskelzelldichte und die Regeneratzelldichte in drei kompletten Muskelquerschnitten des M. soleus der Ratte manuell erfasst und mit den Ergebnissen des computergestützten Segmentationsverfahren verglichen. Auch hier erfolgte die Auswahl der zu untersuchenden Schnitte unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Merkmale, von denen jedes in mindestens zwei Schnitten präsent war.

#### **4.8.4 Erfassung der totalen Muskelzelldichte und Differenzierung der Regeneratzellen**

In Abbildung 12 ist der Verlauf für die Auswahl der ausgewerteten histologischen Schnitte dargestellt. In die Auswertung gingen die Schnitte von insgesamt 54 Muskeln ein, davon 36 verletzte Muskeln (2 Gruppen x 6 Tiere x 3 Zeitpunkte). In jeweils drei Tieren pro Gruppe wurde zur internen Kontrolle auch der rechte, unverletzte Muskeln für die histologische Auswertung entnommen (18 unverletzte Muskeln). Pro Muskel waren neun Schnittebenen geplant, d. h. insgesamt 486 HE-Schnitte. In 21 Muskeln konnten aufgrund der Probenqualität nur sechs der ursprünglich neun geplanten Schnitte angefertigt werden. Bei diesen Muskeln repräsentierten jeweils zwei Schnitte eine Verletzungsregion. Von den restlichen Muskeln wurden ebenfalls nur sechs statt der neun Schnitte für die Analyse herangezogen um gleich große Stichproben zu erzielen. Insgesamt wurden 324 Schnitte eingescannt (54 Muskeln x sechs Schnitte). Drei weitere Schnitte wurden aufgrund von starken Prozessartefakten ausgeschlossen. In die Auswertung der totalen Muskelzell- und Regeneratzelldichte gingen schließlich die Daten von insgesamt 321 Muskelquerschnitten ein, davon 159 Schnitte aus der Kontrollgruppe und 162 Schnitte aus der MSC-Gruppe. Die Erfassung aller Parameter bezieht sich auf die komplette Muskelquerschnittsfläche des M. soleus und wurde in Zellen/mm<sup>2</sup> ausgedrückt.



**Abbildung 12: Anfertigung und Auswertung der HE-Schnitte.** In 21 Muskeln konnten aufgrund der Qualität der Kryoprobe nur sechs der ursprünglich neun geplanten Ebenen angefertigt werden. Diese sechs Ebenen wurden in gleichen Abständen über den Muskel verteilt, sodass zwei Schnitte jeweils eine Traumaregion repräsentieren. Aus den verbleibenden Muskeln wurden ebenfalls sechs Schnitte herangezogen (zwei pro Traumaregion). Daraus ergaben sich 324 Schnitte, von denen drei weitere Schnitte aufgrund von starken Prozessartefakten ausschieden. Final wurden 321 Schnitte für die Auswertung herangezogen.

#### 4.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Softwarepaket IBM® SPSS® 22.0 (IBM Corp., Chicago, IL, USA) verwendet. Im methodischen Ergebnisteil wurden die Werte des manuellen Verfahrens als Mittelwert der beiden Untersucher angegeben. Die absolute Abweichung ( $\Delta_{abs}$ ) zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren (CSV) wurde ganzzahlig aufgerundet. Die relative Abweichung ( $\Delta_{rel}$ ) wurde im Verhältnis zu beiden Untersuchern ausgedrückt, da die manuelle Erfassung als Goldstandard angenommen wurde. Der Zusammenhang zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren wurde mittels der Pearson-Korrelation dargestellt und zweiseitig getestet, wobei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurde.

Im experimentellen Teil sind die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE) dargestellt. Bei der Analyse des gesamten Muskels (verletzt) wurden die Ergebnisse von in der Regel sechs histologischen Schnitten pro Muskel von je sechs biologischen Replikaten pro Gruppe (Ausnahme unverletzte Muskeln: von je drei biologischen Replikaten) auf statistische Signifikanz ausgewertet. Bei der Analyse der



Verletzungsregionen wurden die Ergebnisse von in der Regel zwei histologischen Schnitten pro Muskel von je sechs biologischen Replikaten pro Gruppe auf statistische Signifikanz analysiert. Die Stichprobengröße wurde auf der Grundlage früherer Erfahrungen ausgewählt [92, 93], um die Anzahl der benötigten Tiere zu minimieren und gleichzeitig ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielen zu können. Für den Vergleich der Kontroll- und MSC-Gruppe wurde der t-Test für unabhängige, normalverteilte Stichproben verwendet. Der Levene-Test wurde verwendet, um die Homogenität der Varianzen der Daten für die angegebenen Gruppen zu bestimmen. Für den intraindividuellen Vergleich wurde der t-Test für abhängige, normalverteilte Stichproben verwendet. Alle Tests wurden zweiseitig analysiert, wobei ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angenommen und in den Graphen mit einem Stern (\*) markiert wurde. Detaillierte Informationen zu Fehlerbalken, Stichprobengrößen und statistischen Analysen sind in allen Abbildungen oder Legenden enthalten. Die Untersucher waren während der Experimente bei der Gruppenzuordnung nicht verblindet, da die beschriebenen Behandlungen offensichtliche Unterschiede zeigten.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Methodische Ergebnisse – Validierung des computergestützten Verfahrens**

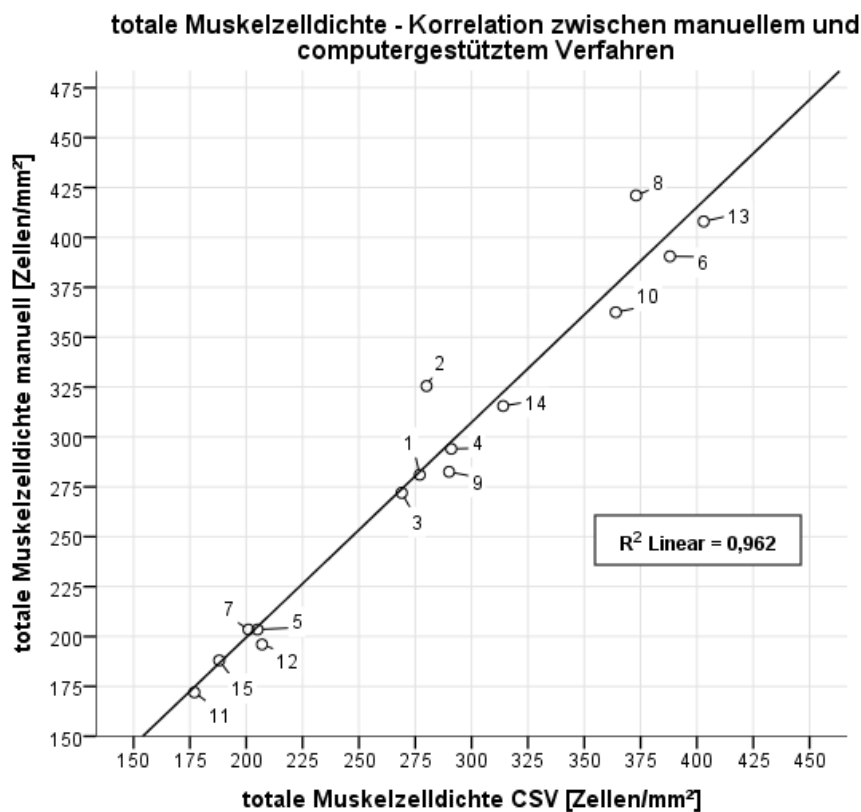
Während bislang überwiegend Bildausschnitte als Forschungsgrundlage herangezogen wurden, erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit die histologische Analyse mehrerer kompletter Muskelquerschnitte, um so den Einfluss von MSC auf die Muskelregeneration des gesamten Muskels erfassen zu können. Dieses Vorhaben konnte jedoch aufgrund des Stichprobenumfangs nur mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens umgesetzt werden, welches zeitsparend zuverlässige Ergebnisse liefert. Die besondere Herausforderung bestand in der Entwicklung und Validierung eines solchen Verfahrens, welches mit Hilfe der frei verfügbaren Bildanalysesoftware ImageJ realisiert wurde. Bevor im Folgenden detailliert auf die Ergebnisse der experimentellen Analyse eingegangen wird, soll zunächst die Validierung des hier entwickelten Verfahrens dargestellt werden.

#### **5.1.1 Vergleich beider Verfahren in 15 Bildausschnitten**

Die Validierung des computergestützten Segmentationsverfahrens (CSV) erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden 15 Bildausschnitte verschiedener Mm. solei der Ratte herangezogen, in denen die totale Muskelzelldichte und die Regeneratzell-dichte durch das CSV sowie manuell durch zwei Untersucher bestimmt wurden. Bei der Auswahl der Bildausschnitte wurden fünf histomorphologische Merkmale (Gefrierartefakte, unterschiedlich große Muskelzellen, verschiedene Zellformen, Unterschiede in der Farbintensität und schwer zu differenzierende Zellgrenzen) berücksichtigt, welche insbesondere die computergestützte Segmentation erschweren. Jedes Merkmal war dabei in mindestens drei Bildausschnitten vertreten.

### Erfassung der totalen Muskelzelldichte [Zellen/mm<sup>2</sup>]

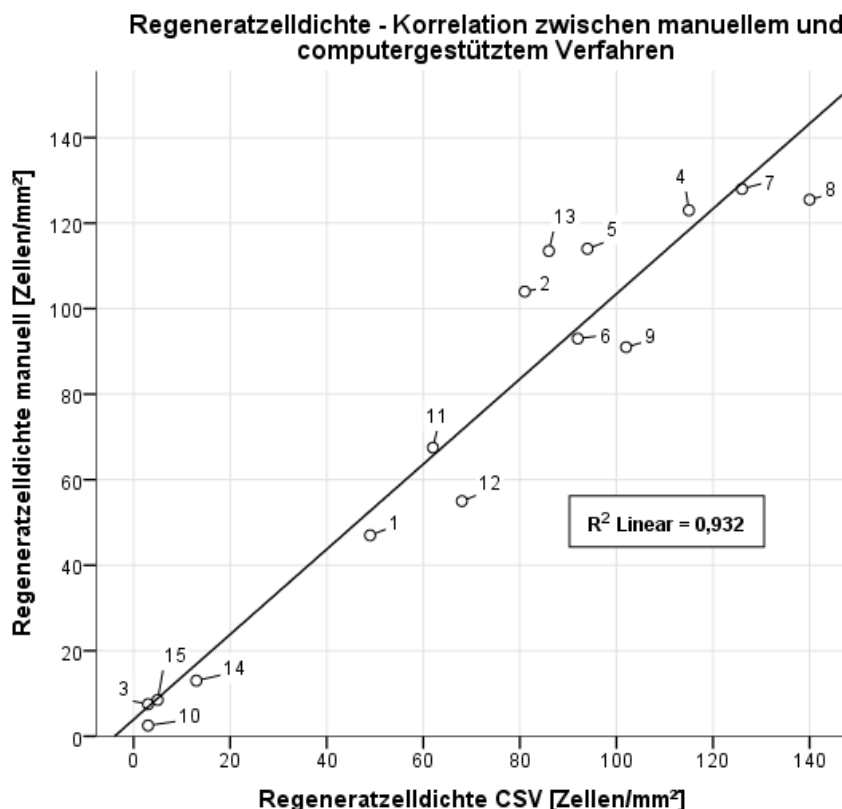
Abbildung 13 zeigt die totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> der 15 Bildausschnitte als Korrelationsgraphen der manuell durch zwei Untersucher (Mittelwert von U1 und U2) ermittelten Werte und der durch das CSV ermittelten Werte. Für die meisten Bildausschnitte führten beide Verfahren zu ähnlichen Ergebnissen. Für Bildausschnitt Nr. 2 mit dem Merkmal „Gefrierartefakte“ wurden im Vergleich zum manuellen Verfahren 46 Zellen ( $\Delta_{\text{abs}}$ ) durch das CSV nicht erfasst ( $\Delta_{\text{rel}} = -14,0\%$ ). Bei einem weiteren Ausschnitt mit dem Merkmal „verschiedene Zellformen“ (Nr. 8) hatte das CSV ebenfalls 48 Zellen ( $\Delta_{\text{abs}}$ ) nicht identifiziert ( $\Delta_{\text{rel}} = -11,4\%$ ). Insgesamt erfasste das manuelle Verfahren in allen 15 Bildausschnitten 4316 Zellen, während das CSV insgesamt 4227 Zellen erfasste ( $\Delta_{\text{abs}} = 89$  Zellen). Im Vergleich zum manuellen Verfahren ergibt sich somit für das CSV eine Identifizierungsrate von 97,9%. Der mittels Pearson-Korrelation bestimmte Koeffizient mit dem Wert  $r = 0,981$  weist auf einen linearen Zusammenhang zwischen manueller und computergestützter Erfassung der totalen Muskelzelldichte hin ( $p < 0,001$ ). Der Anteil der gemeinsamen Varianz beträgt  $r^2 = 96,2\%$ .



**Abbildung 13: Korrelation der totalen Muskelzelldichte zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren.** Die Abbildung zeigt die manuell bestimmte Muskelzelldichte über die CSV bestimmte Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> von 15 Bildausschnitten mit verschiedenen Merkmalen. Das Verhältnis wurde mittels Pearson-Korrelation bestimmt. Nr. 1, 2, 3 = Gefrierartefakte; Nr. 4, 5, 6 = unterschiedlich große Muskelzellen; Nr. 7, 8, 9 = verschiedene Zellformen; Nr. 10, 11, 12 = Unterschiede in der Farbintensität; Nr. 13, 14, 15 = schwer zu differenzierende Zellgrenzen.

### Erfassung der Regeneratzelldichte [Zellen/mm<sup>2</sup>]

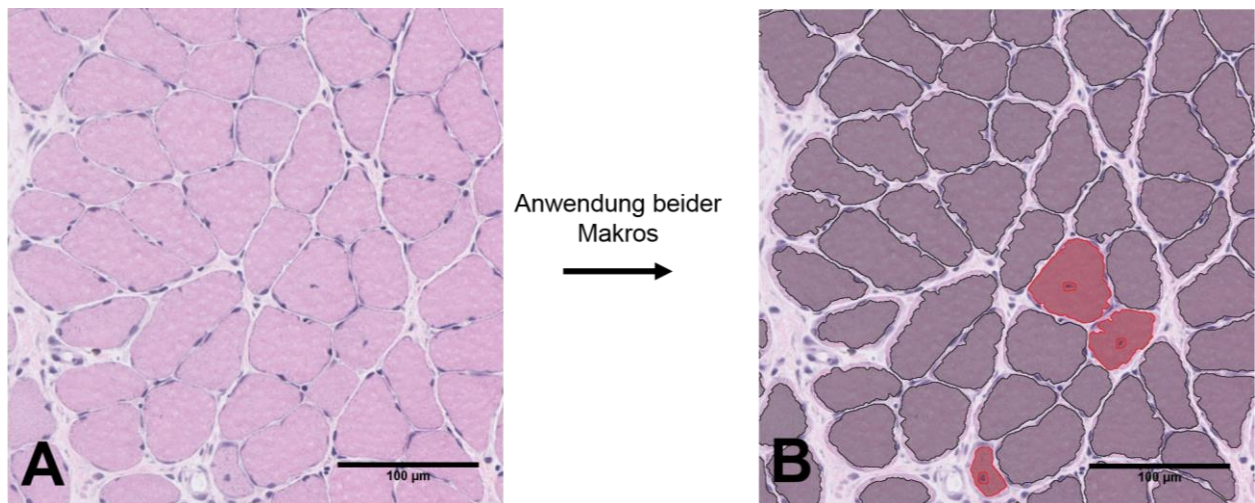
Abbildung 14 zeigt die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> der 15 Bildausschnitte als Korrelationsgraphen der durch beide Verfahren ermittelten Werte. In den Bildausschnitten Nr. 2, 5 und 13 erfasste das CSV weniger Regeneratzellen als das manuelle Verfahren (Nr. 2  $\Delta_{\text{abs}} = 23$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = -22,1\%$ ; Nr. 5  $\Delta_{\text{abs}} = 20$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = -17,5\%$ ; Nr. 13  $\Delta_{\text{abs}} = 28$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = -24,2\%$ ), welche jeweils die Merkmale „Gefrierartefakte“, „unterschiedlich große Muskelzellen“ und „schwer zu differenzierende Zellgrenzen“ aufwiesen. Auch in Bildausschnitt Nr. 3 und 15 zählte das CSV weniger Regeneratzellen (Nr. 3  $\Delta_{\text{abs}} = 5$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = -60,0\%$ ; Nr. 15  $\Delta_{\text{abs}} = 4$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = -41,2\%$ ), wobei beide Ausschnitte aus unverletzten Muskeln stammten. In den Bildausschnitten Nr. 8, 9 und 12 erfasste das CSV mehr Regeneratzellen als das manuelle Verfahren (Nr. 8  $\Delta_{\text{abs}} = 15$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = 11,6\%$ ; Nr. 9  $\Delta_{\text{abs}} = 11$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = 12,1\%$ ; Nr. 12  $\Delta_{\text{abs}} = 13$  Zellen,  $\Delta_{\text{rel}} = 23,6\%$ ). Ausschnitt Nr. 8 und 9 wiesen das Merkmal „verschiedene Zellformen“ auf, während Nr. 12 das Merkmal „Unterschiede in der Farbintensität“ zeigte. Insgesamt erfasste das manuelle Verfahren 1093 Regeneratzellen (Mittelwert beider Untersucher), während das CSV in allen 15 Bildausschnitten 1039 Regeneratzellen erfasste, womit sich für das CSV eine Identifizierungsrate von 95,1 % ergibt. Der mittels Pearson-Korrelation bestimmte Koeffizient mit dem Wert  $r = 0,965$  weist auf einen linearen Zusammenhang zwischen manueller und computergestützter Erfassung der Regeneratzelldichte hin ( $p < 0,001$ ). Der Anteil der gemeinsamen Varianz beträgt  $r^2 = 93,2\%$ .



**Abbildung 14: Korrelation der Regeneratzelldichte zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren.** Die Abbildung zeigt die manuell bestimmte Regeneratzelldichte über die CSV bestimmte Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> von 15 Bildausschnitten mit verschiedenen Merkmalen. Das Verhältnis wurde mittels Pearson-Korrelation bestimmt. Nr. 1, 2, 3 = Gefrierartefakte; Nr. 4, 5, 6 = unterschiedlich große Muskelzellen; Nr. 7, 8, 9 = verschiedene Zellformen; Nr. 10, 11, 12 = Unterschiede in der Farbintensität; Nr. 13, 14, 15 = schwer zu differenzierende Zellgrenzen.

### 5.1.2 Systematische Beurteilung der Auswertung von Bildausschnitten mittels CSV

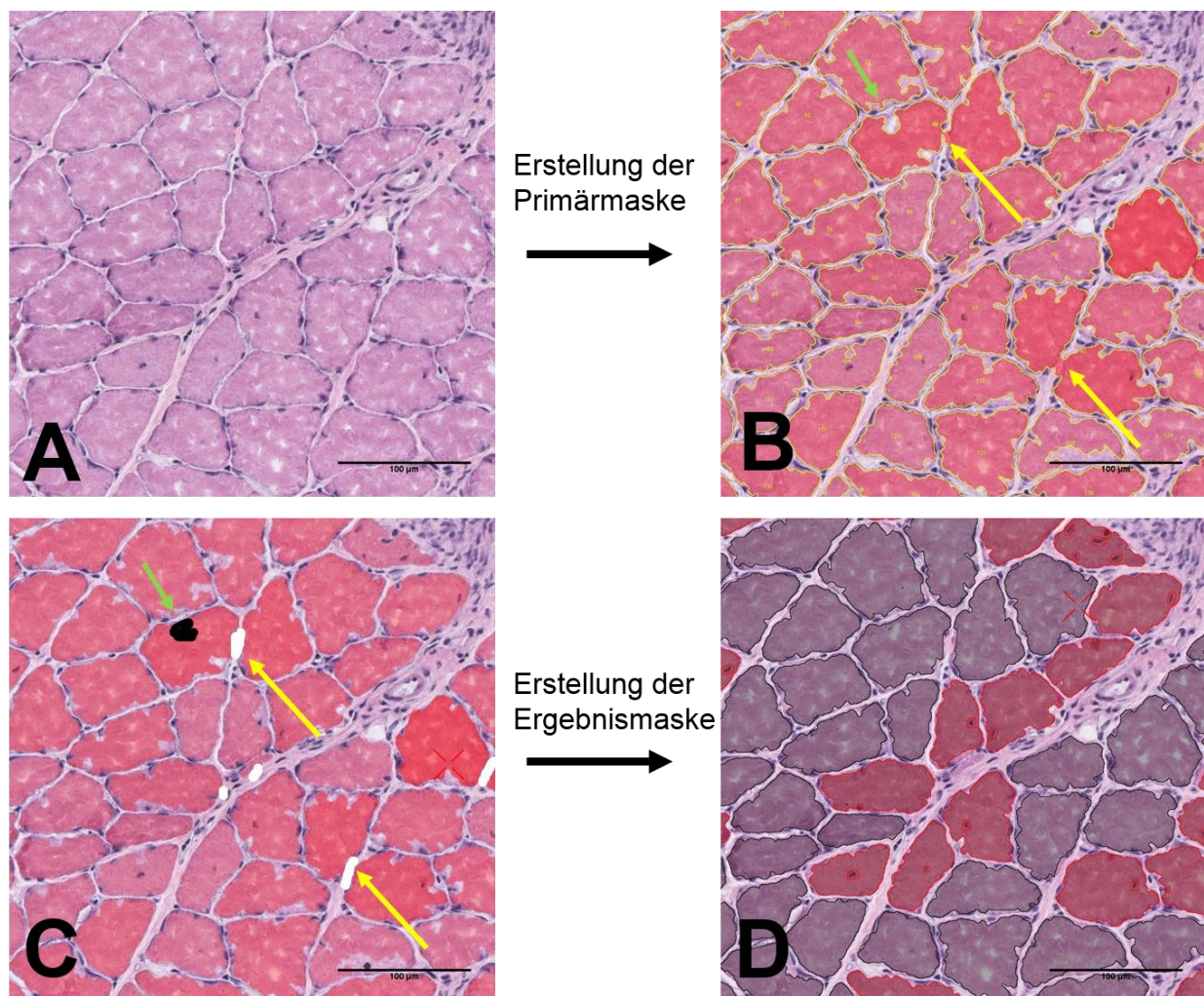
Im zweiten Schritt der Validierung des CSV erfolgte eine systematische Beurteilung und Beschreibung der computergestützten Analyse. Abbildung 15 zeigt einen beispielhaften Ausschnitt für die Auswertung eines Muskelquerschnitts in der HE-Färbung mit dem CSV. Die Zellen mit binnenständigen Kernen wurden in der Ergebnismaske in Rot korrekt hervorgehoben, alle anderen Zellen ohne eindeutig binnenständige Kerne wurden in Grau dargestellt (Bild B).



**Abbildung 15: Computergestützte Segmentierung in einem histologischen Muskelquerschnitt.** A = natives Bild vor Anwendung des CSV; B = Ergebnismaske nach Anwendung beider Programmabläufe, wobei Zellen mit binnenständigen Kernen in Rot hervorgehoben und alle anderen Muskelzellen in Grau dargestellt wurden.

### **Merkmal „Gefrierartefakte“**

Die drei 1000 x 1000 µm großen Bildausschnitte (Nr. 1, 2 und 3; Abb. 13 und 14) wiesen insgesamt ca. 80 % Zellen mit Gefrierartefakten auf. Nach Anwendung des ersten Makros stellten sich in der Primärmaske, welche eine vorläufige Angabe aller Zellen enthält, markierte Muskelzellen mit einer ausgefransten Umrandung dar (Abb. 16, grüner Pfeil in Bild B). An manchen Stellen waren die Gefrierartefakte so prominent, dass es zu einer irregulären Zerlegung der Muskelzellen kam, d.h. eine Zelle wurde als zwei oder mehr Zellen dargestellt und gezählt. Um die Übersegmentation zu minimieren, wurde über die Sättigung der Threshold-Color-Funktion mehr Bildhintergrund zur Berechnung hinzugefügt. Dies hatte zur Folge, dass verbundene Zellen in der Maske der manuellen Editierung im zweiten Makro wieder getrennt werden mussten (Abb. 16, gelbe Pfeile in Bild C). Zellkerne wurden trotz Gefrierartefakte überwiegend korrekt identifiziert (Abb. 16, Bild D). Die Bearbeitungsgeschwindigkeit der Bildausschnitte mit dem Merkmal Gefrierartefakte lag beim CSV durchschnittlich bei  $7 \pm 2$  min pro Bild, bei den Untersuchern bei  $11 \pm 3$  min.

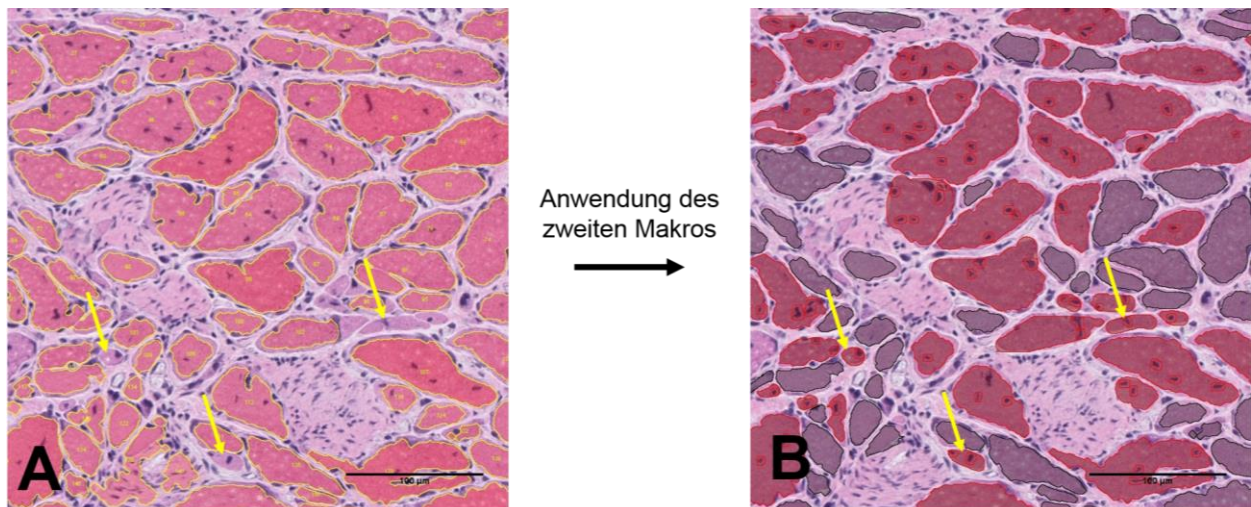


**Abbildung 16: Computergestützte Segmentierung in einem Muskelquerschnitt mit Gefrierartefakten.** A = Gefrierartefakte stellten sich als „Löcher“ im Zytoplasma dar (Bild unbearbeitet); B = Primärmaske nach Anwendung des ersten Makros, in der sich noch verbundene (gelbe Pfeile) und ausgefranste Zellen darstellten (grüner Pfeil); C = verbundene Zellen wurden manuell getrennt (gelbe Pfeile) und fehlende Zellfläche ergänzt (grüner Pfeil); D = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros, in der Regeneratzellen zur besseren Differenzierung rot eingefärbt wurden.



### **Merkmal „unterschiedliche große Muskelzellen“**

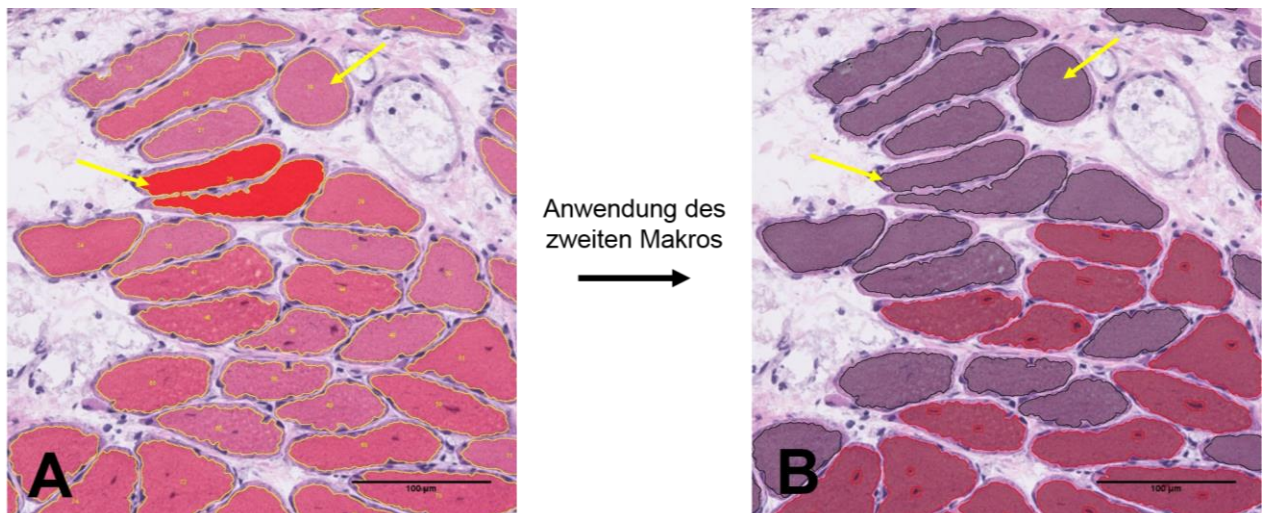
Die weiteren drei 1000 x 1000  $\mu\text{m}$  großen Bildausschnitte (Nr. 4, 5 und 6; Abb. 13 und 14) zeichneten sich durch eine besonders variable Muskelzellquerschnittsfläche aus. Beispielsweise befanden sich in Bildausschnitt Nr. 4 Muskelzellen mit einer Querschnittsfläche von 80 bis 7438  $\mu\text{m}^2$ . Um verschieden große Zellen innerhalb eines Bildausschnitts erfassen zu können, wurde im ersten Programmablauf über das Dialog-Fenster *fiber size* das Zellgrößenspektrum eingestellt (Abschnitt 4.8.2, Abb. 9, Bild A). Es war zudem möglich, die Zellgröße auch zu Beginn des zweiten Programmablaufs nochmal anzupassen. Die Bearbeitungsgeschwindigkeit der Bildausschnitte mit dem Merkmal „unterschiedliche große Muskelzellen“ lag beim CSV durchschnittlich bei  $6 \pm 1$  min pro Bild, während die Geschwindigkeit bei den Untersuchern bei  $10 \pm 2$  min lag.



**Abbildung 17: Computergestützte Segmentation in einem Muskelquerschnitt mit unterschiedlich großen Muskelzellen.** A = primäre Ergebnismaske nach Anwendung des ersten Makros, in der besonders kleine Muskelzellen noch nicht erfasst wurden; B = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros, in der auch Muskelzellen ab einer Fläche von ca. 80  $\mu\text{m}^2$  erfasst wurden.

### **Merkmal „verschiedene Zellformen“**

Die Bildausschnitte mit dem Merkmal verschiedene Muskelzellformen ließen sich mit dem computergestützten Segmentationsverfahren gut bearbeiten. In den drei 1000 x 1000 µm großen Bildausschnitten (Nr. 7, 8 und 9; Abb. 13 und 14) wurden rundliche wie längliche Muskelzellen korrekt erkannt und bedurften keiner zusätzlichen manuellen Bearbeitung. Darüber hinaus war das Makro so programmiert worden, dass es nach Abschluss des ersten Programmablaufes die Zellen entsprechend ihrer Fläche in verschiedene Rottöne einfärbte, sodass man sich bei Betrachtung der Primärmaske besser orientieren konnte. Große, zusammenhängenden Zellen konnten so schneller erkannt und anschließend im zweiten Programmablauf manuell bearbeitet werden (Abb. 18, Bild A, leuchtend rote, zusammenhängende Zellen). Die Bearbeitungsgeschwindigkeit der Bildausschnitte mit dem Merkmal „verschiedene Zellformen“ lag beim CSV durchschnittlich bei  $8 \pm 2$  min pro Bild, bei den Untersuchern bei  $14 \pm 4$  min.

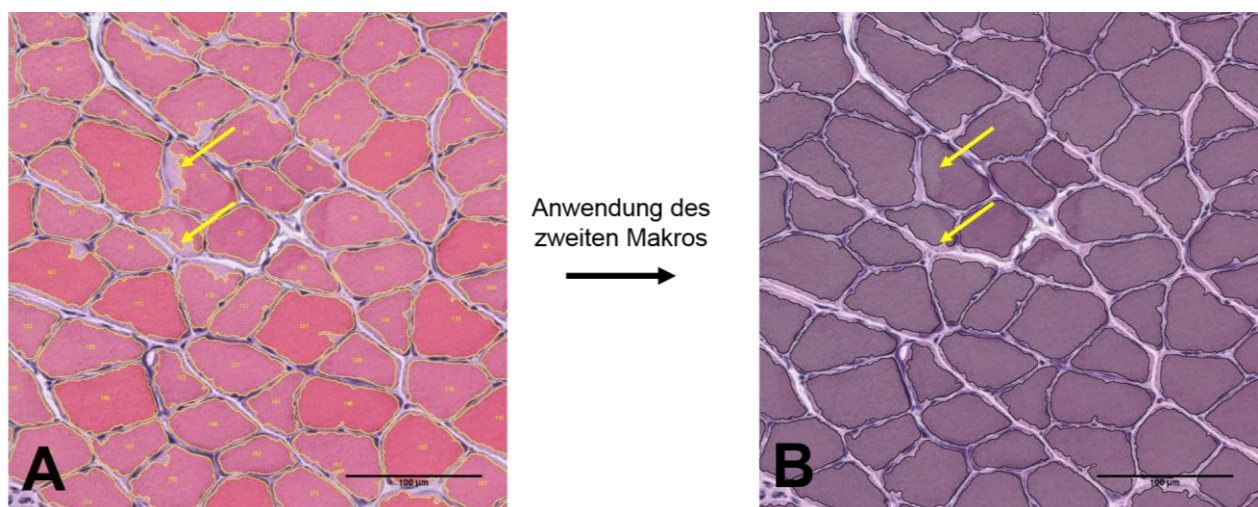


**Abbildung 18: Computergestützte Segmentation in einem Muskelquerschnitt mit verschiedenen Zellformen.** A = primäre Ergebnismaske nach Anwendung des ersten Makros, in der rundliche und längliche Strukturen als Muskelzellen markiert wurden (gelbe Pfeile); B = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros, in der dieselben Strukturen nach manueller Bearbeitung dargestellt wurden.



### **Merkmal „Unterschiede in der Farbintensität“**

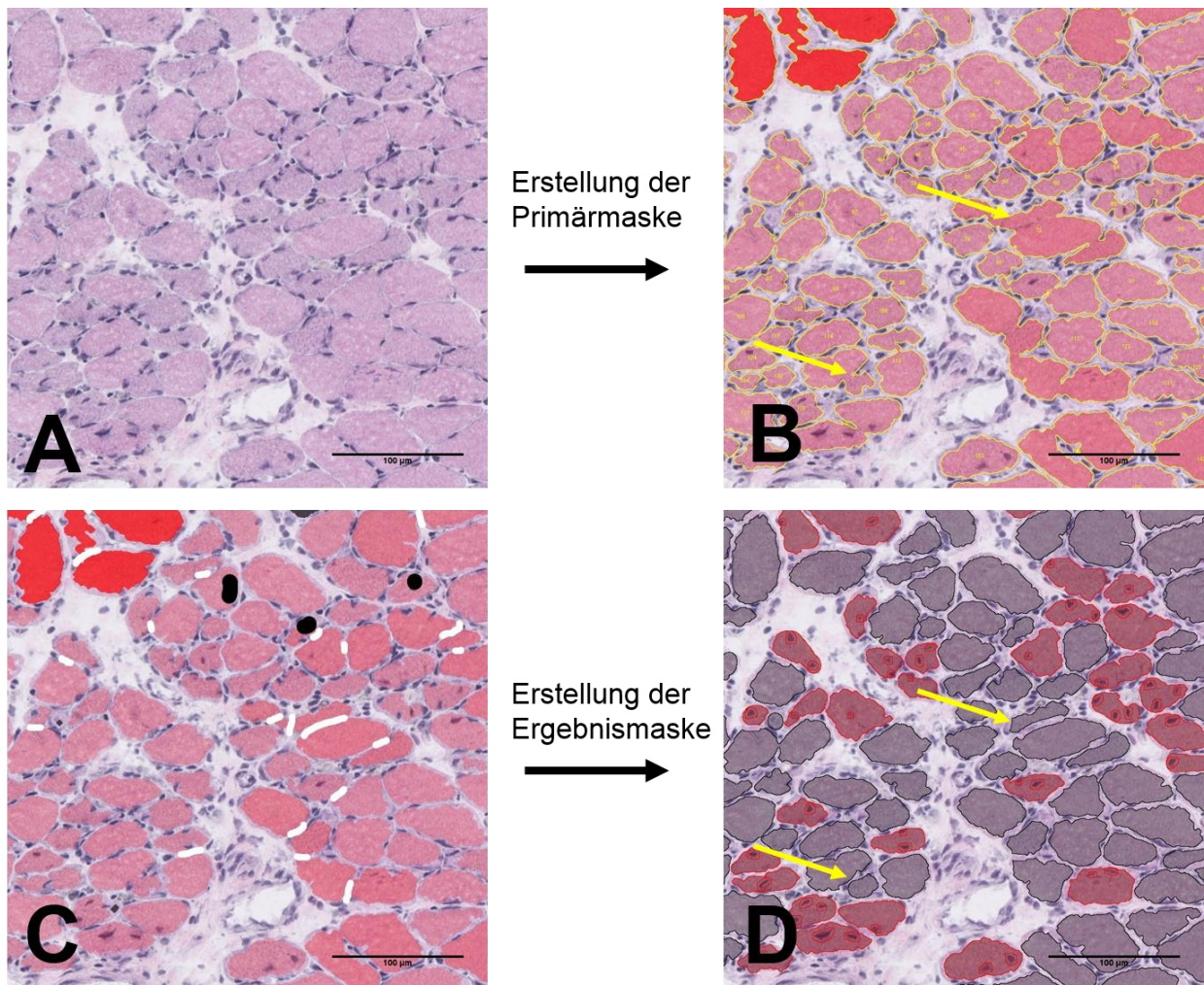
Unterschiedliche Farbintensitäten war das bestimmende Merkmal in den drei 1000 x 1000 µm Bildausschnitten Nr. 10, 11, und 12 (Abb. 13 und 14). Um diesem Problem zu begegnen, wurde mittels Threshold-Color-Funktion die Sättigung so ausgerichtet, dass der Großteil des Bildbereichs zur weiteren Analyse eingeschlossen wurde. Auf diese Weise eingeschlossenes Bindegewebe konnte anschließend im Dialog-Fenster „Void Area“ manuell ausgeschlossen werden. Zusammenhängende Zellenflächen, die sich nach dem ersten Programmablauf ergeben hatten, konnten im zweiten Programmablauf mit dem Overlay Pencil Tool manuell getrennt werden. Die Bearbeitungsgeschwindigkeit der Bildausschnitte mit dem Merkmal „Unterschiede in der Farbintensität“ lag beim CSV durchschnittlich bei  $7\pm 1$  min pro Bild, beim manuellen Verfahren bei  $10\pm 1$  min.



**Abbildung 19: Computergestützte Segmentation in einem Muskelquerschnitt mit unterschiedlichen Farbintensitäten des Zytoplasmas.** A = primäre Ergebnismaske nach Anwendung des ersten Makros, in der aufgrund unterschiedlicher Farbintensitäten das Zytoplasma nicht ausreichend erfasst wurde (gelbe Pfeile); B = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros, in der nach manueller Bearbeitung die Zellumrandung vollständig wiedergegeben wurde.

### **Merkmal „schwer zu differenzierende Zellgrenzen“**

Neben Gefrierartefakten stellte die korrekte Abgrenzung nahe beieinanderliegender Muskelzellen in diesen 1000 x 1000 µm großen Bildausschnitten (Nr. 13, 14 und 15; Abb. 13 und 14) ein Problem für die computergestützte Segmentierung dar. Insbesondere in Bildausschnitten mit verletztem, sich regenerierendem Muskelgewebe war eine effiziente Segmentierung erschwert. Um diese zu erreichen, musste über die Threshold-Color-Funktion zunächst möglichst viel Bildhintergrund ausgeschlossen werden. Zeigten sich in der Übersicht viele kleine Muskelzellen, war es hilfreich, eine Zellfläche von < 100 µm<sup>2</sup> auszuwählen. Im zweiten Makro mussten viele Muskelzellen mit dem Overlay Pencil Tool manuell voneinander getrennt werden (Abb. 20, Bild C). Die Bearbeitungsgeschwindigkeit der Bildausschnitte mit dem Merkmal „schwer zu differenzierende Zellgrenzen“ lag beim CSV durchschnittlich bei 5±2 min pro Bild, beim manuellen Verfahren bei 9±6 min.

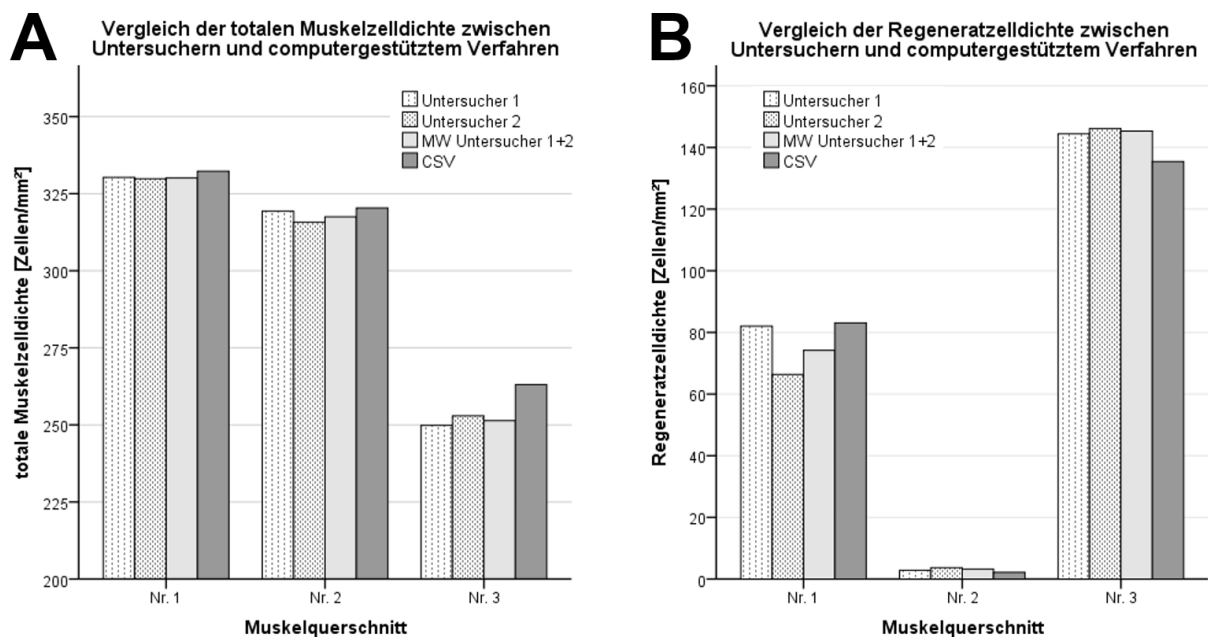


**Abbildung 20: Computergestützte Segmentierung in einem Muskelquerschnitt mit schwer zu differenzierenden Zellgrenzen.** A = unreife, eng beieinanderliegende Muskelzellen (Bild unbearbeitet); B = primäre Ergebnismaske nach Anwendung des ersten Makros, in der noch nicht alle Zellen korrekt getrennt wurden (gelbe Pfeile); C = manuelle Trennung von Muskelzellen; D = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros, in der nach manueller Bearbeitung alle Zellen vollständig getrennt wurden.

### 5.1.3 Vergleich beider Verfahren in drei kompletten Skelettmuskelquerschnitten

Im dritten Schritt wurden beide Verfahren an kompletten Muskelquerschnitten getestet. Jedes der fünf histomorphologischen Merkmale war in mindestens zwei Schnitten präsent. Abbildung 21 zeigt die vom CSV und vom manuellen Verfahren erfasste totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> für drei komplette Querschnitte verschiedener Mm. solei der Ratte (Bild A). Für die Muskelquerschnitte Nr. 1 und 2 führten beide Verfahren zu ähnlichen Ergebnissen der totalen Muskelzelldichte, wobei das CSV jeweils 2 Zellen/mm<sup>2</sup> mehr erfasste ( $\Delta_{rel} = <1\%$ ). Bei Bild Nr. 3 wurden vom CSV 12 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\Delta_{rel} = 4,7\%$ ) mehr gezählt im Vergleich zum manuellen Verfahren. Das CSV identifizierte in allen drei Querschnitten insgesamt 916 Zellen/mm<sup>2</sup>, während das manuelle Verfahren insgesamt 899 Zellen/mm<sup>2</sup> erfasste ( $\Delta_{abs} = 17$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $\Delta_{rel} = 1,9\%$ ).

Bei der Differenzierung der Regeneratzellen identifizierte das CSV im Muskelquerschnitt Nr. 1 9 Zellen/mm<sup>2</sup> ( $\Delta_{rel} = 11,9\%$ ) mehr als das manuelle Verfahren (Abb. 21, Bild B). Allerdings zeigte sich für denselben Muskelquerschnitt zwischen beiden Untersuchern ebenfalls ein Unterschied von 16 Zellen/mm<sup>2</sup>. Querschnitt Nr. 2 wies durch das manuelle Verfahren 3 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, das CSV ermittelte hier 2 Zellen/mm<sup>2</sup>. In Bild Nr. 3 erfasste das CSV 10 Zellen/mm<sup>2</sup> weniger ( $\Delta_{rel} = -6,8\%$ ) im Vergleich zum manuellen Verfahren. Das CSV identifizierte in allen drei Querschnitten insgesamt 223 Zellen/mm<sup>2</sup>, während das manuelle Verfahren insgesamt 221 Zellen/mm<sup>2</sup> erfasste ( $\Delta_{abs} = 2$  Zellen,  $\Delta_{rel} = <1\%$ ).



**Abbildung 21: Vergleich der totalen Muskelzelldichte und Regeneratzelldichte in drei kompletten Querschnitten.** Die Abbildung zeigt die manuell (Untersucher 1 und 2, Mittelwert beider Untersucher) und die vom CSV bestimmte totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich (Bild A). Bild B zeigt analog dazu die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup>; MW = Mittelwert.

Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Verfahren ließ sich bei der Bearbeitungszeit feststellen. Durch die computergestützte Methode konnte die totale Muskelzelldichte und die Differenzierung der Regeneratzellen pro Muskelquerschnitt in durchschnittlich 12 min (jeweils 13, 9 und 15 min) ermittelt werden. Die manuelle Erfassung beider Parameter dauerte dagegen durchschnittlich 59 min pro Muskelquerschnitt (jeweils 69, 44 und 64 min).

#### **5.1.4 Zusammenfassung der methodischen Ergebnisse**

Es zeigte sich, dass die durch das manuelle und computergestützte Verfahren ermittelten Werte stark miteinander korrelierten. Das computergestützte Segmentationsverfahren mit ImageJ erwies sich damit als geeignete Methode für die Erfassung der totalen Muskelzelldichte und Regeneratzelldichte. Insgesamt ermöglichte das computergestützte Segmentationsverfahren eine schnelle Analyse von Muskelzellen in großen Muskelquerschnitten und stellte sich im Vergleich zum manuellen Verfahren als deutlich zeitsparender heraus.

## **5.2 Experimentelle Ergebnisse – Erfassung der totalen Muskelzelldichte und Differenzierung der Regeneratzellen in regenerierenden Skelettmuskeln**

Die Anzahl aller Muskelzellen sowie die Anzahl der Zellen mit binnenständigen Kernen, kurz Regeneratzellen, werden als Indikatoren für eine effektive Muskelregeneration herangezogen (Abschnitt 3.6). Die Entwicklung eines computergestützten Segmentationsverfahrens zur Erfassung dieser Parameter ermöglichte nun, den Einfluss der MSC auf die Muskelregeneration des gesamten Muskels zu untersuchen. Im Folgenden wurde die totale Muskelzelldichte und Regeneratzelldichte in jeweils sechs kompletten Muskelquerschnitten pro Muskel in der HE-Färbung bestimmt. Es wurden verletzte und unverletzte Muskeln der MSC-Gruppe und Kontrollgruppe betrachtet. Anschließend erfolgte der Vergleich beider Gruppen. Dabei wurde zunächst der gesamte Muskel regionsübergreifend untersucht, anschließend erfolgte eine Analyse nach Verletzungsregion, um ein umfassendes Bild über das Regenerationsgeschehen im traumatisierten Skelettmuskel zu erhalten.



### 5.2.1 Auswertung der totalen Muskelzellichte – Betrachtung des gesamten Muskels

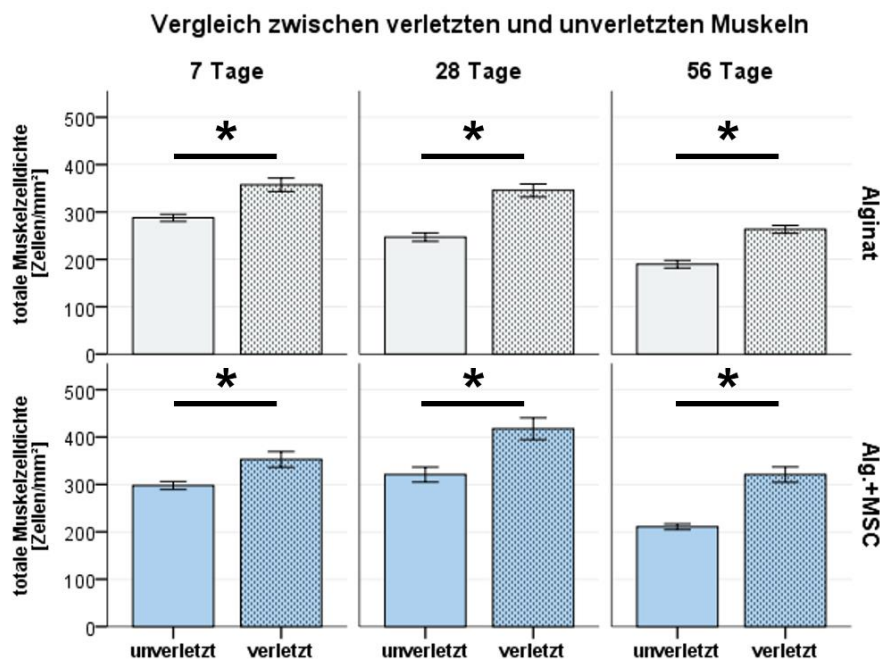
Abbildung 22 zeigt beispielhaft einen verletzten und unverletzten Muskel der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 7 Tage, wobei der traumatisierte Muskel eine totale Zelldichte von 320 Zellen/mm<sup>2</sup> aufwies, während der kontralaterale Muskel eine Zelldichte von 259 Zellen/mm<sup>2</sup> zeigte.



**Abbildung 22: komplette Muskelquerschnitte.** Repräsentative Aufnahmen eines Muskelquerschnitts aus dem proximalen Drittel eines verletzten (Bild A) und unverletzten (Bild B) M. soleus der Alginat-Gruppe zum Zeitpunkt 7 Tage.

### **Verletzte Muskeln weisen eine höhere totale Muskelzelldichte unabhängig von der Behandlung auf**

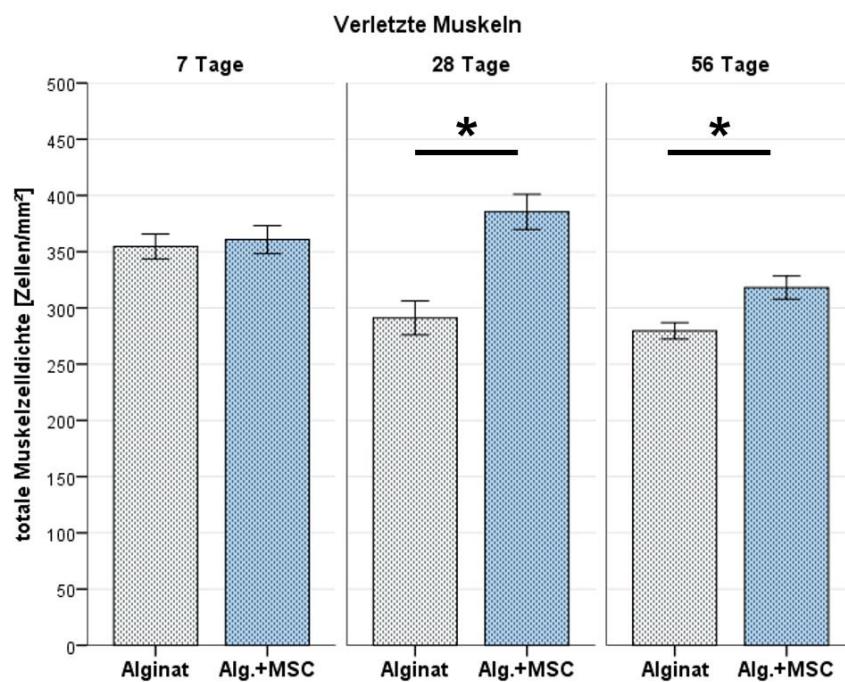
Es erfolgte zunächst der Vergleich der totalen Muskelzelldichte zwischen verletzten und unverletzten Mm. solei. In der Kontroll- wie auch in der MSC-Gruppe ließ sich zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere totale Muskelzelldichte in verletzten Muskeln feststellen (Abb. 23; Kontrollgruppe: Tag 7  $p = 0,001$ , Tag 28  $p < 0,001$ , Tag 56  $p < 0,001$ ; MSC-Gruppe: Tag 7  $p = 0,013$ , Tag 28  $p < 0,001$ , Tag 56  $p < 0,001$ ). In der Kontrollgruppe kam es sowohl in verletzten wie auch in unverletzten Muskeln zu einer graduellen Abnahme der Muskelzelldichte über den zeitlichen Verlauf. In der mit MSC behandelten Gruppe zeigte sich in verletzten sowie in unverletzten Muskeln eine höhere Zellidichte an Tag 28 gegenüber Tag 7.



**Abbildung 23: Vergleich der totalen Muskelzelldichte zwischen verletzten und unverletzten Mm. solei.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> verletzter und unverletzter Muskeln im Vergleich für die Kontroll- und MSC-Gruppe zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 18$  (3 Muskeln  $\times$  6 Schnitte); Ausnahme für Kontrollgruppe unverletzt Tag 56  $n = 17$  Schnitte; t-Test für abhängige Stichproben.

### **MSC erhöhen die totale Muskelzelldichte in verletzten Mm. solei im Vergleich zur Kontrollgruppe**

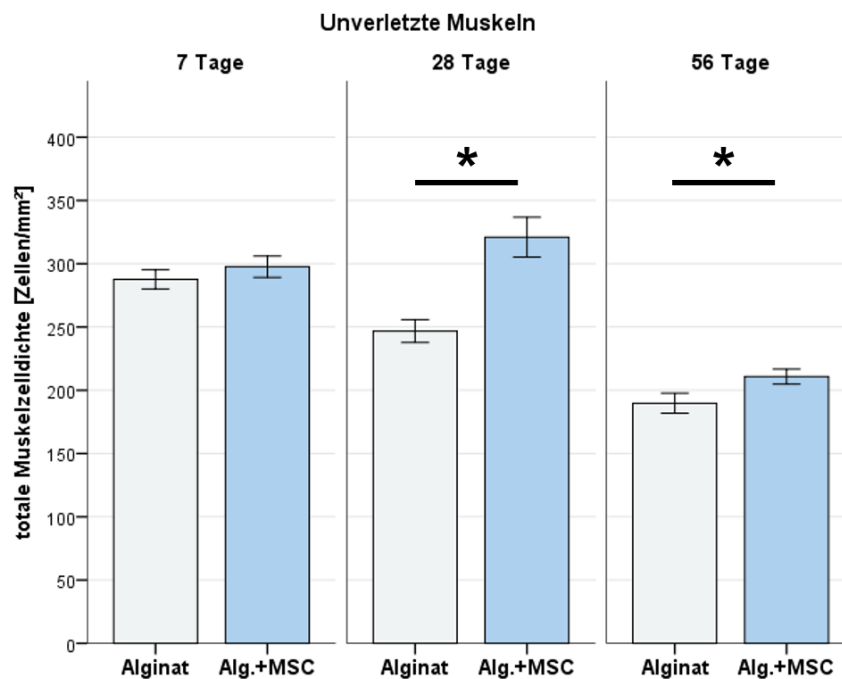
Als nächstes wurde der Effekt der MSC auf den verletzten Muskel im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht (Abb. 24). Sieben Tage nach Applikation des Quetschtraumas zeigte sich in der Kontrollgruppe eine mittlere Zelldichte von  $355 \pm 11$  Zellen/mm<sup>2</sup>. In der MSC-Gruppe lag die Zelldichte bei  $361 \pm 12$  Zellen/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,716$ ). Ein signifikanter Unterschied der Muskelzelldichte zeigte sich nach 28 Tagen, wobei die Behandlungsgruppe mit MSC eine höhere Muskelzelldichte mit  $385 \pm 16$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Alginate-Gruppe mit  $291 \pm 15$  Zellen/mm<sup>2</sup> aufwies ( $p < 0,001$ ). An Tag 56 lag die Muskelzelldichte der Kontrollgruppe bei  $280 \pm 7$  Zellen/mm<sup>2</sup>, während sich in der MSC-Gruppe eine signifikant höhere Muskelzelldichte mit  $318 \pm 10$  Zellen/mm<sup>2</sup> beobachten ließ ( $p = 0,003$ ).



**Abbildung 24: Vergleich der totalen Muskelzelldichte in verletzten Mm. solei.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> verletzter Muskeln der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 36$  (6 Muskeln  $\times$  6 Schnitte); Ausnahme für Kontrollgruppe 28 Tage  $n = 34$  Schnitte; t-Test für unabhängige Stichproben.

### **Eine erhöhte Muskelzelldichte zeigt sich auch in unverletzten Muskeln der MSC-Gruppe**

Weiterhin wurde die Muskelzelldichte in rechten, unverletzten Muskeln beider Gruppen miteinander verglichen (Abb. 25). Die totale Muskelzelldichte der Kontrollgruppe nahm mit zunehmendem Alter der Tiere kontinuierlich ab. Sie lag an Tag 7 bei  $288 \pm 8$  Zellen/mm<sup>2</sup>, nach 28 Tagen bei  $247 \pm 9$  Zellen/mm<sup>2</sup> sowie an Tag 56 bei  $190 \pm 8$  Zellen/mm<sup>2</sup>. In der mit MSC behandelten Gruppe ergab sich für Tag 7 eine vergleichbar hohe Dichte von  $298 \pm 8$  Zellen/mm<sup>2</sup> wie in der Kontrollgruppe ( $p = 0,385$ ). An Tag 28 ließ sich jedoch in der MSC-Gruppe eine signifikant höhere totale Muskelzelldichte von  $321 \pm 16$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Alginate-Gruppe beobachten ( $p < 0,001$ ). Nach 56 Tagen sank die Zelldichte in der mit MSC behandelten Gruppe auf  $211 \pm 6$  Zellen/mm<sup>2</sup> ab. Sie war damit jedoch immer noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,04$ ).



**Abbildung 25: Vergleich der totalen Muskelzelldichte in unverletzten Mm. solei.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> unverletzter Muskeln der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 18$  (3 Muskeln  $\times$  6 Schnitte); Ausnahme für Kontrollgruppe 56 Tage  $n = 17$  Schnitte; t-Test für unabhängige Stichproben.

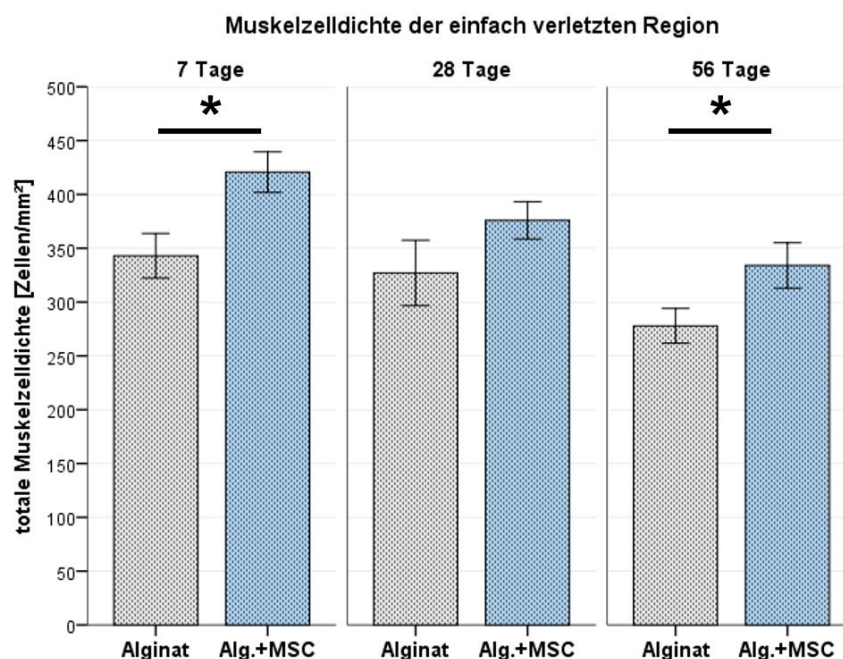


## 5.2.2 Auswertung der totalen Muskelzelldichte – Betrachtung der drei Verletzungsregionen

Eine der Kernfragen der Arbeit zielte auf den regionalen Wirkungsgrad der MSC ab. Nachfolgend ist die totale Muskelzelldichte der einfach, indirekt und zweifach verletzten Region im zeitlichen Verlauf für beide Gruppen untersucht worden.

### **MSC erhöhen die totale Muskelzelldichte der einfach verletzten Region zu allen Zeitpunkten**

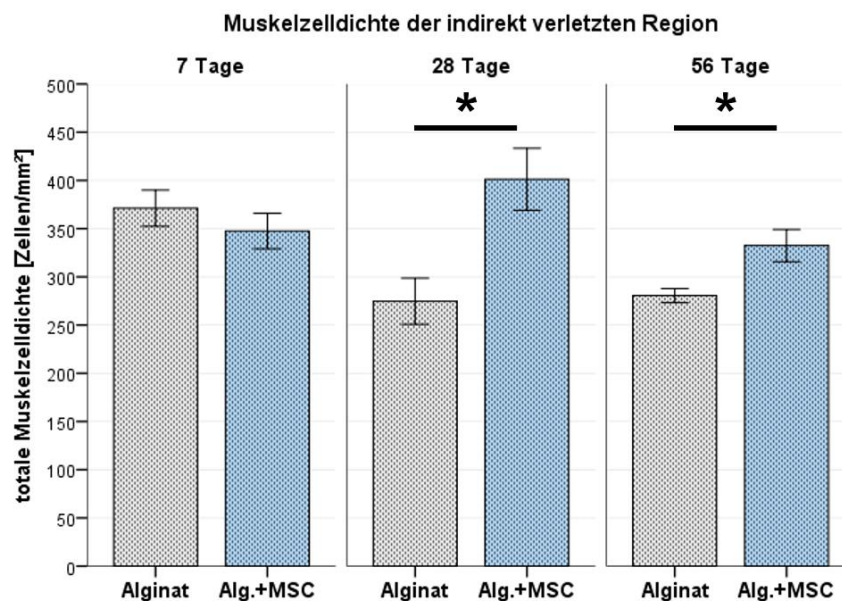
Abbildung 26 zeigt die totale Muskelzelldichte der einfach verletzten Region im zeitlichen Verlauf der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich. An Tag 7 fiel ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- (343±21 Zellen/mm<sup>2</sup>) und MSC-Gruppe (421±19 Zellen/mm<sup>2</sup>) in der einfach verletzten Region auf ( $p = 0,011$ ), der sich bei Betrachtung des gesamten Muskels nicht hatte beobachten lassen. Auch an Tag 28 zeigte die MSC-Gruppe eine höhere Muskelzelldichte, allerdings ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Alg. 327±30 Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.+MSC 376±17 Zellen/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,161$ ). An Tag 56 erwies sich der Unterschied der Muskelzelldichte zwischen beiden Gruppen wiederum als signifikant mit  $p = 0,046$  (Alg. 278±16 Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.+MSC 334±21 Zellen/mm<sup>2</sup>). In beiden Gruppen ließ sich eine graduelle Reduktion der totalen Muskelzelldichte beobachten.



**Abbildung 26: Totale Muskelzelldichte der einfach verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> der einfach verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert ± SE; n = 12 (6 Muskeln à 2 Schnitte pro Verletzungsregion); Ausnahme für Kontrollgruppe 28 Tage n = 10 Schnitte; t-Test für unabhängige Stichproben.

### **MSC erhöhen die totale Muskelzellichte der indirekt verletzten Region erst nach vier Wochen**

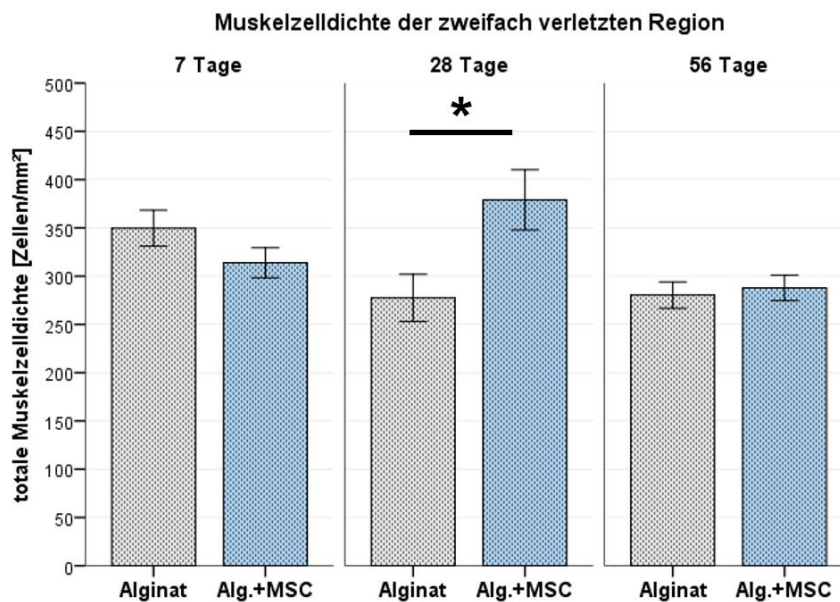
Abbildung 27 zeigt die totale Muskelzellichte der indirekt verletzten Region im zeitlichen Verlauf beider Gruppen. Im Vergleich zur benachbarten einfach verletzten Region zeigte sich an Tag 7 kein Unterschied zwischen Kontroll- und MSC-Gruppe, wobei die mit MSC behandelte Gruppe eine geringere Zelldichte aufwies (Alg.+MSC  $348 \pm 18$  Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.  $371 \pm 19$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,378$ ). Nach vier Wochen kam es in der MSC-Gruppe zu einem Anstieg der Zelldichte auf  $401 \pm 32$  Zellen/mm<sup>2</sup>, während in der Kontrollgruppe eine Zelldichte von  $275 \pm 24$  Zellen/mm<sup>2</sup> erfasst wurde, womit sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab ( $p = 0,005$ ). An Tag 56 fiel die Zelldichte in der MSC-Gruppe wieder auf  $332 \pm 17$  Zellen/mm<sup>2</sup> ab, blieb aber gegenüber der Kontrollgruppe ( $281 \pm 7$  Zellen/mm<sup>2</sup>) immer noch signifikant erhöht ( $p = 0,009$ ).



**Abbildung 27: Totale Muskelzellichte der indirekt verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzellichte in Zellen/mm<sup>2</sup> der indirekt verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 12$  (6 Muskeln  $\times$  2 Schnitte pro Verletzungsregion); t-Test für unabhängige Stichproben.

**Die totale Muskelzelldichte der zweifach verletzten Region zeigt einen der indirekt verletzten Region ähnlichen Verlauf in beiden Gruppen**

Abbildung 28 zeigt die totale Muskelzelldichte der zweifach verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im zeitlichen Verlauf. Analog zur benachbarten indirekt verletzten Region konnte man an Tag 7 in der MSC-Gruppe eine geringere totale Muskelzelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (Alg.+MSC 314±16 Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg. 350±19 Zellen/mm<sup>2</sup>; p = 0,153). An Tag 28 kam es in der mit MSC behandelten Gruppe zu einem Anstieg auf 379±31 Zellen/mm<sup>2</sup> mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit 277±24 Zellen/mm<sup>2</sup> (p = 0,018). An Tag 56 ließ sich wiederum eine Reduktion der Zelldichte in der MSC-Gruppe auf 288±13 Zellen/mm<sup>2</sup> beobachten, während die Zelldichte in der Kontrollgruppe bei 280±14 Zellen/mm<sup>2</sup> stagnierte (p = 0,698). Insgesamt zeigte sich für die zweifach verletzte Region beider Gruppen ein ähnlicher Verlauf der Zelldichte analog zur benachbarten indirekt verletzten Region.



**Abbildung 28: Totale Muskelzelldichte der zweifach verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die totale Muskelzell-dichte in Zellen/mm<sup>2</sup> der zweifach verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich zu allen Zeitpunkten. Angaben als Mittelwert ± SE; n = 12 (6 Muskeln à 2 Schnitte pro Verletzungsregion); t-Test für unabhängige Stichproben.

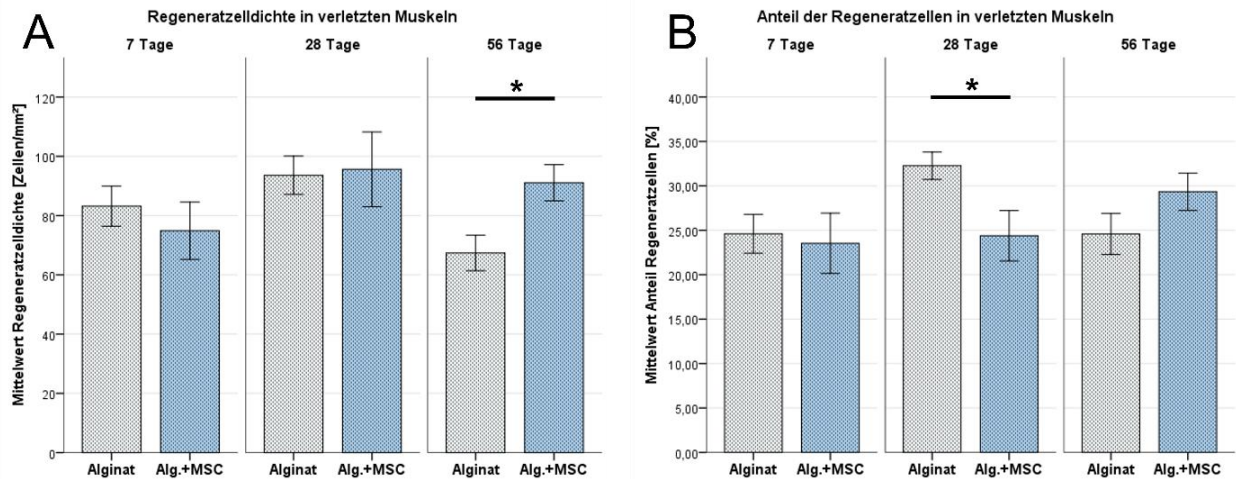
### 5.2.3 Auswertung der Regeneratzelldichte und des Anteils der Regeneratzellen – Betrachtung des gesamten Muskels

#### ***Die Regeneratzelldichte ist in verletzten Muskeln auch 8 Wochen nach Trauma deutlich gegenüber unverletzten Muskeln erhöht***

In unverletzten Muskeln ließen sich in der Kontroll- und MSC-Gruppe zu allen Zeitpunkten Zellen mit bin-nenständigen Kernen beobachten, wobei der Anteil der Regeneratzellen etwa 1-2 % pro mm<sup>2</sup> betrug. Im Vergleich dazu konnte man in verletzten Muskeln deutlich mehr Regeneratzellen pro mm<sup>2</sup> beobachten. An Tag 7 war die Regeneratzelldichte um das 20-fache in beiden Gruppen erhöht. Während die Zelldichte in beiden Gruppen bis Tag 28 weiter zunahm, zeigte sich an Tag 56 wiederum eine Reduktion der Regene-ratzelldichte. Sie war jedoch auch acht Wochen nach Trauma und Transplantation in verletzten Muskeln noch um etwa das 20 bis 40-fache gegenüber unverletzten Muskeln erhöht.

#### ***Die MSC-Gruppe weist nach acht Wochen eine signifikant erhöhte Regeneratzelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf; der höchste Regeneratzellanteil zeigt sich jedoch an Tag 28 in der Kontroll-gruppe***

Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss MSC auf die Anzahl an Regeneratzellen haben, wurden die verletzten Muskeln der Kontroll- und MSC-Gruppe in Hinsicht auf die Regeneratzelldichte und den Re-generatzellanteil miteinander verglichen (Abb. 29, Bild A und B). Sieben Tage nach Trauma konnte man in der Kontrollgruppe 83±7 Zellen/mm<sup>2</sup> beobachten, in der MSC-Gruppe waren es 75±10 Zellen/mm<sup>2</sup> (p = 0,484). Bei Betrachtung des Regeneratzellanteils zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen bei-den Gruppen (Kontrollgruppe 24,6±2,2 %; MSC-Gruppe 23,5±3,4 %; p = 0,792; Abb. 29, Bild B). An Tag 28 zeigte sich in beiden Gruppen eine erhöhte Regeneratzelldichte gegenüber Tag 7, wobei sich zwischen den Gruppen kein Unterschied zeigte (Alg. 94±6 Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.+MSC 96±13 Zellen/mm<sup>2</sup>; p = 0,891). Relativ an der totalen Muskelzelldichte ausgedrückt, zeigte sich jedoch an Tag 28 in der Kontrollgruppe ein Regeneratzellanteil von 32,3±1,6 %, während der Anteil in der MSC-Gruppe trotz des absoluten Anstiegs der Regeneratzellen weitestgehend stabil blieb (24,4±2,8 %). Dieser Unterschied war mit p = 0,019 statis-tisch signifikant. Anschließend zeigte sich an Tag 56 ein starker Abfall der Regeneratzelldichte in der Kon-trollgruppe auf 67±6 Zellen/mm<sup>2</sup>. In der mit MSC behandelten Gruppe blieb die Dichte der Zellen mit bin-nenständigen Kernen mit 91±6 Zellen/mm<sup>2</sup> jedoch nach wie vor hoch, sodass sich zu diesem Beobach-tungszeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab (p = 0,007). Der Anteil der Regeneratzellen sank damit in der Kontrollgruppe schließlich wieder auf 24,6±2,3 %, während er in der mit MSC behandelten Gruppe auf 29,3±2,1 % anstieg. Im relativen Vergleich zeigte sich damit kein signifikanter Unterschied (p = 0,133).



**Abbildung 29: Regeneratzelldichte und Regeneratzellanteil in verletzten Mm. solei.** Die Abbildung zeigt die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> (Bild A) und den Anteil der Regeneratzellen in Prozent (Bild B) verletzter Muskeln der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE; n = 36 (6 Muskeln  $\times$  6 Schnitte); Ausnahme für Kontrollgruppe 28 Tage n = 34 Schnitte; t-Test für unabhängige Stichproben.

#### 5.2.4 Auswertung der Regeneratzelldichte und des Regeneratzellanteils – Betrachtung der drei Verletzungsregionen

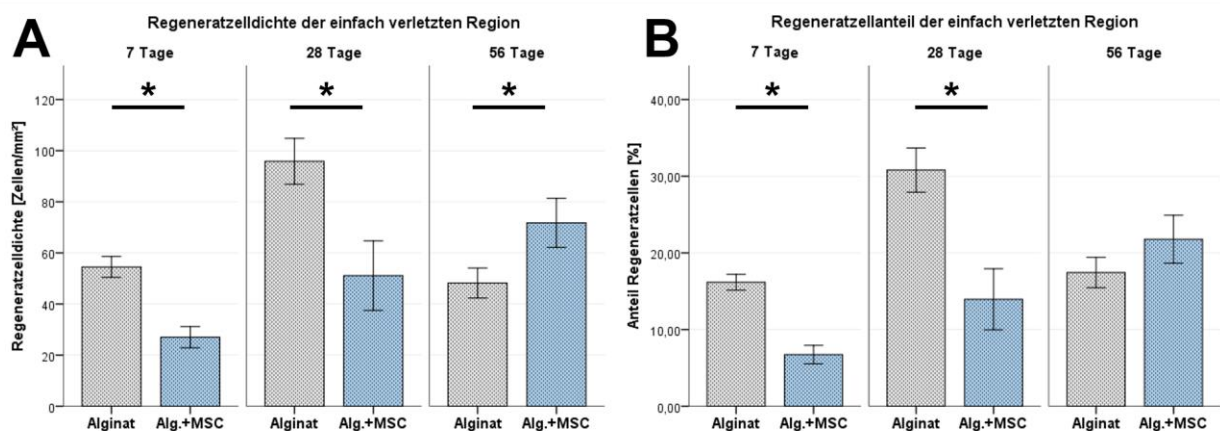
Analog zur Untersuchung der totalen Muskelzellichte in regenerierenden Muskeln erfolgte eine Analyse der Regeneratzellen pro Verletzungsregion. In den Abbildungen 30, 31 und 32 ist jeweils die Regeneratzelldichte und der Regeneratzellanteil der einfach, indirekt und zweifach verletzten Region im zeitlichen Verlauf für die Kontroll- und MSC-Gruppe dargestellt.



**Der Höchststand der Regeneratzelldichte der einfach verletzten Region zeigt sich an Tag 28 in der Kontrollgruppe, während sie in der MSC-Gruppe kontinuierlich ansteigt**

Abbildung 30 zeigt die Regeneratzelldichte (Bild A) und den Regeneratzellanteil (Bild B) der einfach verletzten Region beider Gruppen im Vergleich im zeitlichen Verlauf. An Tag 7 fiel ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- ( $55 \pm 4$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und MSC-Gruppe ( $27 \pm 4$  Zellen/mm<sup>2</sup>) auf ( $p < 0,001$ ). Auch an Tag 28 zeigte die MSC-Gruppe eine signifikant geringere Regeneratzelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Alg.  $96 \pm 9$  Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.+MSC  $51 \pm 14$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,016$ ). An Tag 56 wies die MSC-Gruppe hingegen eine signifikant höhere Muskelzellendichte auf (Alg.  $48 \pm 6$  Zellen/mm<sup>2</sup>; Alg.+MSC  $72 \pm 10$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,048$ ). Insgesamt ließ sich ein gradueller Anstieg der Regeneratzelldichte in der mit MSC behandelten Gruppe beobachten, während die Kontrollgruppe an Tag 28 eine im Vergleich zu Tag 7 und 56 höhere Zelldichte zeigte.

Der Regeneratzellanteil machte an Tag 7 in der einfach verletzten Region  $16,2 \pm 1,0$  % in der Kontrollgruppe und  $6,7 \pm 1,2$  % in der MSC-Gruppe aus (Abb. 30, Bild B). Dieser Unterschied stellte sich als statistisch signifikant heraus ( $p < 0,001$ ). An Tag 28 war der Anteil der Regeneratzellen auf  $30,8 \pm 2,9$  % in der Kontrollgruppe und auf  $14,0 \pm 4,0$  % in der MSC-Gruppe angestiegen. Auch hier zeigte sich ein statistisch bedeutsamer Unterschied ( $p = 0,004$ ). An Tag 56 war der Anteil in der Kontrollgruppe wieder auf  $17,5 \pm 2,0$  % gesunken, während er in der MSC-Gruppe auf  $21,8 \pm 3,1$  % angestiegen war ( $p = 0,254$ ).

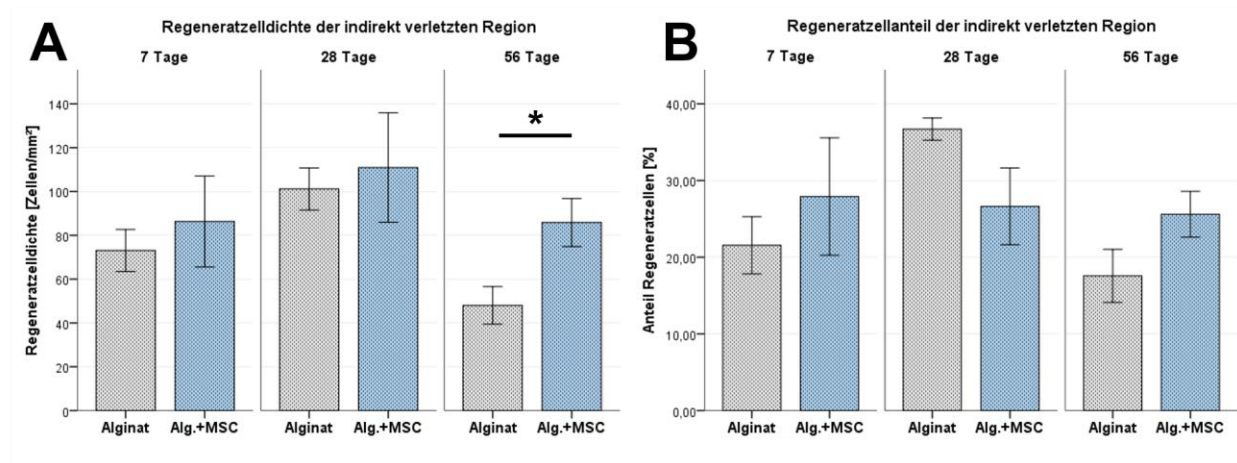


**Abbildung 30: Regeneratzelldichte und Anteil der Regeneratzellen der einfach verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> (Bild A) und den Anteil der Regeneratzellen in Prozent (Bild B) der einfach verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 12$  (6 Muskeln  $\times$  2 Schnitte); Ausnahme für Kontrollgruppe 28 Tage  $n = 10$  Schnitte; t-Test für unabhängige Stichproben.

**Die indirekt verletzte Region der Kontrollgruppe zeigt einen der einfach verletzten Region ähnlichen Verlauf, während in der MSC-Gruppe deutlich mehr Regeneratzellen im Vergleich zur einfach verletzten Region zu beobachten sind**

Die Regeneratzelldichte der indirekt verletzten Region der Kontrollgruppe zeigte einen der benachbarten einfach verletzten Region ähnlichen Verlauf (Ab. 31, Bild A). Von Tag 7 auf 28 kam es in dieser Region zu einem Anstieg von  $73 \pm 10$  Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $101 \pm 10$  Zellen/mm<sup>2</sup>. An Tag 56 war die Anzahl der Regeneratzellen wieder auf  $48 \pm 9$  Zellen/mm<sup>2</sup> abgefallen. In der indirekt verletzten Region der MSC-Gruppe konnte man an Tag 7 ( $86 \pm 21$  Zellen/mm<sup>2</sup>) gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied feststellen ( $p = 0,569$ ). An Tag 28 zeigte die MSC-Gruppe eine Regeneratzelldichte von  $111 \pm 25$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich ebenfalls kein Unterschied beobachten ( $p = 0,718$ ). Zum Beobachtungszeitpunkt 56 Tage konnte man in beiden Gruppen wiederum eine deutliche Reduktion der Regeneratzelldichte feststellen. Die mit MSC behandelte Gruppe wies jedoch eine deutlich höhere Zelldichte von  $86 \pm 11$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $48 \pm 9$  Zellen/mm<sup>2</sup> auf ( $p = 0,013$ ).

Der Regeneratzellanteil der indirekt verletzten Region war an Tag 7 in beiden Gruppen höher als in der benachbarten einfach verletzten Region. Zwischen Kontroll- und MSC-Gruppe zeigte sich jedoch kein Unterschied (Kontrollgruppe  $21,6 \pm 3,7$  %, MSC-Gruppe  $27,9 \pm 7,7$  %;  $p = 0,463$ ; Abb. 31, Bild B). Bis Tag 28 stieg der Anteil der Regeneratzellen auf  $36,7 \pm 1,5$  % in der Kontrollgruppe und stagnierte in der MSC-Gruppe bei  $26,6 \pm 5,0$  % ( $p = 0,066$ ). Bis Tag 56 sank der Anteil wieder auf  $17,6 \pm 3,5$  % in der Kontrollgruppe, während er in der mit MSC behandelten Gruppe nur auf  $25,6 \pm 3,0$  % abfiel ( $p = 0,093$ ).

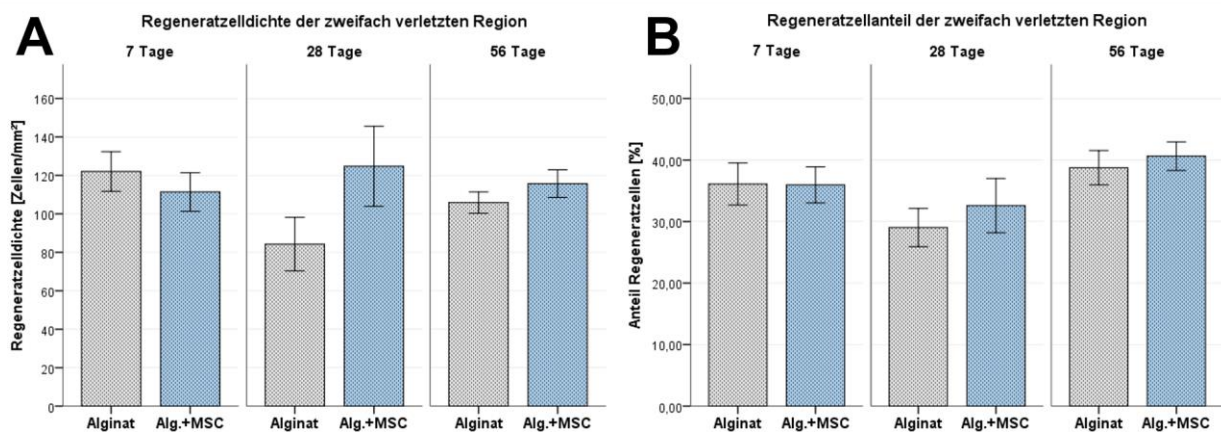


**Abbildung 31: Regeneratzelldichte und Anteil der Regeneratzellen der indirekt verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> (Bild A) und den Anteil der Regeneratzellen in Prozent (Bild B) der indirekt verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SE;  $n = 12$  (6 Muskeln  $\times$  2 Schnitte); t-Test für unabhängige Stichproben.

**In der zweifach verletzten Region zeigen sich mehr Regeneratzellen im Vergleich zur einfach und indirekt verletzten Region unabhängig von der Behandlung**

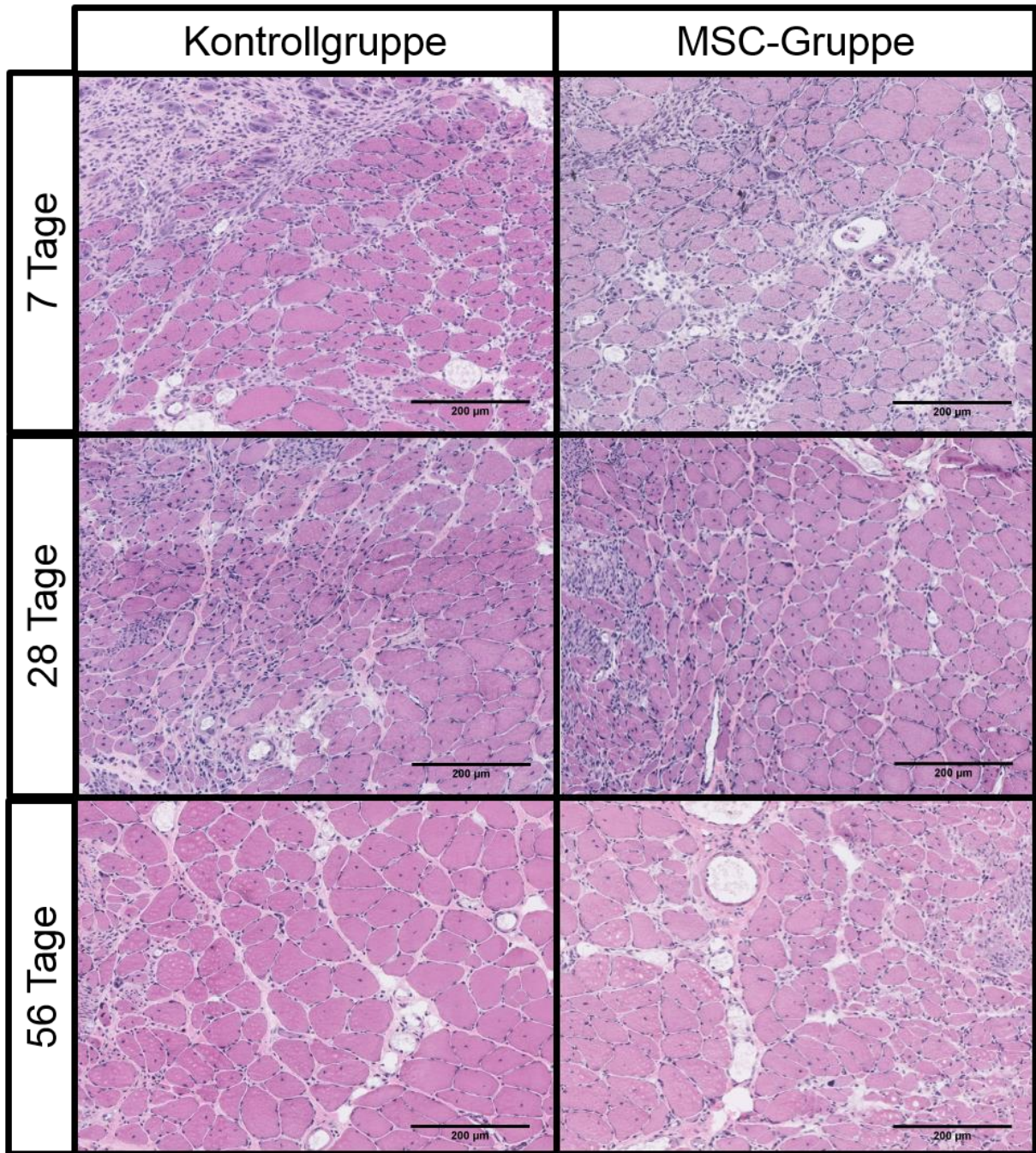
An den Tagen sieben und 56 konnte man in beiden Gruppen der zweifach verletzten Region deutlich mehr Regeneratzellen pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den jeweils benachbarten einfach und indirekt verletzten Regionen beobachten (Abb. 32, Bild A). An Tag 7 lag die Regeneratzelldichte der Kontrollgruppe bei 122±10 Zellen/mm<sup>2</sup> und in der MSC-Gruppe bei 111±10 Zellen/mm<sup>2</sup> (p = 0,468). Bis Tag 28 sank die Zelldichte in der Kontrollgruppe auf 84±14 Zellen/mm<sup>2</sup>. In der mit MSC behandelten Gruppe hingegen zeigte sich ein Anstieg auf 125±21 Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu Tag 7. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt war jedoch nicht statistisch signifikant (p = 0,120). Bis Tag 56 ergab sich in der MSC-Gruppe eine leichte Reduktion der Regeneratzelldichte auf 116±7 Zellen/mm<sup>2</sup>. In der Kontrollgruppe ließ sich wiederum ein Anstieg der Zelldichte auf 106±6 Zellen/mm<sup>2</sup> verzeichnen (p = 0,292).

Der Regeneratzellanteil der zweifach verletzten Region war an Tag 7 in beiden Gruppen etwa gleich hoch (Alg. 36,1±3,4 %; Alg.+MSC 36,0±2,9 %; p = 0,974; Abb. 32, Bild B). An Tag 28 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen MSC- und Kontrollgruppe (Alg. 29,0±3,1 %; MSC-Gruppe 32,6±4,4 %; p = 0,515). An Tag 56 lag in beiden Gruppen ein ähnlich hoher Regeneratzellanteil vor (Alg. 38,8±2,8 %; Alg.+MSC 40,6±2,3 %; p = 0,610).



**Abbildung 32: Regeneratzelldichte und Anteil der Regeneratzellen der zweifach verletzten Region.** Die Abbildung zeigt die Regeneratzelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> (Bild A) und den Anteil der Regeneratzellen in Prozent (Bild B) der zweifach verletzten Region der Kontroll- und MSC-Gruppe im Vergleich. Angaben als Mittelwert ± SE; n = 12 (6 Muskeln à 2 Schnitte); t-Test für unabhängige Stichproben.





**Abbildung 33: Repräsentative Bildausschnitte von verletzten Muskeln der Kontroll- und MSC-Gruppe pro Beobachtungszeitpunkt in der HE-Färbung.** Regeneratzellen fanden sich häufig gruppiert in der Umgebung von Bindegewebe. Zu allen Beobachtungszeitpunkten zeigten sich auch Areale mit reifen, unverletzten Zellen. Für beide Gruppen ließ sich ein großes Spektrum in Hinsicht auf die Zellgröße beobachten.

## 6 Diskussion

Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird durch die Auseinandersetzung mit dem Evaluationsprozess des computergestützten Segmentationsverfahrens (CSV) die Debatte über die Zuverlässigkeit solcher Verfahren aufgegriffen. Im Anschluss daran werden die mittels des CSV gewonnenen Erkenntnisse zur Muskelregeneration hinsichtlich des aktuellen Stands der Wissenschaft eingeordnet.

### 6.1 Diskussion der methodischen Ergebnisse

Trotz der Vielfalt verfügbarer Programme zur automatisierten Bildanalyse wird die Erfassung von Zellen in Muskelquerschnitten sowie die Differenzierung von Zellen mit binnenständigen Kernen in den meisten Studien zur Muskelregeneration noch immer manuell durchgeführt [97, 121]. Dies ist möglicherweise auf das heterogene Verletzungsmuster des Quetschtraumas zurückzuführen, dessen Komplexität durch bisherige Programme nicht erfasst werden kann. Um die Probleme während der computergestützten Auswertung zu überwinden, ist daher eine ausführliche Auseinandersetzung mit den histologischen Merkmalen des Quetschtraumas notwendig.

#### ***Zur Erhöhung der Präzision des CSV sollten fünf histologische Merkmale berücksichtigt werden***

Sowohl die 15 Bildausschnitte, als auch die drei kompletten Muskelquerschnitte wiesen eine Reihe von histomorphologischen Merkmalen auf, die technische Verfahren vor Herausforderungen stellen. Diese Schwierigkeiten wurden von Mula et al. auch als *common quantification obstacles* bezeichnet, welche die Autoren in zwei Kategorien unterteilten: 1) in morphologische Variationen, wie z. B. große Heterogenität der Zellgrößen und des Anteils an Fibrose sowie 2) in technische Artefakte wie Verarbeitungsfehler von Muskelbiopsien und geringe Färbequalität (*poor staining quality*) [122]. Die Auswahl der in dieser Arbeit berücksichtigten Merkmale erfolgte in Anlehnung an die von Mula et al. postulierte Einteilung. Dabei standen die Merkmale „unterschiedlich große Muskelzellen“, „verschiedene Zellformen“ und „schwer zu differenzierende Zellgrenzen“ stellvertretend für morphologische Variationen, während das Merkmal „Gefrierartefakte“ die Kategorie der technischen Artefakte repräsentierte. Während der Artefakt-bezogenen Auswertung ihres automatisierten Segmentationsverfahrens nahmen Mula et al. insbesondere Rücksicht auf histologische Schnitte mit geringer Färbequalität. Die Berücksichtigung dieses Aspekts war bei ihrer Arbeit insofern sinnvoll, da sie ihr Segmentationsverfahren an einer fehleranfälligen IHC Färbung etablierten [122]. In der hier vorliegenden Arbeit spielte die Färbequalität eine untergeordnete Rolle, da die verwendete HE-Färbung eine im Vergleich zur IHC einfach durchzuführende Standardmethode mit hoher Standardisierbarkeit ist. Nichtsdestotrotz traten Abweichungen in der Färbung zwischen den Proben auf, denen innerhalb des hier entwickelten Segmentationsprozesses eine, wenn auch im Vergleich zu Mula et al., etwas veränderte Bedeutung zukamen. So ließ sich etwa das Merkmal „Unterschiede in der Farbintensität“ in dieser Arbeit sowohl den technischen Artefakten im Sinne einer Färbeabweichung als auch den morphologischen Variationen zuordnen. Unter Letzterem versteht man das gleichzeitige Auftreten von blass-rosa gefärbten reifen sowie blau-violett gefärbten unreifen Muskelzellen in der HE-Färbung, was typisch für den regenerierenden Muskel ist [58]. Wie die Auswertung unserer Ergebnisse gezeigt hat, reicht das bloße

Erkennen der *quantification obstacles* jedoch nicht aus, um computergestützte Segmentationsverfahren erfolgreich anzuwenden, es bedarf auch einer strukturierten Auswertung.

### ***Trennung des Untrennbaren: touching cells***

Eine der größten Schwierigkeiten besteht nach Meinung von Liu et al. in der Trennung von eng beieinander liegenden Zellen, welche von den Autoren auch als *touching cells* bezeichnet werden [118]. In ihrer Studie entwickelten sie einen automatisierten Segmentationsalgorithmus für HE-gefärbte Muskelquerschnitte, wobei der Fokus auf der Ermittlung der Muskelquerschnittsfläche (*cross-sectional area*) lag [118]. Sie verglichen die Ergebnisse ihres Algorithmus zwar „nur“ mit denen eines einzelnen Untersuchers, führten ihre Analyse jedoch an insgesamt 30 Bildausschnitten durch. Die durchschnittliche Differenz zwischen automatisierten Verfahren und manueller Messung lag bei 2,05 %, was auf einen akkuraten Vorgang hindeutet. Anhand der 30 Beispielbilder zeigten die Autoren, dass eine Untersuchung von Bildausschnitten, in denen neben schwachen Zellgrenzen vor allem Gefrier- und Prozessartefakte die histologische Struktur dominieren, mit einem automatisierten Algorithmus robuste Ergebnisse bei der Bestimmung der Muskelquerschnittsfläche liefern kann. Leider ist in der quantitativen Analyse weder beschrieben, wie viele der 30 untersuchten Ausschnitte Artefakte aufwiesen, noch wie oft welches der jeweiligen Merkmale vertreten war. Aus der Studienbeschreibung von Liu et al. geht außerdem hervor, dass bestimmte Merkmale wie etwa „unterschiedlich große Muskelzellen“, „verschiedene Zellformen“ und „Unterschiede in der Farbintensität“, anders als in der vorliegenden Arbeit, von den Autoren nicht berücksichtigt wurden. In unserer quantitativen Auswertung fand sich beispielsweise die größte Abweichung zwischen Untersuchern und CSV sowohl in einem Bildausschnitt mit „Gefrierartefakten“ (Nr. 2) als auch bei einem Ausschnitt mit „verschiedene Zellformen“ (Nr. 8). Eine große Heterogenität bei Muskelzellen ist ein typisches histologisches Merkmal von traumatisierter Muskulatur [122]. Im Rahmen unserer Studie war es daher notwendig, den Einfluss dieses Merkmals auf das CSV genauer zu untersuchen. Der Algorithmus von Liu et al. wurde hingegen nur auf humane Muskelbiopsien von gesunden Individuen angewendet, welche keinerlei pathologische Auffälligkeiten zeigten. Ihr Fokus lag neben schwachen Zellgrenzen hauptsächlich auf der Untersuchung von Gefrier- und Prozessartefakten, welche auf fehlerhafte Handhabung zurückgehen und daher grundsätzlich vermeidbar sind. Neben der fehlenden Merkmals-bezogenen Auswertung ist angesichts dessen der Mehrwert eines solchen Algorithmus für die Auswertung von Quetschtraumata vernachlässigbar.

### ***Kryokonservierung und komplette Muskelquerschnitte: unvereinbare Gegensätze?***

Anders verhielt es sich mit der merkmals-bezogenen Annäherung in einer Studie von Kim et al. [117]. Auch hier hatten die Autoren ein vollautomatisches Segmentationsverfahren für Muskelschnitte in der HE-Färbung entwickelt, mit dem sie die Muskelquerschnittsfläche, den minimalen Feret-Durchmesser und den Zellumfang jeder Muskelzelle bestimmen konnten [117]. Die Klassifikationsrate ihrer computergestützten Methode war, verglichen mit den ermittelten Werten durch zwei Neuropathologen, mit 98 % sehr hoch. Im Gegensatz zu Liu et al. entstammten die humanen Biopsien sowohl gesunden als auch pathologisch auffälligen Muskeln. Der Beschreibung nach konnte für folgende Merkmale eine Übereinstimmung zwischen den von Kim et al. ausgewählten Bereichen und den in dieser Arbeit verwendeten Ausschnitten festgestellt werden: „verschiedene Zellformen“, „unterschiedlich große Muskelzellen“ sowie „schwer zu

differenzierende Zellgrenzen“. Leider wurde auch in der Arbeit von Kim et al. nicht genau beschrieben, wie viele der 30 untersuchten Ausschnitte tatsächlich pathologische Charakteristika aufwiesen, deren Analyse zweifellos schwieriger ist, als die von gesunden Muskeln. Außerdem suchten die Autoren für ihre Analyse gezielt artefakt-freie Bereiche aus. Gefrierartefakte stellen eine der häufigsten histologischen Strukturabweichungen dar, die Schwierigkeiten bei der computergestützten Segmentation bereiten. Diese sind auf die Formation von Eiskristallen im Zytoplasma zurückzuführen, deren Entstehung z. B. durch langsames Einfrieren während der Kryokonservierung oder durch die unbeabsichtigte Unterbrechung der Kühlkette mit anschließend erneutem Einfrieren begünstigt wird [123]. Wie zuvor erwähnt, hatte die Erfassung der totalen Muskelzellendichte in Probe Nr. 2 einen großen Unterschied zwischen CSV und Untersuchern ergeben. Die Probe wies überwiegend Muskelzellen auf, in denen Eiskristalle zu charakteristischen „Löchern“ im Zytoplasma geführt hatten. Da auch die Größe einer Muskelprobe Einfluss auf die Entstehung von Gefrierartefakten hat [124], empfehlen daher einige Autoren eine maximale Länge von 1,5 cm zur Kryokonservierung [123]. Andere Autoren experimentierten mit Proben einer Größe von bis zu 2 cm und erhielten dennoch akzeptable Ergebnisse [125]. Die Mm. solei unserer Studie kamen in ihrer längsten Ausdehnung auf 1,7 bis 2,1 cm, womit wohl die maximale Größe ausgereizt ist. Da unser Ziel war, komplette Muskelquerschnitte des M. soleus von Ratten zu untersuchen, war es sinnvoll, den Einfluss von Prozessartefakten auf das CSV bei der Evaluation zu berücksichtigen. Während der Auswertung von Probe Nr. 2 war zunächst angenommen worden, dass es durch die Gefrierartefakte zu einer irregulären Zerlegung der Zellen durch das CSV kommen würde, weshalb eine höhere Anzahl an ermittelten Zellen erwartet worden war. Es zeigte sich jedoch, dass das CSV im Vergleich zum manuellen Verfahren 46 Zellen nicht erfasst hatte. Während Untersucher 1 insgesamt 302 Zellen gezählt hatte, markierte Untersucher 2 sogar 349 Zellen. Die Differenz zwischen beiden Untersuchern konnte in einem Vergleich der von den Untersuchern gesetzten Markierungen für die Muskelzellen im jeweiligen histologischen Bildausschnitt bestätigt werden. Im Vergleich zu den Bildausschnitten Nr. 1 und 3 bereiteten demnach die Gefrierartefakte in Bildausschnitt Nr. 2 sowohl dem manuellen als auch dem computergestützten Verfahren Probleme, die einzelnen Muskelzellen korrekt voneinander abzugrenzen. Unabhängig vom Verfahren ist also auf die geeignete Größe der Muskelproben und die angemessene Handhabung zu achten, um das Auftreten von Gefrierartefakten möglichst gering zu halten.

### ***Charakteristika traumatisierter Muskulatur***

In Hinsicht auf den experimentellen Teil der hier vorliegenden Arbeit musste während der Entwicklung und Validierung des computergestützten Segmentationsverfahrens auch auf die Charakteristika traumatisierter Muskulatur eingegangen werden. Einzig die Studie von Mula et al. verwendete Biopsien, deren Erscheinungsform denen gequetschter Skelettmuskeln am nächsten kommen [122]. In ihrer Studie entfernten die Autoren in einem Mausmodell einen Teil der Wadenmuskulatur, um im benachbarten Plantaris eine mechanische Überlastung hervorzurufen. Die daraufhin veränderte Muskelmorphologie zeigte eine herabgesetzte Gewebeorganisation, zelluläre Infiltrationen, eine Vermehrung nicht-kontraktiles Gewebes, Heterogenität der Zellgröße durch Zellhypertrophie, eine gesteigerte Muskelregeneration und *fiber splitting*. Dieses Phänomen beschreibt die noch unvollständige laterale Fusion von regenerierenden Myotuben. Da es sich nicht um einen spaltenden Vorgang handelt, wird vorzugsweise die Bezeichnung *forked fibers*

verwendet [29]. Anders als Kim et al. untersuchten Mula et al. auch den Einfluss von Gefrierartefakten und Qualitätsunterschieden bei der Färbung auf die Zuverlässigkeit des automatisierten Verfahrens. Ihr Algorithmus war so präzise, dass lediglich Abweichungen von bis zu 4 % bei der Erfassung der Muskelquerschnittsfläche zwischen dem Algorithmus und der manuellen Registrierung evident wurden. Bei der Anwendung des hier entwickelten CSV auf komplette Muskelquerschnitte konnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. In unseren Schnitten dominierten dabei mehrere Merkmale das histologische Bild. Lediglich bei Bild Nr. 3, welches überwiegend vom Merkmal „verschiedene Zellformen“ und von einer großen Varianz bei den Zellgrößen geprägt war, bestand ein Unterschied von 12 Zellen/mm<sup>2</sup>. Bei Hochrechnung auf den gesamten Schnitt bestand somit ein Unterschied von 113 Zellen (ca. 4 %). Verglichen mit Mula et al., ist für das von uns entwickelte CSV lediglich die Berücksichtigung der Merkmale Heterogenität der Zellgröße, *forked fibers* und eine gesteigerte Muskelregeneration (repräsentiert durch Zellen mit binnenständigen Kernen) relevant. Die zellulären Infiltrationen sowie die Fibrose wurden im Rahmen der Programmierung unseres Segmentationsalgorithmus durch Ausschluss dieser irrelevanten Bereiche nicht in die Berechnung einbezogen. Dies hatte den Vorteil, dass das zur berechnende Datenvolumen reduziert und die Verarbeitungsgeschwindigkeit dadurch erhöht werden konnte.

#### ***Momentan kein standardisiertes Vorgehen bei der Bewertung von CSV***

Wie ein Blick in die aktuelle Literatur zeigt, gibt es kein standardisiertes Vorgehen bei der Evaluation von computergestützten Segmentationsverfahren. Dazu kommt, dass von den meisten Autoren nur ausgewählte Bildausschnitte analysiert werden, was zum Ausschluss verletzungsbedingter Merkmale führt. Dadurch, dass den hier identifizierten Studien keine vergleichbaren Kriterien während der Validierung ihrer Algorithmen zugrunde gelegt wurden, ist es schwer zu sagen, ob die einzelnen Merkmale die Segmentation von Muskelquerschnitten unterschiedlich beeinflussen. Während der Merkmals-bezogenen Auswertung des von uns entwickelten computergestützten Segmentationsverfahrens konnten jedenfalls keine Unterschiede festgestellt werden, da geringe Abweichungen zwischen CSV und manuellem Verfahren in fast allen Bildausschnitten gleichermaßen auftraten. Somit musste bei der Auswertung des experimentellen Teils der Arbeit nicht darauf Rücksicht genommen werden. Es bestehen jedoch weiterhin Schwierigkeiten, die im Folgenden erläutert werden sollen.

#### ***Regenerierende Muskelzellen bereiten manuellen und computergestützten Verfahren gleichermaßen Schwierigkeiten***

Nach Berücksichtigung der quantitativen und qualitativen Auswertung ist das Auftreten von vielen kleinen Muskelzellen sowohl für das manuelle als auch das computergestützte Verfahren problematisch. Bei diesen Zellen handelt es sich meist um neu entstehende Muskelzellen, die im Begriff sind, zu fusionieren [29, 55]. Da sie durch eine kaum wahrnehmbare Zellmembran und Basallamina voneinander getrennt sind, werden sie häufig als eine Einheit wahrgenommen [120]. Da man im Augenblick der Betrachtung nicht weiß, wie viele der Zellen ober- oder unterhalb der Schnittebene bereits fusioniert sind, wurde in dieser Arbeit der Ansatz verfolgt, alle Zellen individuell zu erfassen. In Bildausschnitt Nr. 8 zeigte sich zwischen CSV und manuellem Verfahren eine Differenz von 48 Zellen bei Erfassung der totalen Muskelzellendichte. Bei nachträglicher Betrachtung der Ergebnismaske zeigte sich, dass das CSV viele besonders



kleine Zellen nicht erfasst sowie einige Zellen nicht korrekt getrennt hatte. Im Log des Algorithmus ließ sich nachvollziehen, dass von einer Zellgröße von 100-8000  $\mu\text{m}^2$  ausgegangen worden war. Bei der nachträglichen Bestimmung der Zellfläche der vom CSV nicht erfassten Zellen zeigte sich, dass diese Zellen jedoch kleiner als 100  $\mu\text{m}^2$  waren. Um zu vermeiden, dass Zellen vom CSV nicht erkannt werden, gibt es an mehreren Stellen des Programmablaufs die Möglichkeit der manuellen Editierung. Bei Initialisierung des Algorithmus wird beispielsweise mit Hilfe einer Abfragemaske nach der zu erwartenden minimalen und maximalen Zellgröße gefragt (Abb. 9, Bild A). Die Auswertung der methodischen Ergebnisse hat gezeigt, dass die Mindestgröße einer zusammenhängenden Zellfläche etwa 80  $\mu\text{m}^2$  betragen sollte, um besonders kleine Zellen wie in Bildausschnitt Nr. 8 (Abb. 13) erfolgreich zu erfassen. Das *touching cell*-Phänomen taucht aber auch bei reifen Muskelzellen auf [118], was zu einer unvollständigen Trennung der Zellen und damit zu einer geringeren absoluten Anzahl an Zellen führen kann. Die fälschlich verbundenen Zellen können im zweiten Teil des Programmablaufs manuell getrennt werden, wobei der Untersucher durch eine Farbkodierung bei der Identifikation ungewöhnlich großer Zellflächen unterstützt wird (Abb. 10, Bild B).

### ***Beobachtersubjektivität lässt sich durch automatisierte Verfahren verringern***

Bedingt durch die Heterogenität der histologischen Schnitte ermöglicht die Interaktion zwischen Algorithmus und Untersucher auf der einen Seite eine Annäherung an die tatsächliche Anzahl der Muskelzellen, auf der anderen Seite bedeutet sie eine Entschleunigung des gesamten Bildanalyseprozesses. Aus der User-Algorithmus-Interaktion ergibt sich außerdem, dass vor Anwendung des semiautomatischen Segmentationsverfahrens ein Training erforderlich ist. Von den hier besprochenen Publikationen wird genau dieser Punkt durch die Entwicklung eines vollautomatischen Programms komplett eliminiert. Die vollautomatischen Algorithmen, worunter einige sogar für die Standard-HE-Färbung konzipiert sind, führen ihre Analyse innerhalb von Sekunden aus [117, 118]. Allerdings sind diese Algorithmen bisher auf die Erfassung der Muskelquerschnittsfläche mit Angabe der Muskelzellanzahl, des Zellumfangs und des minimalen Feret-Durchmessers beschränkt. Die Differenzierung von Zellen mit binnenständigen Kernen ist mit den oben beschriebenen Algorithmen nicht möglich. Wie auch unsere Ergebnisse zeigten, stellt dieser Parameter computergestützte Segmentationsverfahren weiterhin vor große Herausforderungen. In unserer Auswertung lagen bei 6 von 15 Bildausschnitten erkennbare Unterschiede zwischen dem manuellen und computergestützten Verfahren vor. Zu den größten Abweichungen kam es in Bildausschnitt Nr. 2 (Gefrierartefakte) und Nr. 5 (unterschiedlich große Muskelzellen), wie auch in Nr. 13 (schwer zu differenzierende Zellgrenzen) mit jeweils über 20 Zellen Unterschied (20-28 Zellen). Auch hier ließen sich die Differenzen zwischen manuellem und computergestütztem Verfahren keinem spezifischen Merkmal zuschreiben, da Abweichungen in allen Gruppen präsent waren. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Untersucher zeigte sich, dass bei fünf der sechs Bildausschnitte ebenfalls zwischen beiden Untersuchern starke Unterschiede von 13-20 Zellen bestanden. Außerdem waren von dieser Beobachtung hauptsächlich Bildausschnitte betroffen, in denen viele Regeneratzellen zu beobachten waren ( $> 80$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ). Diese Feststellungen sind Hinweise dafür, dass sich die Beobachtersubjektivität trotz vorgegebener Definition der Regeneratzellen nicht eliminieren ließ, was wiederum dem computergestützten Verfahren den Vorzug gibt.

### **Alternativen zur HE-Färbung in verletzter Muskulatur**

Es gibt mittlerweile Verfahren, die Zellen mit binnenständigen Kernen automatisch erfassen können, welche auf IHC Färbungen basieren [119, 122, 126]. Dabei werden Antikörper wie Anti-Dystrophin oder Anti-Laminin verwendet, die Proteine auf dem Sarkolemm oder der Basallamina lokalisieren [122]. Die an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe heben auf diese Weise die Zellgrenzen hervor, wobei der starke Kontrast zwischen angefärbten und ungefärbten Strukturen eine optimale Grundlage für die Segmentation bildet. Allerdings sind IHC Färbungen im Vergleich zur HE-Färbung fehleranfälliger, zeitaufwendiger und kostenintensiver. In Anbetracht der Menge an Schnitten, die im experimentellen Teil untersucht werden sollte, kam diese Färbemethode daher nicht in Frage. Alternativ greifen einige Autoren auf eine Immunfluoreszenz mit *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) zurück [122]. Pena et al. hatten in ihrer Studie an humanem Skelettmuskel zeigen können, dass verschiedene Lektine, darunter WGA, eine klare Lokalisierung der Basalmembran erlauben [127]. Indes hat die Arbeit von Gulati et al. gezeigt, dass WGA auch intrazellulär in regenerierenden Muskelzellen nach Muskeltrauma bindet [128]. Die Arbeit von Kostrominva bestätigte, dass im Falle von geschädigten Muskelzellen die Laminin-Färbung eine bessere Visualisierung der Zellgrenzen im Vergleich zur WGA-Färbung erlaubte [129]. Da in dieser Arbeit das Regenerationspotenzial von Muskelzellen nach einem Quetschtrauma untersucht werden sollte, musste auch der WGA-basierte Färbeansatz verworfen werden.

### **Einschränkungen des Parameters „Zellen mit binnenständigen Kernen“**

Der hier entwickelte Algorithmus ist das erste bekannte Verfahren, welches Regeneratzellen in einer HE-Färbung differenzieren kann. Nur Muskelzellen, deren binnenständige Kerne eindeutig von Zytoplasma umgeben waren, wurden vom computergestützten Verfahren isoliert. Anschließend erfolgte die Verrechnung mit der Maske, in der alle Zellen erfasst worden waren, um die Anzahl aller Zellen mit binnenständigen Kernen zu erhalten. Es ist allgemein anerkannt, dass regenerierende Muskelzellen an den im Zytoplasma liegenden Zellkernen identifizierbar sind [130, 131] und daher für eine Aussage zum Regenerationsstadium der Muskulatur herangezogen werden können [29, 119]. Eine Einschränkung dieses Markers wird dabei jedoch häufig übersehen, welche ihren Ursprung in der Muskelentwicklung selbst hat. Nach der Fusion eines Myoblasten wandert dessen Kern sofort in das Zentrum der Myotube [55]. Gemäß der Studie von Wada et al. zur Position von Muskelzellkernen während der Regeneration reihen sich alle Zellkerne im Zentrum der Myotube auf wie bei einer Perlenkette [131]. Mit dem Wachstum der neuen Muskelzelle verteilen sich die Kerne gleichmäßig auf die gesamte longitudinale Achse, bevor sie schließlich in die Peripherie unter die Plasmamembran wandern [55, 132]. Es ist also bedingt durch die Betrachtung eines lediglich zweidimensionalen Bildes möglich, dass quer angeschnittene Muskelzellen, deren Zellkerne weiter ober- oder unterhalb der Schnittebene binnenständig stehen, vom CSV nicht als Regeneratzellen identifiziert werden. Um dieses Problem zu umgehen, könnte man zur Identifikation von regenerierenden Muskelzellen statt binnenständiger Kerne embryonales Myosin als Marker verwenden [133], da das entsprechende Motorprotein auf der gesamten Länge der Muskelzelle exprimiert wird. Ciciliot et al. zufolge wird embryonales Myosin 2-3 Tage nach Bupivacain-induziertem Trauma in kleinen Myotuben nachweisbar [29]. Ob die Expression der Marker jedoch ausreicht, um ein intensives Signal zu erzeugen, das den Detektionsmechanismen eines automatischen Segmentationsverfahrens Genüge tut, muss noch untersucht



werden. Außerdem wird embryonales Myosin nach etwa zwei Wochen sukzessive durch adultes Myosin ersetzt, sodass Langzeitstudien über diesen Zeitraum hinaus nicht möglich sind [29].

### ***Fazit computergestützte Segmentationsverfahren***

Die HE-Färbung ist eine einfache, günstige und zeitsparende Färbung [122]. Man kann jedoch nicht abstreiten, dass ein Teil der Zeit, die durch die zügige Durchführung der Färbung gewonnen wurde, für die oben beschriebene User-Algorithmus-Interaktion verbraucht wurde. Die intensive Interaktion ist dabei vor allem auf die charakteristischen Eigenschaften des Muskels selbst zurückzuführen, auf die während der Programmierung und Validierung des CSV im Gegensatz zu anderen Publikationen besonders eingegangen worden ist.

Trotz der Interaktion hat sich eine deutliche Zeitersparnis insbesondere während der Analyse kompletter Muskelquerschnitte bemerkbar gemacht. Unter Anwendung des CSV verkürzte sich die Bearbeitungszeit von rund 59 min auf 12 min pro Muskelquerschnitt. Das Automatisieren führt nicht nur zur Beschleunigung des Prozesses [122], sondern erhöht auch die Vergleichbarkeit der histologischen Parameter zukünftiger Arbeiten [119, 130, 134]. Weiterhin spricht die Feststellung von starken Unterschieden innerhalb des manuellen Verfahrens für eine Verwendung des automatisierten Segmentationsverfahrens, da es eine Annäherung an die tatsächlich im Muskel vorkommenden Zellen und deren Differenzierung erlaubt. Zusammenfassend hat die Validierung der 15 Bildausschnitte und der drei kompletten Muskelquerschnitte ergeben, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen dem manuellen und dem halbautomatischen computergestützten Verfahren bestehen.

## 6.2 Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Wie eingangs erwähnt, haben funktionelle Studien einen kraftsteigernden Einfluss der MSC auf die Muskelregeneration gezeigt, wobei der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effekts bisher noch nicht geklärt ist [135]. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von mesenchymalen Stammzellen auf die totale Anzahl aller Muskelzellen und die Differenzierung der Regeneratzellen zu erfassen, um weitere Hinweise auf die Regeneration in Skelettmuskeln zu erhalten.

### ***MSC verlangsamen einen graduellen Zellverlust in verletzten Muskeln im zeitlichen Verlauf***

Bereits vor mehreren Jahrzehnten wurde mit detaillierten Untersuchungen zur Heilungsdynamik traumatisierter Skelettmuskulatur begonnen. Schmalbruch hatte beispielsweise 1976 in seiner Arbeit zur Muskelregeneration von gequetschten Skelettmuskeln eine erhöhte Anzahl an Muskelzellen nach Trauma beobachten können [91]. Dabei war in drei von sechs Muskeln die Anzahl der Muskelzellen leicht erhöht, wobei sich in einem der Muskeln sogar eine Erhöhung von bis zu 70 % im Vergleich zur kontralateralen, unverletzten Seite gezeigt hatte. In unserer Arbeit konnte man sieben Tage nach Trauma sowohl in der Alginat- als auch in der MSC-Gruppe einen signifikanten Anstieg der totalen Muskelzellendichte (24,0 % Alginat-Gruppe, 18,5 % MSC-Gruppe) gegenüber unverletzten Muskeln beobachten. Die von Schmalbruch beschriebene numerische Hyperplasie 30 Tage nach Trauma konnte in dieser Arbeit in beiden Versuchsgruppen auch zu späteren Zeitpunkten festgestellt werden. Allerdings betrug der Anstieg an Tag 28 verglichen mit Schmalbruchs Beobachtung weder in der Kontroll- noch in der MSC-Gruppe mehr als 53,0 %, was möglicherweise auf das nicht standardisierte Quetschtrauma Schmalbruchs zurückzuführen ist [91].

Der Anstieg der Zelldichte verletzter Muskeln an Tag sieben ist dabei eher als Reaktion auf das Trauma zu werten, da dieser in beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt gleichermaßen zu beobachten war. Im weiteren Verlauf jedoch zeigte sich zum Zeitpunkt 28 Tage ein signifikanter Unterschied der totalen Muskelzellendichte zwischen MSC- und Alginat-Gruppe in verletzten Muskeln. In der Alginat-Gruppe hatte die Muskelzellendichte stark abgenommen, während sie in der MSC-Gruppe sogar leicht zugenommen hatte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Effekt der MSC in Form des Erhalts bzw. des Anstiegs der totalen Muskelzellendichte in verletzten Muskeln ableiten, der zwischen Woche eins und vier nach Trauma und MSC-Transplantation evident wurde.

Diese Beobachtung korreliert mit funktionellen Ergebnissen einer in vivo Studie von Pumberger et al., wonach auch erst im weiteren Verlauf an Tag 28 ein signifikanter Unterschied in der Fast-twitch Muskelkraft zwischen Kontroll- und MSC-Gruppe festgestellt werden konnte [110]. Den Autoren Andrade et al. zufolge kommt es womöglich sogar schon früher zu einem bedeutsamen Effekt, da ihre Studienergebnisse bereits an Tag 14 eine größere maximale isometrische Kontraktionskraft der mit BMMSC behandelten Gruppe zeigten [97]. Die Ergebnisse eines in vitro Experiments, welches den anti-apoptischen Nutzen der MSC untersuchte, bestärken zudem die Vermutung eines Erhaltungseffekt der MSC. Demnach konnte in einem Serum-Deprivations-Modell gezeigt werden, dass das Überleben von C2C12-Myoblasten mit der Behandlung von konditioniertem Medium von MSC im Vergleich zu Zellen in Behandlung mit normalem Medium signifikant verbessert wurde [110].

Der reaktiven Muskelzellvermehrung nach Trauma zum Trotz kam es über den zeitlichen Verlauf zu einer Abnahme der Zelldichte in beiden Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Alginat- und MSC-Gruppe bestand aber auch an Tag 56, wobei der Unterschied zwischen beiden Gruppen kleiner wurde. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise auf die Überlebensdauer der MSC in ihrer künstlichen Nische zurückführen. Denn Ergebnisse weiterer in vitro Experimente mit MSC beladenen Alginatgelen zeigten, dass über 90 % der Zellen nach sieben Tagen in ihrer künstlichen Nische noch immer vital waren [110]. Mit zunehmender Zeit nahm die Zellviabilität zwar ab, sie lag nach 14 Tagen aber immer noch bei über 60 % [110]. Spätere Daten liegen leider nicht vor. Es ist aber davon auszugehen, dass mit abnehmender Viabilität der MSC auch die parakrine Sekretion der Wachstumsfaktoren abnimmt, was den kleiner werdenden Unterschied in der Zelldichte zwischen Alginat- und MSC-Gruppe erklären könnte.

### ***MSC verzögern die Differenzierung von Muskelzellen in verletzten Muskeln***

Wie unsere Ergebnisse zeigen, ging der Anstieg der totalen Muskelzelldichte in verletzten Muskeln zu Beginn auf eine Traumareaktion in Form einer gesteigerten Muskelzellproliferation zurück. Dafür spricht, dass sich bei genauer Betrachtung der histologischen Muskelquerschnitte sehr viele kleine, unreife Muskelzellen mit binnenständigen Kernen in verletzten Muskeln beobachten ließen (Abb. 33). Obwohl diese Beobachtung von vielen der nachfolgend besprochenen Publikationen geteilt wird, haben bisher nur wenige eine Quantifizierung dieser Zellen angestrebt. Eine Ausnahme bildet der bereits erwähnte Autor Schmalbruch, der einen Anteil von 10-30 % Regeneratzellen 30 Tage nach Quetschtrauma bestimmt hatte [91]. Tatsächlich zeigte sich für unsere Kontrollgruppe ein Regeneratzellanteil von ca. 33 % an Tag 28, womit sich unsere Beobachtung in etwa mit der Schmalbruchs deckt. Im Gegensatz zu Schmalbruch untersuchten wir jedoch mehrere Zeitpunkte nach Trauma, um eine Aussage zur Heilungsdynamik machen zu können.

Auch Natsu et al. interessierten sich für die Dynamik der Regeneratzellen in traumatisierten Skelettmuskeln von Ratten, weshalb sie mehrere Beobachtungszeitpunkte heranzogen [102]. Im Vergleich zu Schmalbruchs Arbeit behandelten die Autoren eine Gruppe mit BMMSC, wodurch sich Parallelen zu unserem Studiendesign ergaben. Analog zu unseren Ergebnissen beobachteten sie in lazerierten, mit Stammzellen behandelten Muskeln nach 28 Tagen Zellen mit binnenständigen Kernen. Auch nach 56 Tagen stellten sie noch einige wenige Regeneratzellen in BMMSC-Muskeln fest, während sie nach 84 Tagen keine Regeneratzellen mehr sahen. Im Vergleich dazu zeigten sich in Kontrollmuskeln, die nur ein Fibrin-Scaffold oder gar keine Therapie erhalten hatten, zu allen Beobachtungszeitpunkten durchweg Zellen mit binnenständigen Kernen. Aus diesen Beobachtungen leiteten Natsu et al. ab, dass BMMSC die Muskelregeneration beschleunigten.

Im Gegensatz dazu stellten sich in dieser Arbeit zu allen Zeitpunkten Zellen mit binnenständigen Kernen in der MSC-Gruppe dar. Zwischen Tag 7 und 28 stieg sowohl die totale Muskelzelldichte als auch die Regeneratzelldichte an. Der Anteil der Regeneratzellen veränderte sich also in der MSC-Gruppe innerhalb dieses Beobachtungszeitraums kaum. Im weiteren Verlauf blieb die Regeneratzelldichte in der MSC-Gruppe weitestgehend stabil. Da jedoch die totale Muskelzelldichte sank, zeigte sich folglich an Tag 56 ein höherer Regeneratanteil im Vergleich zu Tag 28, was den Ergebnissen von Natsu et al. nicht entspricht [102]. An dieser Stelle ist anzumerken, dass Natus Erkenntnisse zur Regeneratzelldynamik im Gegensatz zu dieser Arbeit auf einer rein qualitativen Beurteilung basierten. Natsu et al. verwendeten keine

quantifizierenden Methoden zur Bestimmung der Regeneratzellen. In dieser Arbeit hingegen wurde mit Hilfe eines computergestützten Segmentationsverfahren eine Regeneratzelldichte von etwa 90 Zellen/mm<sup>2</sup> an Tag 56 in der MSC-Gruppe ermittelt, während Natsu et al. zum selben Zeitpunkt von einigen wenigen Regeneratzellen sprechen [102].

Im Vergleich zu Natsu et al. bedienten sich Andrade et al. einer quantifizierenden Methode, indem sie den Anteil der Regeneratzellen pro 1000 gezählter Zellen bestimmten [97]. Im Einklang mit den Beobachtungen von Natsu et al. ergaben ihre Experimente, dass 28 Tage nach Trauma in den mit BMMSC behandelten Soleus-Muskeln verglichen mit der Kontrollgruppe weniger Regeneratzellen vorhanden waren. Sie unternahmen jedoch keinen Versuch, diesen Parameter zu einem früheren oder späteren Beobachtungszeitpunkt zu untersuchen, sodass ihnen keine Aussage zur Heilungsdynamik gelingt. Eine ähnliche Untersuchung von Helal et al. sah erstaunlicherweise eine erhöhte Anzahl von Regeneratzellen nach Injektion von MSC in einen lazerierten Muskel [114]. Informationen zur Heilungsdynamik sind aber auch hier nicht vorhanden, da es ebenfalls nur einen einzigen Beobachtungszeitpunkt fünf Wochen nach Trauma bzw. vier Wochen nach Transplantation gibt. Eine gänzlich andere Beobachtung machten Pecanha et al., als sie die Regeneratzellanzahl in lazerierten Muskeln quantifizierten [116]. Während sie zwei Wochen nach Trauma in mit aus Fettgewebe isolierten Stammzellen behandelten Muskeln eine signifikant erhöhte Anzahl an Regeneratzellen feststellen, sahen sie nach vier Wochen keinen Unterschied mehr zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Obwohl die Autoren der hier diskutierten Publikationen zum Teil widersprüchliche Beobachtungen machten, sind sie sich interessanterweise einig, dass die kraftsteigernde Wirkung der MSC auf eine früher abgeschlossene Regeneration mit mehr reifen Muskelzellen zurückzuführen sei.

Einzig Andrade et al. führten unterstützende Argumente für eine durch Stammzellen hervorgerufene Kraftsteigerung durch mehr reife Muskelzellen an [97]. Sie zeigten zusätzlich zur Reduktion des Regeneratzellanteils, dass insgesamt eine größere Muskelzellquerschnittsfläche für mit BMMSC behandelten Muskeln gemessen wurde [97]. Ninagawa et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die mit embryonalen MSC (E-MSC) behandelten Muskeln zwei Wochen nach Trauma eine höhere Muskelzellquerschnittsfläche als die nicht behandelten Muskeln aufwiesen [136]. Sie beobachteten sogar, dass der Großteil der mit E-MSC behandelten Muskelzellen drei Wochen nach Trauma intakt aussah. Dies steht jedoch im Kontrast zur bloßen Betrachtung der histologischen Schnitte dieser Arbeit, da Schnitte der MSC-Gruppe zum Zeitpunkt 56 Tage großflächig im Umbau befindliche Muskelzellen aufwiesen (Abb. 33).

Eine Veränderung der Muskelzellquerschnittsfläche wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Anhand der Ergebnisse kann man annehmen, dass es zu einer Zunahme vieler kleiner Zellen kommt, wofür die histologischen Bilder sprechen (Abb. 33). Da alle Zellen eines Querschnitts an der gesamten Muskelfläche unter Ausschluss des Bindegewebes normiert wurden, lässt sich momentan nur festhalten, dass die totale Muskelzelldichte unter Einfluss von MSC zunimmt sowie der Anteil der Regeneratzellen im zeitlichen Verlauf steigt. Obwohl sich das Studiendesign sowie die verwendeten Therapien der hier vorliegenden Arbeit und der oben diskutierten Publikationen ähneln, zeigten sich diskrepante Ergebnisse bei der Quantifizierung der Regeneratzellen. Dies ist wahrscheinlich auf zwei Sachverhalte zurückzuführen: erstens auf das Verletzungsmodell und zweitens auf die Methode der Quantifizierung.

In Hinblick auf Ersteres hängt die Wahl für das Verletzungsmodell stark mit den Fragen zusammen, denen während der Untersuchung von Muskelregeneration nachgegangen werden soll [112]. Ninagawa et al. benutzten ein Klemmenmodell, bei dem sie den Muskel ähnlich unserer Studie für eine Minute mit einer Zange mit gleichbleibendem Druck klemmten [136]. Während 24 Stunden nach Trauma im gesamten Querschnitt nur verletzte Muskelzellen auftraten, hatte sich ein Großteil der mit Stammzellen behandelten Muskelzellen drei Wochen nach Trauma wieder erholt. Eine komplette Heilung nach fünf Wochen sahen die Autoren aber auch in den Kontrollmuskeln. Unklar bleibt, ob die Autoren den gesamten Muskel mehrfach quetschten und welcher Druck dazu verwendet wurde. Unser Quetschtraumamodell ist als ein nicht heilendes Modell für klinisch relevante Verletzungen konzipiert worden, was man anhand der Studienergebnisse von Winkler et al. nachvollziehen kann. Dort zeigten unbehandelte Muskeln auch acht Wochen nach Trauma noch 25,4 % kollagenes Bindegewebe, welches als Hinweis auf eine unvollständige Regeneration gewertet werden kann [63]. Der Regenerationsverlauf bei Ninagawa et al. ist daher vermutlich auf die geringere Destruktion des Muskels in dem von ihnen verwendeten Traumamodell zurückzuführen [136].

Das zweite bereits angesprochene Thema ist die Methode der Quantifizierung und Differenzierung von Muskelzellen. Andrade et al. hatten die Muskelzellquerschnittsfläche von 500 Zellen pro Muskel ermittelt [97]. Mit dieser Anzahl werden lediglich ein Sechstel aller Muskelzellen in einem Soleus-Querschnitt repräsentiert, da unseren Beobachtungen zufolge in einem unverletzten Muskelbauch von 5-6 Monate alten Ratten allein schon bis zu 3000 Zellen vorkommen können. Weiterhin ist bei Andrade et al. nicht beschrieben, wie die Zellen für die Messung ausgewählt wurden. Bei einem Lazerationsmodell, wie es einige der oben genannten Publikationen verwendeten, ist jedoch aufgrund der Ähnlichkeit zum Quetschtrauma von einem heterogenen Verletzungsmuster auszugehen, bei dem verletzte und unverletzte Muskelzellen während des Regenerationsprozesses parallel auftreten können [63]. Wie bereits in Abschnitt 4.6 dargelegt, birgt jedoch die Beschränkung der Analyse auf Muskelausschnitte, wie bei den besprochenen Artikeln geschehen, das Risiko einer Stichprobenverzerrung. Im Gegensatz zu den oben genannten Publikationen sind in dieser Arbeit erstmals alle im Querschnitt befindlichen Muskelzellen in mehreren Ebenen des Soleus-Muskels mit einem computergestützten Segmentationsverfahren analysiert worden. Somit ist zum ersten Mal eine Aussage zur totalen Muskelzellendichte in mit MSC behandelten Muskeln möglich. Zusammenfassend ergab sich aus der Analyse der totalen Muskelzellendichte und des Regeneratzellanteils, dass MSC die totale Muskelzellendichte vier Wochen nach Trauma erhöhen, wobei sich der Anteil der Regeneratzellen erst im weiteren Verlauf erhöht. Dies spricht weniger für eine beschleunigte Regeneration, sondern eher für eine protektive Wirkung der MSC auf die Muskelzellen. Der schützende Effekt ist dabei vor allem durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose und eine Verhinderung einer verfrühten Differenzierung charakterisiert. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse aus in vitro Studien, wonach MSC die Proliferation, das Überleben und die Migration von C2C12-Myoblasten fördern sowie die Differenzierung in Myotuben unterbinden [110].

### **MSC beeinflussen die Zelldichte in unverletzten Muskeln über einen systemischen Effekt**

Momentan wird davon ausgegangen, dass MSC ihre Wirkung hauptsächlich über parakrines Signalling entfalten [103, 137, 138]. Parakrin bedeutet, dass die von den MSC sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren lokal auf ihre unmittelbare Umgebung wirken. Die signifikante Erhöhung der totalen Muskelzell-dichte in verletzten Muskeln der MSC-Gruppe vier Wochen nach Trauma lässt sich wahrscheinlich auf einen solchen lokalen Effekt zurückführen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darüber hinaus auf eine systemische Wirkung hin. Dafür spricht die Beobachtung, dass auch kontralaterale, unverletzte Muskeln der MSC-Gruppe nach 28 Tagen eine gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöhte totale Muskelzell-dichte aufwiesen. Auch an Tag 56 war die Muskelzell-dichte unverletzter Muskeln der MSC-Gruppe signifikant erhöht.

Ein Effekt der MSC in unverletzten Muskeln desselben Individuums ist unserer Kenntnis nach in bisher keiner anderen Studie systematisch beschrieben worden. Bekannt ist hingegen, dass intra-arteriell applizierte MSC durchaus einen kraftsteigernden Effekt in traumatisierten Muskeln hervorrufen können, wie von Roth et al. gezeigt hatten [137]. Da die markierten Stammzellen nicht in das Trauma-gebiet rekrutiert wurden, schlussfolgerten die Autoren, dass die Wirkung der systemisch applizierten MSC über sezernierte Faktoren vermittelt wird [137]. Übertragen auf unser Applikationsmodell mittels Alginategel werden die von den MSC lokal abgegebenen Faktoren möglicherweise über den Blutkreislauf auch in unverletzte Muskelkompartimente transportiert, wo sie eine ähnliche muskelzellsteigernde Wirkung entfalten.

Ein funktionelles Korrelat zum Anstieg der Muskelzell-dichte in unverletzten und unbehandelten Muskeln konnte in einer kürzlich publizierten Studie zur perioperativen PLX-Applikation im Rahmen der Implantation von Hüftendoprothesen beobachtet werden [121]. In dieser prospektiven, randomisierten humanen Phase I/IIa-Studie der Arbeitsgruppe um Winkler et al. kam es nach Injektion von mesenchymalen Stromazellen aus der Plazenta in den Gluteus medius auch zu einem Anstieg der Kontraktionskraft auf der kontralateralen, nicht-behandelten Seite. Eine Volumenzunahme konnte für die unbehandelte Seite allerdings nicht festgestellt werden. Winkler et al. merkten daher kritisch an, dass der Kraftzuwachs möglicherweise durch eine Verbesserung der neurophysiologischen Kontrolle zu erklären sei [121]. Hier würde im Sinne eines *cross-educational effect* die Verbesserung der Muskelkraft des therapierten Beins den unbeschädigten Muskel der Gegenseite positiv beeinflussen. Eine andere Vermutung ist, dass der gesunde Muskel durch das Trauma auf der anderen Seite schlicht stärker belastet wird und dieses Quasi-Training folglich einen Kraftzuwachs hervorruft. Diese Theorie wird jedoch durch unsere Ergebnisse nicht unterstützt, da es in den unverletzten Muskeln der Kontrollgruppe zu einem graduellen Zellverlust kam. Da die Versuchstiere kein spezielles Training erhalten hatten, ist auch der *cross-educational effect* als mögliche Erklärung eher unwahrscheinlich.

Momentan ist man sich einig, dass neue Muskelzellen aus der Fusion von Muskelprogenitorzellen hervorgehen [29]. Im Anschluss an die Fusionen präsentieren sich regenerierende Muskelzellen mit binnenständigen Kernen, wobei diese im weiteren Reifungsprozess in die Peripherie wandern [132]. Obwohl es einen Anstieg der totalen Muskelzell-dichte in rechten, unverletzten Muskeln gab, zeigte sich interessanterweise weder an Tag 28 noch 56 eine Veränderung der Regeneratzell-dichte für diese Muskeln. Es ist momentan unklar, wie die totale Zell-dichte in unverletzten Muskeln zwischen Tag 7 und 28 ansteigen kann, ohne dass



sich eine regenerative Aktivität in Form einer erhöhten Regeneratzelldichte an Tag 28 beobachten lässt. Nichtsdestotrotz ist diese Feststellung insgesamt vereinbar mit den Beobachtungen bei verletzten Muskeln. Hier konnte sich ebenfalls kein spezieller Effekt auf Regeneratzellen zwischen Tag 7 und 28 darstellen lassen. Da außer dem rechten und linken M. soleus keine weiteren Muskeln untersucht worden waren, bleibt unbeantwortet, ob sich eine Erhöhung der Muskelzelldichte auch in anderen Skelettmuskeln hätte beobachten lassen können.

Ein endokriner Wirkmechanismus, wie man die Verteilung bioaktiver Moleküle über die Blutzirkulation bezeichnet, ist zwar für MSC in Bezug auf die Muskelregeneration noch nicht näher beschrieben worden, dennoch macht man sich die systemischen Effekte von Stammzellen auf das Immunsystem bereits zunutze. Beispielsweise verbessern MSC das Outcome von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, die im Rahmen der Behandlung eine steroidrefraktäre Graft-versus-Host-Reaktion entwickeln [139]. Hierbei limitieren MSC durch ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten die Abstoßung des Transplantats und steigern damit die Überlebenschancen der Patienten. Die Arbeitsgruppe um Karrussis et al. transplantierte MSC in Patienten mit Multipler Sklerose und Amyotropher Lateralsklerose. Eine sofortige immunmodulatorische Wirkung zeigte sich in Form einer Suppression von aktivierten Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen [140]. MSC scheinen in der Lage zu sein, inflammatorische Prozesse immunologischer Erkrankungen zu beeinflussen [140]. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 dargelegt, sind Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen maßgeblich an der primären Phase der Muskelregeneration beteiligt. Einige Studien konnten kürzlich zeigen, dass Makrophagen direkt mit Myoblasten interagieren, wobei diese Wechselwirkung von der Rekrutierung der SaC bis hin zur Bildung neuer Myotuben reicht [141]. Insgesamt zielen diese Zell-Therapien auf eine Reduktion pro-inflammatorischer Effekte ab, um das regenerative Regenerationspotenzial des Muskels zu fördern [141].

### ***Unterschiede der histologischen Parameter in den einzelnen Verletzungsregionen***

Histologische Unterschiede zwischen der primär verletzten und der an das Trauma grenzenden Region sind bereits beschrieben worden. Eine Vorarbeit von Winkler et al., in der dasselbe etablierte Quetschtrauma verwendet worden war, konnte zeigen, dass die Region mit Insertion des neurovaskulären Bündels indirekt von den sie umgebenden traumatisierten Muskelbereichen beeinflusst wird [63]. In diesem Bereich hatten sich kurz nach Trauma interstitielle Hämatome und eine initiale Infiltration inflammatorischer Zellen beobachten lassen [63]. Insgesamt zeigte sich aber eine betonte Konservierung der Muskelzellen verglichen mit der ein- und zweifach verletzten Region [63]. Die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch zeigen, dass sich in der Kontrollgruppe die totale Muskelzelldichte der indirekten Verletzungsregion von der Zelldichte der benachbarten primär ein- und zweifach verletzten Region zu keinem Zeitpunkt wesentlich unterscheidet. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise auf das hier verwendete histologische Einteilungsmodell zurückführen, welches an Muskelquerschnitten etabliert worden war, während Winkler et al. ihren Beobachtungen Längsschnitte zugrunde legten. Alle drei Verletzungsregionen zeigten im Übrigen einen graduellen Zellverlust, was sich auch schon bei Betrachtung des gesamten Muskels für die Kontrollgruppe hatte beobachten lassen.

Dagegen zeigten sich hinsichtlich der totalen Muskelzelldichte in der mit MSC behandelten Gruppe erstens deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe und zweitens auch Unterschiede zwischen den Verläufen der

einzelnen Verletzungsregionen. Die einfach verletzte Region der MSC-Gruppe zeigte beispielsweise zu allen Zeitpunkten eine deutlich höhere Muskelzelldichte sowie einen kontinuierlich steigenden Regeneratzellanteil. Einen Unterschied der totalen Muskelzelldichte hatte man bei Betrachtung des gesamten Muskels jedoch nicht sehen können, da die totale Zell-dichte der indirekt und zweifach verletzten Region zum selben Zeitpunkt etwas geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgefallen war.

Von MSC hervorgerufene Unterschiede in verschiedenen Traumaregionen hatten auch Klein et al. mit einem Laser-Massenspektrometrie Verfahren (MALDI-IMS) erfassen können [142]. Demnach hatte sich eine höhere Konzentration von Tenascin-C in der indirekt verletzten Region von Muskeln nach MSC-Behandlung im Vergleich zur indirekt verletzten Region von Kontrollmuskeln messen lassen [142]. Tenascin-C ist während der Wundheilung und Morphogenese anwesend und bildet einen Bestandteil der Stammzellnische [142]. Diese molekularen Veränderungen hatten sich zudem bereits sieben Tagen nach Trauma und MSC-Transplantation gezeigt [142]. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Remodeling und die Morphogenese in mit MSC behandelten Muskeln fortgeschrittener seien. Diese frühen molekularen Veränderungen würden sich zudem hauptsächlich in der indirekt verletzten Region ereignen, wohingegen sie in der primär traumatisierten Region weniger stark ausgeprägt seien [142].

Diese sehr interessanten Ergebnisse von Klein et al. lassen sich allerdings schwer auf die hier gemachten Beobachtungen hinsichtlich der totalen Muskel- und Regeneratzell-dichte übertragen. Falls sich die Anzeichen verdichten, dass Tenascin-C einen Marker der frühen Muskelregeneration darstellt, dann zeigt sich dessen Effekt in Form einer gesteigerten Muskelzell-dichte scheinbar erst nach 28 Tagen sowohl in der indirekt als auch zweifach verletzten Region, während hingegen zu allen Zeitpunkten ein weitestgehend konstanter Regeneratzellanteil in beiden Regionen besteht. In der einfach verletzten Region hingegen hatte man bereits an Tag 7 eine erhöhte totale Muskelzell-dichte mit einem geringen Regeneratzellanteil beobachten können.

Möglicherweise hätte ein Verlauf der Tenascin-C Dichte bei der Aufklärung dieses Widerspruchs helfen können. Die Molekül-Konzentration wurde von Klein et al. jedoch nur zu einem Zeitpunkt bestimmt [142]. Zudem wurde von den Autoren trotz des gleichen Traumamodells im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit keine Unterscheidung der ein- und zweifach verletzten Region vorgenommen. Möglicherweise lässt sich diese Einteilung nur anhand von Querschnitten nachvollziehen, während Klein et al. ihre Informationen hingegen aus Längsschnitten bezogen hatten [142].

### **6.3 Methodenkritik**

Dies ist bislang die einzig bekannte Studie, die sowohl die totale Muskelzell- als auch die Regeneratzell-dichte in mehreren kompletten Muskelquerschnitten mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens erhoben hat. Diese ausführliche histologische Analyse sollte helfen, neue Erkenntnisse über einen möglichen Zusammenhang zwischen MSC und der Muskelzell-dichte bzw. -zusammensetzung in regenerierenden Muskeln zu gewinnen, der einen Kraftzuwachs erklären könnte.

Man muss dabei allerdings berücksichtigen, dass die Muskelkraft grundsätzlich durch mehrere Faktoren bedingt ist [35]. Neben der Gesamtheit aller kontraktilen Einheiten spielt die Ausrichtung und Zusammensetzung der Muskelzelltypen eine Rolle bei der Kraftentwicklung [35]. Auch die Anwesenheit von

Bindegewebe wirkt sich auf die Kraftübertragung aus [137]. Gleiches gilt für die Verbindungen zwischen Muskel und Sehne, die sogenannten myotendinöse Verknüpfungen [37]. Ferner spielen Innervation und Vaskularisierung des Muskels eine Rolle [37]. In dieser Arbeit konzentrierten wir uns nur auf den Einfluss von MSC auf die Muskelzellichte und die Differenzierung der Regeneratzellen, während die anderen Aspekte nicht berücksichtigt wurden, wodurch sich nur stark vereinfachte Aussagen zum Effekt der MSC machen lassen.

Obwohl die Histologie eine bewährte Wissenschaft bei der Untersuchung von Geweben ist, hat sie den Nachteil, dass sie nur den Endpunkt eines Experiments analysieren kann. Eine unvermeidbare Folge unserer Untersuchung war, dass nach Entnahme des Muskels das Tier getötet werden musste, womit sich die Studie vom 3R-Prinzip, *Replace – Reduce – Refine*, entfernt. Die Anzahl der Tiere konnte jedoch durch Anlehnung an die Statistik vorheriger Studien insgesamt reduziert werden.

Bislang wurde in Arbeiten zu relevanten Quetschtraumata im Skelettmuskel meist nur zwischen primären und sekundären Traumazonen unterschieden [63, 142]. Dies limitiert die Vergleichbarkeit und die Interpretation mit der hiesigen Einteilung in eine einfach, indirekt und zweifach verletzte Region. Man könnte in zukünftigen experimentellen Studien das Traumamodell verändern oder, da es bereits etabliert ist, das histologische Einteilungsmodell modifizieren. Denkbar wäre beispielsweise eine wie bei Klein et al. beschriebene Einteilung in ein primäres und indirekt betroffenes Traumaareal [142], womit eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten gegeben wäre.

Bei dem hier angewendeten Quetschtrauma handelt es sich um ein etabliertes und standardisiertes Verfahren. Einige Kritiker befürworten jedoch die Verwendung eines nicht-invasiven Kontusionsmodell zur Untersuchung der Muskelregeneration, da eine hohe Invasivität möglicherweise Immunantworten stimuliert [34]. Dieser Einwand ist insofern berechtigt, da momentan von einer Interaktion zwischen MSC und dem Immunsystem ausgegangen wird [141], welche durch ein invasives Prozedere möglicherweise beeinflusst werden könnte. Im Gegensatz zu anderen oft benutzten invasiven Modellen, inklusive Lazeration, Nadelpunktionen oder Toxin-induzierten Verletzungen, hat das hier verwendete Traumamodell jedoch klinische Relevanz, da es die Komplexität iatrogenen Verletzungen, wie sie z. B. bei einer Hüftendoprothetik auftreten, widerspiegelt. Da eine Hüft-OP per se einen Eingriff darstellt und die MSC-Therapie zur Behandlung ihrer Folgen zukünftig in der Klinik eingeführt werden soll, ist dieses Traumamodell klinisch hochrelevant.

Aufgrund der guten Durchführbarkeit und der positiven Vorergebnisse wurde der Ansatz autologe MSC aus Knochenmark zu verwenden aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe übernommen. Mit Bezug auf den vorherigen Absatz kann zudem die Transplantation autologer MSC vollzogen werden, ohne die Notwendigkeit eine immunsuppressive Therapie einzuleiten [140]. Nebenbei wird diese Zellart auch generell als sicher eingestuft [140]. Eine Entnahme von MSC bei Patienten wäre zwar ebenfalls denkbar, jedoch müsste sich der Patient einer zusätzlichen invasiven und ggf. schmerzhaften Prozedur unterziehen. Eine Therapie mit autologen MSC wäre demnach auch nur bei geplanten Eingriffen möglich. Zudem weisen Stammzellen von älteren Individuen eine geringere biologische Aktivität auf [143], sodass die Therapie für ältere Patienten von geringerem Nutzen wäre. Eine alternative Quelle stellen allogene Stammzellen dar, die beispielsweise aus Plazenten gewonnen werden [121].

## 6.4 Ausblick

Abschließend sollen drei Aspekte veranschaulicht werden, die sich als mögliche Anknüpfungspunkte der hier durchgeführten Studie ergeben: 1. Die Weiterentwicklung des computergestützten Verfahrens, 2. Die genauere Untersuchung des systemischen Effekts und 3. Welche Maßnahmen ergriffen werden können, um die Übertragung der Stammzell-Therapie in die Klinik zu unterstützen.

1. Das zur Erhebung der Daten verwendete CSV hat zwei entscheidende Vorteile: Zum einen liefert es zuverlässige Ergebnisse, zum anderen dokumentiert es im Vergleich zur manuellen Auswertung in einem Durchlauf gleich mehrere Parameter. So wird neben der totalen Muskel- und Regeneratzelldichte auch der minimale Feret-Durchmesser aller Muskelzellen erfasst. Dieser Messwert gibt den kleinsten Durchmesser einer querangeschnittenen Zelle an, wodurch er unabhängig der Muskelzellorientierung die tatsächliche Zellgröße am genauesten wiedergibt [118].

Eine Möglichkeit der Auswertung des minimalen Feret-Durchmessers besteht z. B. in der Erstellung von Muskelzellhistogrammen einzelner Schnitte. Mit den so gewonnenen Informationen könnten die histologischen Profile der Kontroll- und MSC-Gruppe ergänzt werden. Die Verarbeitung der in diesem Zusammenhang gewonnenen sehr großen Datenmenge bereitet momentan noch Schwierigkeiten, womit sich ein Anknüpfungspunkt für ein eigenständiges Forschungsprojekt bietet. Die Aufgabe könnte in einer Weiterentwicklung des Algorithmus bestehen, um die Daten für eine Interpretation lesbar zu machen. Da das CSV in der Open-Source-Software ImageJ entwickelt wurde, kann es problemlos von internen sowie externen Arbeitsgruppen verwendet werden.

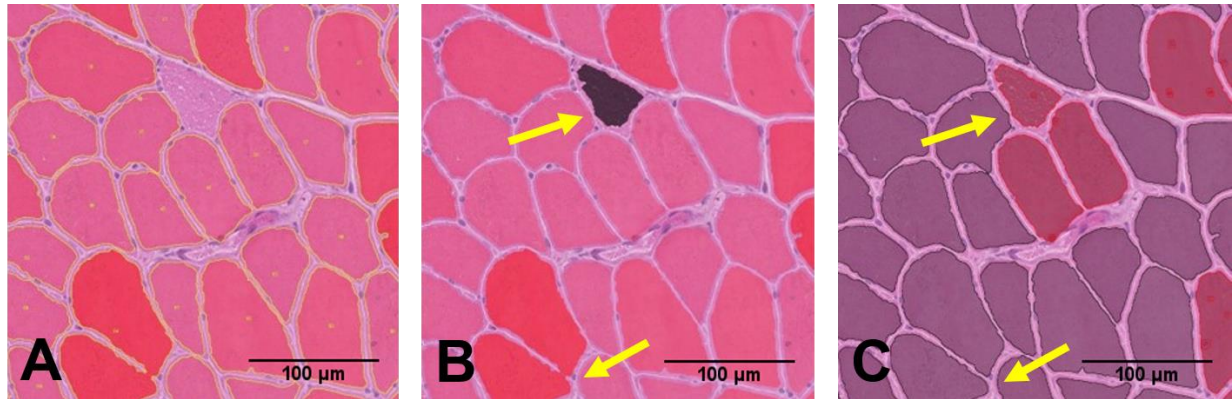
2. Die experimentellen Ergebnisse der Studie zeigten, dass auch kontralaterale unverletzte Muskeln eine erhöhte Muskelzellichte aufwiesen, wenn MSC mittels Alginategel auf verletzte Muskeln transplantiert werden. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die lokale Verabreichung von MSC einen systemischen Effekt hat. Bisher wurde dieser Effekt in keiner Studie explizit untersucht. Lediglich bei von Roth et al. deutet sich ein möglicher Hinweis an, da die intra-arteriell applizierten MSC zu einer funktionellen Verbesserung verletzter Muskeln führten, wobei die markierten Zellen in den traumatisierten Muskeln jedoch nicht dargestellt werden konnten [137].

Weiterführende Studien könnten demnach untersuchen, ob es nach der Behandlung mit MSC zu einem generellen Anstieg der totalen Muskelzellichte in anderen Skelettmuskeln kommt. Außerdem bieten sich weitere Fragen an: Finden sich messbare Parameter im Blut, die einen systemischen Effekt bestätigen? Ist eine Muskelverletzung Voraussetzung für eine Muskelzellsteigerung durch MSC?

3. Nachdem die Translation in die Klinik mit dem erfolgreichen Einsatz von MSC plazerarer Herkunft bei Implantation einer Hüfttotalendoprothese bereits stattgefunden hat [121], erscheint es sinnvoll, die beiden vorangegangenen Aspekte bei zukünftigen klinischen Studien zu berücksichtigen.

Falls es einen systemischen Effekt gibt, so sollte er vor dem Hintergrund möglicher Risiken bei einer Zelltherapie mit in Betracht gezogen und untersucht werden. Die Auswertung von Muskelbiopsien könnte zudem mit dem hier entwickelten computergestützten Verfahren durchgeführt werden. Eine im Rahmen des 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirats der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM) präsentierte, erstmals durchgeführte Analyse mit humanen Muskelquerschnitten hatte bereits

vielversprechende Ergebnisse gezeigt (Abb. 34) [144]. Die Verwendung eines standardisierten Bildanalyseverfahrens würde dabei nicht nur die Auswertung erleichtern, sondern auch die Vergleichbarkeit zukünftiger Arbeiten erhöhen.



**Abbildung 34: Anwendung des Algorithmus auf humane Muskelquerschnitte.** A = Ergebnismaske nach Anwendung des ersten Makros; B = Manuelle Bearbeitung innerhalb des zweiten Makros; C = Ergebnismaske nach Anwendung des zweiten Makros.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] A. Wengler, U. Nimptsch, T. Mansky, Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011, *Dtsch Arztebl Int* 111(23-24) (2014) 407-16.
- [2] T.H. Qazi, D.J. Mooney, M. Pumberger, S. Geissler, G.N. Duda, Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends, *Biomaterials* 53 (2015) 502-21.
- [3] F. Bopp, [Total hip arthroplasty with a less invasive anterolateral approach], *Z Orthop Unfall* 152(2) (2014) 117-8.
- [4] R. Iorio, W.L. Healy, P.D. Warren, D. Appleby, Lateral trochanteric pain following primary total hip arthroplasty, *J Arthroplasty* 21(2) (2006) 233-6.
- [5] T. Hartwig, F. Streitparth, C. Gross, M. Müller, C. Perka, M. Putzier, P. Strube, Digital 3-dimensional analysis of the paravertebral lumbar muscles after circumferential single-level fusion, *J Spinal Disord Tech* 24(7) (2011) 451-4.
- [6] A.G. Kulkarni, H. Bohra, A. Dhruv, A. Sarraf, A. Bassi, V.M. Patil, Minimal invasive transforaminal lumbar interbody fusion versus open transforaminal lumbar interbody fusion, *Indian J Orthop* 50(5) (2016) 464-472.
- [7] K.H. Lee, W.M. Yue, W. Yeo, H. Soeharno, S.B. Tan, Clinical and radiological outcomes of open versus minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion, *Eur Spine J* 21(11) (2012) 2265-70.
- [8] M. Müller, S. Tohtz, I. Springer, M. Dewey, C. Perka, Randomized controlled trial of abductor muscle damage in relation to the surgical approach for primary total hip replacement: minimally invasive anterolateral versus modified direct lateral approach, *Arch Orthop Trauma Surg* 131(2) (2011) 179-89.
- [9] H. Böhm, D. Hagemeyer, Y. Thummerer, R. Kipping, U. Stöckle, K. Scheuerer, Rehabilitation of gait in patients after total hip arthroplasty: Comparison of the minimal invasive Yale 2-incision technique and the conventional lateral approach, *Gait Posture* 44 (2016) 110-5.
- [10] P.F. Bergin, J.D. Doppelt, C.J. Kephart, M.T. Benke, J.H. Graeter, A.S. Holmes, H. Haleem-Smith, R.S. Tuan, A.S. Unger, Comparison of minimally invasive direct anterior versus posterior total hip arthroplasty based on inflammation and muscle damage markers, *J Bone Joint Surg Am* 93(15) (2011) 1392-8.
- [11] K.E. Mjaaland, K. Kivle, S. Svenningsen, A.H. Pripp, L. Nordsletten, Comparison of markers for muscle damage, inflammation, and pain using minimally invasive direct anterior versus direct lateral approach in total hip arthroplasty: A prospective, randomized, controlled trial, *J Orthop Res* 33(9) (2015) 1305-10.
- [12] J. van Oldenrijk, P.V. Hoogland, G.J. Tuijthof, R. Corveleijn, T.W. Noordenbos, M.U. Schafroth, Soft tissue damage after minimally invasive THA, *Acta Orthop* 81(6) (2010) 696-702.
- [13] S.T. Woolson, C.S. Mow, J.F. Syquia, J.V. Lannin, D.J. Schurman, Comparison of primary total hip replacements performed with a standard incision or a mini-incision, *J Bone Joint Surg Am* 86-A(7) (2004) 1353-8.
- [14] P.C. Noble, J.D. Johnston, J.A. Alexander, M.T. Thompson, M.M. Usrey, E.M. Heinrich, G.C. Landon, K.B. Mathis, Making minimally invasive THR safe: conclusions from biomechanical simulation and analysis, *Int Orthop* 31 Suppl 1 (2007) S25-8.
- [15] O. Gille, I. Obeid, C. Degrise, P. Guerin, W. Skalli, J.M. Vital, The use of curare during anesthesia to prevent iatrogenic muscle damage caused by lumbar spinal surgery through a posterior approach, *Spine (Phila Pa 1976)* 32(4) (2007) 402-5.
- [16] N. Tabata, Morphological changes in traumatized skeletal muscle: the appearance of 'opaque fibers' of cervical muscles as evidence of compression of the neck, *Forensic Sci Int* 96(2-3) (1998) 197-214.
- [17] Y. Kawaguchi, H. Matsui, H. Tsuji, Back muscle injury after posterior lumbar spine surgery. Part 1: Histologic and histochemical analyses in rats, *Spine (Phila Pa 1976)* 19(22) (1994) 2590-7.
- [18] Y. Kawaguchi, H. Matsui, H. Tsuji, Back muscle injury after posterior lumbar spine surgery. Part 2: Histologic and histochemical analyses in humans, *Spine (Phila Pa 1976)* 19(22) (1994) 2598-602.
- [19] J.R. Berstock, A.W. Blom, A.D. Beswick, A systematic review and meta-analysis of the standard versus mini-incision posterior approach to total hip arthroplasty, *J Arthroplasty* 29(10) (2014) 1970-82.
- [20] C. Yue, P. Kang, F. Pei, Comparison of Direct Anterior and Lateral Approaches in Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA), *Medicine (Baltimore)* 94(50) (2015) e2126.
- [21] J. Schmolders, S. Gravius, D.C. Wirtz, [Significance of Minimally Invasive Approaches during Primary Hip Arthroplasty - an Update], *Z Orthop Unfall* 152(2) (2014) 120-9.
- [22] R. Kennon, J. Keggi, L.E. Zatorski, K.J. Keggi, Anterior approach for total hip arthroplasty: beyond the minimally invasive technique, *J Bone Joint Surg Am* 86-A Suppl 2 (2004) 91-7.



- [23] C. Seidlitz, M. Kip, Einführung in das Indikationsgebiet und Verfahren, in: H.-H. Bleß, M. Kip (Eds.), *Weißbuch Gelenkersatz Versorgungssituation endoprothetischer Hüft- und Knieoperationen in Deutschland*, Springer 2017, pp. 1-15.
- [24] T. Renkawitz, T. Kalteis, J. Grifka, Erkrankungen und Verletzungen von Hüftgelenk und Oberschenkel, in: J. Grifka, M. Kuster (Eds.), *Orthopädie und Unfallchirurgie Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung*, Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, 2011, pp. 711-756.
- [25] S.D. Ulrich, T.M. Seyler, D. Bennett, R.E. Delanois, K.J. Saleh, I. Thongtrangan, M. Kuskowski, E.Y. Cheng, P.F. Sharkey, J. Parvizi, J.B. Stiehl, M.A. Mont, Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision?, *Int Orthop* 32(5) (2008) 597-604.
- [26] P. von Roth, M.P. Abdel, F. Wauer, T. Winkler, G. Wassilew, G. Diederichs, C. Perka, Significant muscle damage after multiple revision total hip replacements through the direct lateral approach, *Bone Joint J* 96-B(12) (2014) 1618-22.
- [27] S. Schiaffino, T. Partridge, Preface, in: S. Schiaffino, P. Terence (Eds.), *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*, Springer Science and Business Media B.V., Dordrecht, The Netherlands, 2008, pp. vii-x.
- [28] H. Yin, F. Price, M.A. Rudnicki, Satellite cells and the muscle stem cell niche, *Physiol Rev* 93(1) (2013) 23-67.
- [29] S. Ciciliot, S. Schiaffino, Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications, *Curr Pharm Des* 16(8) (2010) 906-14.
- [30] K. Cheung, P. Hume, L. Maxwell, Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors, *Sports Med* 33(2) (2003) 145-64.
- [31] M. Järvinen, A.J. Aho, M. Lehto, H. Toivonen, Age dependent repair of muscle rupture. A histological and microangiographical study in rats, *Acta Orthop Scand* 54(1) (1983) 64-74.
- [32] T.L. Criswell, B.T. Corona, C.L. Ward, M. Miller, M. Patel, Z. Wang, G.J. Christ, S. Soker, Compression-induced muscle injury in rats that mimics compartment syndrome in humans, *Am J Pathol* 180(2) (2012) 787-97.
- [33] S. Charrin, M. Latil, S. Soave, A. Poleskaya, F. Chrétien, C. Boucheix, E. Rubinstein, Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81, *Nat Commun* 4 (2013) 1674.
- [34] C. Smith, M.J. Kruger, R.M. Smith, K.H. Myburgh, The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities, *Sports Med* 38(11) (2008) 947-69.
- [35] J. Huard, Y. Li, F.H. Fu, Muscle injuries and repair: current trends in research, *J Bone Joint Surg Am* 84-A(5) (2002) 822-32.
- [36] R. Sambasivan, R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, H. Guenou, B. Malissen, S. Tajbakhsh, A. Galy, Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration, *Development* 138(17) (2011) 3647-56.
- [37] S.B. Chargé, M.A. Rudnicki, Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, *Physiol Rev* 84(1) (2004) 209-38.
- [38] A.L. Moyer, K.R. Wagner, Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle, *Curr Opin Rheumatol* 23(6) (2011) 568-73.
- [39] C.F. Bentzinger, Y.X. Wang, N.A. Dumont, M.A. Rudnicki, Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche, *EMBO Rep* 14(12) (2013) 1062-72.
- [40] L. Lescaudron, E. Peltékian, J. Fontaine-Pérus, D. Paulin, M. Zampieri, L. Garcia, E. Parrish, Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant, *Neuromuscul Disord* 9(2) (1999) 72-80.
- [41] L. Arnold, A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, B. Chazaud, Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis, *J Exp Med* 204(5) (2007) 1057-69.
- [42] X. Liu, Y. Liu, L. Zhao, Z. Zeng, W. Xiao, P. Chen, Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration, *Cell Biol Int* (2016).
- [43] D. Burzyn, W. Kuswanto, D. Kolodin, J.L. Shadrach, M. Cerletti, Y. Jang, E. Sefik, T.G. Tan, A.J. Wagers, C. Benoist, D. Mathis, A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair, *Cell* 155(6) (2013) 1282-95.
- [44] S. Schiaffino, M.G. Pereira, S. Ciciliot, P. Rovere-Querini, Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration, *FEBS J* (2016).
- [45] A. Castiglioni, G. Corna, E. Rigamonti, V. Basso, M. Vezzoli, A. Monno, A.E. Almada, A. Mondino, A.J. Wagers, A.A. Manfredi, P. Rovere-Querini, FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration, *PLoS One* 10(6) (2015) e0128094.
- [46] A. MAURO, Satellite cell of skeletal muscle fibers, *J Biophys Biochem Cytol* 9 (1961) 493-5.

- [47] C.A. Collins, I. Olsen, P.S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, T.A. Partridge, J.E. Morgan, Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche, *Cell* 122(2) (2005) 289-301.
- [48] Y. Kharraz, J. Guerra, C.J. Mann, A.L. Serrano, P. Muñoz-Cánoves, Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair, *Mediators Inflamm* 2013 (2013) 491497.
- [49] F.S. Tedesco, A. Dellavalle, J. Diaz-Manera, G. Messina, G. Cossu, Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells, *J Clin Invest* 120(1) (2010) 11-9.
- [50] B.C. Syverud, K.W. VanDusen, L.M. Larkin, Growth Factors for Skeletal Muscle Tissue Engineering, *Cells Tissues Organs* 202(3-4) (2016) 169-179.
- [51] D.B. Gurevich, P.D. Nguyen, A.L. Siegel, O.V. Ehrlich, C. Sonntag, J.M. Phan, S. Berger, D. Ratnayake, L. Hersey, J. Berger, H. Verkade, T.E. Hall, P.D. Currie, Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo, *Science* 353(6295) (2016) aad9969.
- [52] A. Sacco, R. Doyonnas, P. Kraft, S. Vitorovic, H.M. Blau, Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells, *Nature* 456(7221) (2008) 502-6.
- [53] R. Sambasivan, S. Tajbakhsh, Adult skeletal muscle stem cells, *Results Probl Cell Differ* 56 (2015) 191-213.
- [54] L.C. Ceafalan, B.O. Popescu, M.E. Hinescu, Cellular players in skeletal muscle regeneration, *Biomed Res Int* 2014 (2014) 957014.
- [55] B. Cadot, V. Gache, E.R. Gomes, Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time, *Nucleus* 6(5) (2015) 373-81.
- [56] R. Couteaux, J.C. Mira, A. d'Albis, Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects, *Biol Cell* 62(2) (1988) 171-82.
- [57] G. Karpati, M.J. Molnar, Muscle fiber regeneration in human skeletal muscle diseases, in: S. Schiaffino, T. Partridge (Eds.), *Skeletal muscle repair and regeneration*, Springer Science and Business Media B. V., Dordrecht, The Netherlands, 2008, pp. 199-215.
- [58] N.C. Joyce, B. Oskarsson, L.W. Jin, Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders, *Phys Med Rehabil Clin N Am* 23(3) (2012) 609-31.
- [59] A. Dellavalle, M. Sampaolesi, R. Tonlorenzi, E. Tagliafico, B. Sacchetti, L. Perani, A. Innocenzi, B.G. Galvez, G. Messina, R. Morosetti, S. Li, M. Belicchi, G. Peretti, J.S. Chamberlain, W.E. Wright, Y. Torrente, S. Ferrari, P. Bianco, G. Cossu, Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells, *Nat Cell Biol* 9(3) (2007) 255-67.
- [60] F.D. Camargo, R. Green, Y. Capetanaki, K.A. Jackson, M.A. Goodell, Y. Capetanaki, Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates, *Nat Med* 9(12) (2003) 1520-7.
- [61] S.Y. Corbel, A. Lee, L. Yi, J. Duenas, T.R. Brazelton, H.M. Blau, F.M. Rossi, Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle, *Nat Med* 9(12) (2003) 1528-32.
- [62] K. Garg, M.D. Boppart, Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche, *J Appl Physiol* (1985) 121(5) (2016) 1053-1058.
- [63] T. Winkler, P. von Roth, G. Matziolis, M.R. Schumann, S. Hahn, P. Strube, G. Stoltenburg-Didinger, C. Perka, G.N. Duda, S.V. Tohtz, Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma, *Acta Orthop* 82(1) (2011) 102-11.
- [64] B.T. Corona, X. Wu, C.L. Ward, J.S. McDaniel, C.R. Rathbone, T.J. Walters, The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM, *Biomaterials* 34(13) (2013) 3324-35.
- [65] K. Garg, B.T. Corona, T.J. Walters, Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury, *Front Pharmacol* 6 (2015) 87.
- [66] T.A. Järvinen, T.L. Järvinen, M. Kääriäinen, H. Kalimo, M. Järvinen, Muscle injuries: biology and treatment, *Am J Sports Med* 33(5) (2005) 745-64.
- [67] R.L. Lieber, S.R. Ward, Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis, *Am J Physiol Cell Physiol* 305(3) (2013) C241-52.
- [68] B. Yoseph, S. Soker, Redefining the satellite cell as the motor of skeletal muscle regeneration, *Journal of Science and Applications: Biomedicine* 3(5) (2015) 76-82.
- [69] A.R. Caseiro, T. Pereira, P.J. Bártolo, J.D. Santos, A.L. Luís, A.C. Maurício, Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems – Perspectives for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration, *Procedia Engineering* 110 (2015) 90-97.
- [70] J. Petersen, P. Hölmich, Evidence based prevention of hamstring injuries in sport, *Br J Sports Med* 39(6) (2005) 319-23.
- [71] T.A. Järvinen, M. Järvinen, H. Kalimo, Regeneration of injured skeletal muscle after the injury, *Muscles Ligaments Tendons J* 3(4) (2013) 337-45.

- [72] D.N. Deal, J. Tipton, E. Rosencrance, W.W. Curl, T.L. Smith, Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats, *J Bone Joint Surg Am* 84-A(9) (2002) 1573-8.
- [73] R. Takagi, N. Fujita, T. Arakawa, S. Kawada, N. Ishii, A. Miki, Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats, *J Appl Physiol* (1985) 110(2) (2011) 382-8.
- [74] A.C. Masquelet, Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction, *Langenbecks Arch Surg* 388(5) (2003) 344-6.
- [75] T. Hotfiel, H.D. Carl, B. Swoboda, M. Heinrich, R. Heiß, C. Grim, M. Engelhardt, [Current Conservative Treatment and Management Strategies of Skeletal Muscle Injuries], *Z Orthop Unfall* 154(3) (2016) 245-53.
- [76] P.M. Tscholl, Der Einsatz von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) im Spitzensport., *Dtsch Z Sportmed.* 65(2) (2014) 34-37.
- [77] J. Gille, S. Bark, H. Riepenhof, A. Partenheimer, Infiltrationsbehandlung bei akuten Muskelverletzungen: Sinn oder Unsinn?, *Dtsch Z Sportmed.* 64(4) (2013) 98-102.
- [78] M. Drakos, P. Birmingham, D. Delos, R. Barnes, C. Murphy, L. Weiss, R. Warren, Corticosteroid and Anesthetic Injections for Muscle Strains and Ligament Sprains in the NFL, *HSS J* 10(2) (2014) 136-42.
- [79] D. Delos, T.G. Maak, S.A. Rodeo, Muscle injuries in athletes: enhancing recovery through scientific understanding and novel therapies, *Sports Health* 5(4) (2013) 346-52.
- [80] G. Reurink, G.J. Goudswaard, M.H. Moen, A. Weir, J.A. Verhaar, J.L. Tol, Myotoxicity of injections for acute muscle injuries: a systematic review, *Sports Med* 44(7) (2014) 943-56.
- [81] R. Lenz, M. Kieb, P. Diehl, C. Grim, S. Vogt, T. Tischer, [Muscle, tendon and joint injections : What is the evidence?], *Orthopade* 45(5) (2016) 459-68.
- [82] H.S. Bedair, T. Karthikeyan, A. Quintero, Y. Li, J. Huard, Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle, *Am J Sports Med* 36(8) (2008) 1548-54.
- [83] M. Bennett, T.M. Best, S. Babul, J. Taunton, M. Lepawsky, Hyperbaric oxygen therapy for delayed onset muscle soreness and closed soft tissue injury, *Cochrane Database Syst Rev* (4) (2005) CD004713.
- [84] C. Borselli, C.A. Cezar, D. Shvartsman, H.H. Vandeburgh, D.J. Mooney, The role of multifunctional delivery scaffold in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration, *Biomaterials* 32(34) (2011) 8905-14.
- [85] A.J. Friedenstein, K.V. Petrakova, A.I. Kurolesova, G.P. Frolova, Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues, *Transplantation* 6(2) (1968) 230-47.
- [86] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284(5411) (1999) 143-7.
- [87] C. Sassoli, S. Zecchi-Orlandini, L. Formigli, Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration, *Cells* 1(4) (2012) 832-50.
- [88] M.F. Pittenger, Mesenchymal stem cells from adult bone marrow, *Methods Mol Biol* 449 (2008) 27-44.
- [89] G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, F. Mavilio, Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science* 279(5356) (1998) 1528-30.
- [90] G. Matziolis, T. Winkler, K. Schaser, M. Wiemann, D. Krockner, J. Tuischer, C. Perka, G.N. Duda, Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats, *Tissue Eng* 12(2) (2006) 361-7.
- [91] H. Schmalbruch, The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat, *Tissue Cell* 8(4) (1976) 673-92.
- [92] T. Winkler, P. von Roth, G. Matziolis, M. Mehta, C. Perka, G.N. Duda, Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats, *Tissue Eng Part A* 15(3) (2009) 487-92.
- [93] T. Winkler, P. von Roth, P. Radojewski, A. Urbanski, S. Hahn, B. Preininger, G.N. Duda, C. Perka, Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats, *J Tissue Eng Regen Med* 6 Suppl 3 (2012) s60-7.
- [94] J. Wang, L. Liao, J. Tan, Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions, *Expert Opin Biol Ther* 11(7) (2011) 893-909.
- [95] E.K. Merritt, D.W. Hammers, M. Tierney, L.J. Suggs, T.J. Walters, R.P. Farrar, Functional assessment of skeletal muscle regeneration utilizing homologous extracellular matrix as scaffolding, *Tissue Eng Part A* 16(4) (2010) 1395-405.
- [96] E.K. Merritt, M.V. Cannon, D.W. Hammers, L.N. Le, R. Gokhale, A. Sarathy, T.J. Song, M.T. Tierney, L.J. Suggs, T.J. Walters, R.P. Farrar, Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix, *Tissue Eng Part A* 16(9) (2010) 2871-81.
- [97] B.M. Andrade, M.R. Baldanza, K.C. Ribeiro, A. Porto, R. Peçanha, F.S. Fortes, G. Zapata-Sudo, A.C. Campos-de-Carvalho, R.C. Goldenberg, J.P. Werneck-de-Castro, Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model, *PLoS One* 10(6) (2015) e0127561.

- [98] S. Geissler, M. Textor, K. Schmidt-Bleek, O. Klein, M. Thiele, A. Ellinghaus, D. Jacobi, A. Ode, C. Perka, A. Dienelt, J. Klose, G. Kasper, G.N. Duda, P. Strube, In serum veritas-in serum sanitas? Cell non-autonomous aging compromises differentiation and survival of mesenchymal stromal cells via the oxidative stress pathway, *Cell Death Dis* 4 (2013) e970.
- [99] T. Winkler, P. von Roth, M.R. Schuman, K. Sieland, G. Stoltenburg-Didinger, M. Taupitz, C. Perka, G.N. Duda, G. Matziolis, In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats, *Tissue Eng Part A* 14(7) (2008) 1149-60.
- [100] Y. Muguruma, M. Reyes, Y. Nakamura, T. Sato, H. Matsuzawa, H. Miyatake, A. Akatsuka, J. Itoh, T. Yahata, K. Ando, S. Kato, T. Hotta, In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells, *Exp Hematol* 31(12) (2003) 1323-30.
- [101] T.A. Partridge, Cells that participate in regeneration of skeletal muscle, *Gene Ther* 9(11) (2002) 752-3.
- [102] K. Natsu, M. Ochi, Y. Mochizuki, H. Hachisuka, S. Yanada, Y. Yasunaga, Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers, *Tissue Eng* 10(7-8) (2004) 1093-112.
- [103] L.a.S. Meirelles, A.M. Fontes, D.T. Covas, A.I. Caplan, Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6) (2009) 419-27.
- [104] C. Sassoli, A. Pini, F. Chellini, B. Mazzanti, S. Nistri, D. Nosi, R. Saccardi, F. Quercioli, S. Zecchi-Orlandini, L. Formigli, Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF, *PLoS One* 7(7) (2012) e37512.
- [105] H. Saeed, M. Ahsan, Z. Saleem, M. Iqtedar, M. Islam, Z. Danish, A.M. Khan, Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update, *J Biomed Sci* 23 (2016) 41.
- [106] C. Borselli, H. Storrie, F. Benesch-Lee, D. Shvartsman, C. Cezar, J.W. Lichtman, H.H. Vandenberg, D.J. Mooney, Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8) (2010) 3287-92.
- [107] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials* 20(1) (1999) 45-53.
- [108] H.J. Kong, M.K. Smith, D.J. Mooney, Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells, *Biomaterials* 24(22) (2003) 4023-9.
- [109] T.H. Qazi, D.J. Mooney, G.N. Duda, S. Geissler, Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs, *Biomaterials* 140 (2017) 103-114.
- [110] M. Pumberger, T.H. Qazi, M.C. Ehrentraut, M. Textor, J. Kueper, G. Stoltenburg-Didinger, T. Winkler, P. von Roth, S. Reinke, C. Borselli, C. Perka, D.J. Mooney, G.N. Duda, S. Geißler, Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration, *Biomaterials* 99 (2016) 95-108.
- [111] T.H. Qazi, Synthetic biomaterial microenvironments to modulate paracrine effects of mesenchymal stromal cells for skeletal muscle regeneration, Julius Wolff Institut, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charite, Charite - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2016, p. 134.
- [112] B.M. Carlson, Muscle regeneration in animal models, in: S. Schiaffino, T. Partridge (Eds.), *Skeletal muscle repair and regeneration*, Springer Science and Business Media B.V., Dordrecht, The Netherlands, 2008, pp. 163-179.
- [113] A.I. Caplan, Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How, *Stem Cells Int* 2015 (2015) 628767.
- [114] M.A. Helal, N.E. Shaheen, F.A. Abu Zahra, Immunomodulatory capacity of the local mesenchymal stem cells transplantation after severe skeletal muscle injury in female rats, *Immunopharmacol Immunotoxicol* (2016) 1-9.
- [115] P. von Roth, G.N. Duda, P. Radojewski, B. Preininger, C. Perka, T. Winkler, Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats, *Gen Med* 9(2) (2012) 129-36.
- [116] R. Peçanha, L.L. Bagnó, M.B. Ribeiro, A.B. Robottom Ferreira, M.O. Moraes, G. Zapata-Sudo, T.H. Kasai-Brunswick, A.C. Campos-de-Carvalho, R.C. Goldenberg, J.P. Saar Werneck-de-Castro, Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury, *J Bone Joint Surg Am* 94(7) (2012) 609-17.
- [117] Y.J. Kim, T. Brox, W. Feiden, J. Weickert, Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images, *Cytometry A* 71(1) (2007) 8-15.
- [118] F. Liu, A.L. Mackey, R. Srikuea, K.A. Esser, L. Yang, Automated image segmentation of haematoxylin and eosin stained skeletal muscle cross-sections, *J Microsc* 252(3) (2013) 275-85.
- [119] L.R. Smith, E.R. Barton, SMASH - semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application, *Skelet Muscle* 4 (2014) 21.
- [120] A. Klemencic, S. Kovacic, F. Pernus, Automated segmentation of muscle fiber images using active contour models, *Cytometry* 32(4) (1998) 317-26.

- [121] T. Winkler, C. Perka, P. von Roth, A.N. Agres, H. Plage, B. Preininger, M. Pumberger, S. Geissler, E.L. Hagai, R. Ofir, L. Pinzur, E. Eyal, G. Stoltenburg-Didinger, C. Meisel, C. Consentius, M. Streitz, P. Reinke, G.N. Duda, H.D. Volk, Immunomodulatory placental-expanded, mesenchymal stromal cells improve muscle function following hip arthroplasty, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9(5) (2018) 880-897.
- [122] J. Mula, J.D. Lee, F. Liu, L. Yang, C.A. Peterson, Automated image analysis of skeletal muscle fiber cross-sectional area, *J Appl Physiol* (1985) 114(1) (2013) 148-55.
- [123] H. Meng, P.M. Janssen, R.W. Grange, L. Yang, A.H. Beggs, L.C. Swanson, S.A. Cossette, A. Frase, M.K. Childers, H. Granzier, E. Gussoni, M.W. Lawlor, Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease, *J Vis Exp* (89) (2014).
- [124] D. Vanhecke, W. Graber, D. Studer, Rapidly excised and cryofixed rat tissue, *Methods Cell Biol* 96 (2010) 513-27.
- [125] A.M. Firshman, S.J. Valberg, J.B. Bender, E.J. Annandale, D.W. Hayden, Comparison of histopathologic criteria and skeletal muscle fixation techniques for the diagnosis of polysaccharide storage myopathy in horses, *Vet Pathol* 43(3) (2006) 257-69.
- [126] F. Garton, J.T. Seto, K.N. North, N. Yang, Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis, *Neuromuscul Disord* 20(8) (2010) 540-7.
- [127] S.D. Pena, B.B. Gordon, G. Karpati, S. Carpenter, Lectin histochemistry of human skeletal muscle, *J Histochem Cytochem* 29(4) (1981) 542-6.
- [128] A.K. Gulati, A.A. Zalewski, An immunofluorescent analysis of lectin binding to normal and regenerating skeletal muscle of rat, *Anat Rec* 212(2) (1985) 113-7.
- [129] T.Y. Kostrominova, Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone, and ligament/tendon studies, *Microsc Res Tech* 74(1) (2011) 18-22.
- [130] C. Pertl, M. Eblenkamp, A. Pertl, S. Pfeifer, E. Wintermantel, H. Lochmüller, M.C. Walter, S. Krause, C. Thirion, A new web-based method for automated analysis of muscle histology, *BMC Musculoskelet Disord* 14 (2013) 26.
- [131] K. Wada, S. Katsuta, H. Soya, Formation process and fate of the nuclear chain after injury in regenerated myofiber, *Anat Rec (Hoboken)* 291(1) (2008) 122-8.
- [132] W. Roman, E.R. Gomes, Nuclear positioning in skeletal muscle, *Semin Cell Dev Biol* 82 (2018) 51-56.
- [133] S. Schiaffino, A.C. Rossi, V. Smerdu, L.A. Leinwand, C. Reggiani, Developmental myosins: expression patterns and functional significance, *Skelet Muscle* 5 (2015) 22.
- [134] T. Janssens, L. Antanas, S. Derde, I. Vanhorebeek, G. Van den Berghe, F. Güiza Grandas, Charisma: an integrated approach to automatic H&E-stained skeletal muscle cell segmentation using supervised learning and novel robust clump splitting, *Med Image Anal* 17(8) (2013) 1206-19.
- [135] T.S. de Windt, L.A. Vonk, I.C. Slaper-Cortenbach, M.P. van den Broek, R. Nizak, M.H. van Rijen, R.A. de Weger, W.J. Dhert, D.B. Saris, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons, *Stem Cells* 35(1) (2017) 256-264.
- [136] N.T. Ninagawa, E. Isobe, Y. Hirayama, R. Murakami, K. Komatsu, M. Nagai, M. Kobayashi, Y. Kawabata, S. Torihashi, Transplanted mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells promote muscle regeneration and accelerate functional recovery of injured skeletal muscle, *Biores Open Access* 2(4) (2013) 295-306.
- [137] P. von Roth, G.N. Duda, P. Radojewski, B. Preininger, K. Strohschein, E. Röhner, C. Perka, T. Winkler, Intra-Arterial MSC Transplantation Restores Functional Capacity After Skeletal Muscle Trauma, *Open Orthop J* 6 (2012) 352-6.
- [138] Y. Nakamura, S. Miyaki, H. Ishitobi, S. Matsuyama, T. Nakasa, N. Kamei, T. Akimoto, Y. Higashi, M. Ochi, Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration, *FEBS Lett* 589(11) (2015) 1257-65.
- [139] J.M. Munneke, M.J. Spruit, A.S. Cornelissen, V. van Hoven, C. Voermans, M.D. Hazenberg, The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature, *Transplantation* 100(11) (2016) 2309-2314.
- [140] D. Karussis, C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, B. Gowda-Kurkalli, J.M. Gomori, I. Kassis, J.W. Bulte, P. Petrou, T. Ben-Hur, O. Abramsky, S. Slavina, Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis, *Arch Neurol* 67(10) (2010) 1187-94.
- [141] F.A. Sass, M. Fuchs, M. Pumberger, S. Geissler, G.N. Duda, C. Perka, K. Schmidt-Bleek, Immunology Guides Skeletal Muscle Regeneration, *Int J Mol Sci* 19(3) (2018).
- [142] O. Klein, K. Strohschein, G. Nebrich, M. Fuchs, H. Thiele, P. Giavalisco, G.N. Duda, T. Winkler, J.H. Kobarg, D. Trede, S. Geissler, Unraveling local tissue changes within severely injured skeletal muscles in response to MSC-based intervention using MALDI Imaging mass spectrometry, *Sci Rep* 8(1) (2018) 12677.

[143] M. Li, J.C. Izpisua Belmonte, Ageing: Genetic rejuvenation of old muscle, *Nature* 506(7488) (2014) 304-5.

[144] M.C. Ehrentraut, M. Thiele, S. Geißler, G. Stoltenburg-Didinger, Halbautomatische Analyse histologischer Parameter in HE-gefärbten Querschnitten des Skelettmuskels mittels Open-source-Software, 23. Kongress des Wissenschaftlichen Beirats der DGM, Schattauer Nervenheilkunde, Munich, 2017.



## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Monika Christine Ehrentraut, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Histologische Analyse traumatisierter Skelettmuskulatur der Ratte nach Transplantation mesenchymaler Stromazellen mittels computergestütztem Segmentationsverfahren** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

## 9 Lebenslauf

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



## 10 Publikationsliste

### **Publikation:**

Matthias Pumberger, Taimoor H. Qazi, **M. Christine Ehrentraut**, Martin Textor, Janina Kueper, Gisela Stoltenburg-Didinger, Tobias Winkler, Philipp von Roth, Simon Reinke, Cristina Borselli, Carsten Perka, David J. Mooney, Georg N. Duda, Sven Geißler, Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration, *Biomaterials*, 2016;99:95-108

### **Posterpräsentation:**

**Monika Christine Ehrentraut**, Mario Thiele, Sven Geißler, Gisela Stoltenburg-Didinger, Halbautomatische Analyse histologischer Parameter in HE-gefärbten Querschnitten des Skelettmuskels mittels Open-source-Software, *Schattauer Nervenheilkunde 1-2/2017*, 2017

## 11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Tobias Winkler und bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Carsten Perka für die Überlassung und Bearbeitung des Themas dieser Dissertation bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt Mario Thiele, dessen Beitrag und umfangreiche Expertise essentiell für die Realisierung dieses Projekts waren.

Für ihre hilfreichen Kontakte und ihre kontinuierliche Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Stoltenburg-Didinger bedanken.

Vielen Dank gehen auch an Janina Kueper und Matthias Pumberger für die gemeinsame Organisation und Durchführung der Studie.

Mein ganz besonderer Dank geht an Taimoor H. Qazi für das Teilen seines Wissens und seine Freundschaft. Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Sven Geißler für seinen unermüdlichen Rückhalt bedanken. Großer Dank gebührt Gabriele Korus für die umfassende Einführung in die Histologie.

Vielen lieben Dank gehen an Lars und Nico für ihren fleißigen Einsatz.

Bei meinen lieben Eltern Thomas und Regine möchte ich mich für ihre technische und seelische Unterstützung bedanken und bei Basti, der mir zeigte, worauf es beim wissenschaftlichen Arbeiten ankommt.