

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

DISSERTATION

Einfluss von placental-derived adherent mesenchymal stromal cells
auf die Muskelregeneration der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Paul

aus Magdeburg

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
1. Zusammenfassung	11
2. Abstract	12
3. Einleitung	14
3.1. Skelettmuskulatur und ihr funktioneller Aufbau	14
3.2. Muskelverletzungen	14
3.3. Muskelregeneration	16
3.4. Therapie	20
3.4.1. Konventionelle Therapie	20
3.4.2. Medikamentöse Therapie	21
3.4.3. Chirurgische Intervention	21
3.4.4. Experimentelle Therapieansätze	22
3.4.4.1. Antifibrotische Therapie	22
3.4.4.2. Zelltherapie	22
3.5. Stammzellen in der Geweberegeneration	23
3.5.1. Mesenchymale Stammzellen	23
3.5.2. Mesenchymale Stammzellen in der Muskelregeneration	25
3.5.3. Mesenchymale Stammzellen der Plazenta	28
3.5.4. Placental-derived adherent mesenchymal stromal cells (PLX-Zellen)	30
3.6. Zielsetzung und Hypothesen der Dissertation	33
4. Material und Methoden	35
4.1. In vivo	35
4.1.1. Versuchstiere	35
4.1.2. Narkose und Schmerztherapie	35
4.1.3. Versuchsablauf	36
4.1.4. Operative Verfahren	37
4.1.4.1. Biopsie	37
4.1.4.2. Trauma	38
4.1.4.3. Vorbereitung der PLX-Zellen und Transplantation	39

4.1.5. Biomechanische Auswertung.....	40
4.1.5.1. Vorbereitung und Präparation	40
4.1.5.2. Messvorrichtung und Kraftmessung	40
4.2. Ex vivo.....	42
4.2.1. Herstellung der PLX-Zellen.....	42
4.2.2. Histologie	44
4.2.2.1. Aufbereitung der histologischen Präparate	44
4.2.2.1.1. Materialien und Reagenzien.....	44
4.2.2.1.2. Vorbereitung und Durchführung	44
4.2.2.2. Konventionelle Histologie.....	45
4.2.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	45
4.2.2.2.1.1. Materialien und Reagenzien	45
4.2.2.2.1.2. Vorbereitung und Durchführung	45
4.2.2.2.2. Sirius Rot	46
4.2.2.2.2.1. Materialien und Reagenzien	46
4.2.2.2.2.2. Vorbereitung und Durchführung	46
4.2.2.3. Immunhistochemische Reaktionen.....	47
4.2.2.3.1. Materialien und allgemeine Reagenzien.....	47
4.2.2.3.2. Myosin Slow-Reaktion	48
4.2.2.3.2.1. Antikörper und spezielle Reagenzien	48
4.2.2.3.2.2. Vorbereitung und Durchführung	48
4.2.2.3.3. Myosin Fast-Reaktion.....	49
4.2.2.3.3.1. Antikörper und spezielle Reagenzien	49
4.2.2.3.3.2. Vorbereitung und Durchführung	50
4.2.2.3.4. T-Zell-Rezeptor-Reaktion.....	50
4.2.2.3.4.1. Antikörper und spezielle Reagenzien	50
4.2.2.3.4.2. Vorbereitung und Durchführung	50
4.2.2.3.5. Faktor VIII-Reaktion	51
4.2.2.3.5.1. Antikörper und spezielle Reagenzien	51
4.2.2.3.5.2. Vorbereitung und Durchführung	51
4.2.2.3.6. CD68-Reaktion	52
4.2.2.3.6.1. Antikörper und spezielle Reagenzien	52
4.2.2.3.6.2. Vorbereitung und Durchführung	52
4.2.3. Auswertung der histologischen Präparate.....	53

4.2.3.1. Deskription	53
4.2.3.2. Histomorphometrie.....	53
4.2.3.2.1. Digitalisierung	53
4.2.3.2.2. Bestimmung der Muskelfläche und Fibrosefläche	53
4.2.3.2.3. Messung der Faserverteilung.....	53
4.2.3.2.4. Quantifizierung der Gefäße	54
4.2.3.2.5. Quantifizierung der Gewebsmakrophagen	54
4.2.3.2.6. Beurteilung der T-Zellen	54
4.3. Statistik	55
5. Ergebnisse	58
5.1. Auswertung der Kraftmessung.....	58
5.1.1. Einfluss der PLX-Zellen auf die Kontraktionskraft.....	58
5.1.2. Einfluss des Transplantationszeitpunktes auf die Kontraktionskraft.....	61
5.2. Auswertung der Histologie	62
5.2.1. Deskriptive Histologie	62
5.2.2. Einfluss der PLX-Zellen auf die Faserverteilung	68
5.2.3. Einfluss der PLX-Zellen auf das Fibroseareal	69
5.2.4. Einfluss der PLX-Zellen auf die Gefäßdichte.....	71
5.2.5. Einfluss der PLX-Zellen auf die T-Zell-Infiltration	72
5.2.6. Einfluss der PLX-Zellen auf die Makrophagen-Infiltration	74
5.3. Zusammenfassung	75
6. Diskussion	77
6.1. Beurteilung des Traumamodells und des Auswertungszeitpunktes	77
6.2. Einfluss der PLX-Zellen auf die Muskelregeneration.....	79
6.3. Beurteilung des Transplantationszeitpunktes	88
6.4. Zusammenfassung und Ausblick.....	89
Literaturverzeichnis.....	91
Eidesstattliche Versicherung.....	109
Lebenslauf.....	110
Danksagung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMSCs	Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells dt. Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe
Aqua dest.	Aqua destillata
Arteria	A.
BMMSCs	Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells dt. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark
CLI	Chronic Limb Ischemia dt. Chronisches Ischämiesyndrom der Extremitäten
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CrP	C-reaktives Protein
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor dt. Epidermaler Wachstumsfaktor
Fa.	Firma
fastMHC	fast Myosin Heavy Chain dt. schnelle schwere Kette des Myosins
fetalMHC	fetal Myosin Heavy Chain dt. fetale schwere Kette des Myosins
FGF	Fibroblast Growth Factor dt. Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FVIII	Faktor VIII
FT	Fast Twitch dt. schnell zuckend
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor dt. Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HLA	Human Leukocyte Antigen dt. Humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon gamma

IGF	Insulin-like Growth Factor dt. Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase dt. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISCT	International Society of Cellular Therapies
M.	Musculus
MDMSCs	Muscle-Derived Mesenchymal Stem Cells dt. Stammzellen aus dem Muskel abgeleitet
MSCs	Mesenchymal Stem Cells dt. mesenchymale Stammzellen
MSPs	muscle side populations dt. Seitenpopulation der Muskulatur
MTJ	Myotendinous Junction dt. Myotendinöse Verbindung
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor-kappa B
NO	Nitric oxide dt. Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs dt. Nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente
PAX7	Paired Box Transcription Factor Family 7
PBS	Phosphatebuffersolution dt. Phosphatpufferlösung
PICs	PW1+/Pax7- Interstitial Cells dt. PW1+/Pax7 - Interstitielle Zellen
PLX	Placental-Derived Adherent Mesenchymal Stromal Cells
PMSCs	Placental-Derived Mesenchymal Stem Cells dt. Mesenchymale Stammzellen aus der Plazenta
RICE	Rest, Ice, Compression, Elevation dt. Ruhe, Kühlung, Kompression, Hochlagerung
ROI	Region Of Interest dt. Region des Interesses

SD	Standard Deviation dt. Standardabweichung
slowMHC	slow Myosin Heavy Chain dt. langsame schwere Ketten des Myosins
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
TGF- β	Transforming Growth Factor beta dt. transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF- α	Tumor necrosis Factor alpha dt. Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor dt. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WJMSCs	Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells dt. Mesenchymale Stammzellen aus der Wharton-Sulze

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Ratten auf die einzelnen Versuchsgruppen mit Angabe der Zellzahl der transplantierten Zellen	36
Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihe	37
Tabelle 3: Expressionsmuster der PLX-Zellen im Vergleich zu BMMSCs	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zelluläre Antwort in zeitlicher Relation zum Muskeltrauma und der Regeneration in den ersten 14 Tagen	17
Abbildung 2: Die Nachweisbarkeit der löslichen Faktoren in zeitlicher Relation zum Muskeltrauma und der Regeneration in den ersten 14 Tagen	17
Abbildung 3: In vivo Darstellung des präparierten M. gastrocnemius, M. soleus, Achillessehne, der Gefäß-Nerven-Insertion sowie Traumaregion	39
Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Muskelkraft-Messanlage.....	41
Abbildung 5: Die Transplantation von PLX-Zellen verbessert die Muskelkraft bei Fast-Twitch-Stimulation unabhängig vom Transplantationszeitpunkt	59
Abbildung 6: Die verzögerte Transplantation von PLX-Zellen verbessert die Kraft bei tetanischer Stimulation vier Wochen nach dem Trauma signifikant	60
Abbildung 7: In beiden Stimulationsmodi besteht kein signifikanter Kraftunterschied in Abhängigkeit vom Transplantationszeitpunkt.....	61
Abbildung 8: Repräsentativer Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt des M. soleus eines therapierten Tiers vier Wochen nach Transplantation	62
Abbildung 9: Darstellung von regenerierenden Muskelfasern vier Wochen nach Transplantation.....	63
Abbildung 10: Repräsentativer Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt des M. soleus eines Tiers einer Kontrollgruppe	64
Abbildung 11: Gefäßdarstellung des M. soleus durch eine immunhistochemische Reaktion mit FVIII vier Wochen nach Transplantation von PLX-Zellen	65
Abbildung 12: Gefäßdarstellung des M. soleus eines Kontrolltiers durch eine immunhistochemische Reaktion mit FVIII	66
Abbildung 13: Exemplarisches Granulom in einem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt des M. soleus eines mit PLX-Zellen therapierten Tiers	67
Abbildung 14: Dasselbe Granulom wie in Abbildung 13. a) in der T-Zellreaktion und b) in der CD68-positiven Reaktion der Gewebsmakrophagen	67
Abbildung 15: Signifikant mehr fastMHC-positive Muskelfasern bei verzögerter Transplantation.....	69
Abbildung 16: Keine Reduktion der Fibrosefläche nach PLX-Zelltransplantation.....	70
Abbildung 17: Die Transplantation von PLX-Zellen führt zu einer erhöhten Gefäßdichte...	72
Abbildung 18: PLX-Zelltransplantation führt zu einer vermehrten lokalen T-Zell-Antwort	73

Abbildung 19: Signifikant mehr Gewebemakrophagen bei verzögerter Transplantation..... 75

1. Zusammenfassung

Einleitung: Skelettmuskeltraumata bei Unfällen oder Operationen können zu einer dauerhaften Funktionseinschränkung der Muskulatur führen. Die intrinsische Regenerationskapazität der Skelettmuskulatur ist beschränkt und kann im Besonderen bei ausgeprägten Verletzungen oder Gewebeverlust keine vollständige Wiederherstellung der Muskelmasse und Funktionalität garantieren. Bisherige Therapiestrategien unterstützen die Restitutio nur unzureichend. Bereits in vorangegangenen Studien konnte der positive Effekt von autologen, mesenchymalen Stammzellen auf die Muskelregeneration der Ratte belegt werden. Für eine suffiziente klinische Anwendung ist jedoch die ständige Verfügbarkeit der Zellen eine Grundvoraussetzung. Hier stellen postpartal aus der Plazenta gewonnen PLX-Zellen eine mögliche und effektive Option dar. In dieser Arbeit soll der Einfluss von menschlichen PLX-Zellen auf die Muskelregeneration der Ratte untersucht werden.

Methodik: Für den Versuch wurden 40 Sprague Dawley Ratten in zwei Therapie- und zwei Kontrollgruppen unterteilt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe erhielten alle Tiere eine Punktion beider Tibiae mit Extraktion von Knochenmark und 14 Tage später die Traumatisierung des linken Musculus soleus unter Aussparung der Gefäß- und Nerveninsertion. Bei je einer Therapie- und Kontrollgruppe wurde unmittelbar nach Trauma die Transplantation der $2,5 \times 10^6$ PLX-Zellen oder von 20 μ l einer 0,9%igen NaCl-Lösung ohne Zellen durchgeführt. Die beiden anderen Gruppen erhielten die Transplantation sieben Tage später. Vier Wochen nach Trauma erfolgte die Kraftmessung in Fast-Twitch- und tetanischer Stimulation *in vivo* sowie die histologische Auswertung aller Gruppen.

Ergebnisse: Die sofortige Transplantation der PLX-Zellen führte zu einer signifikanten Verbesserung der Kraft für die Fast-Twitch-Stimulation ($p=0,02$), jedoch nicht bei tetanischer Stimulation ($p=0,18$). Nach verzögerter Transplantation war die Kraft sowohl bei Fast-Twitch- ($p=0,03$), als auch bei Tetanie-Stimulation ($p=0,04$) signifikant verbessert. Zwischen den Therapiegruppen bestand kein signifikanter Unterschied bei Fast-Twitch- ($p=0,6$) oder Tetanie-Stimulation ($p=0,9$). Die histologische Auswertung ergab sowohl für die sofortige ($p=0,007$), als auch die verzögerte ($p=0,002$) Transplantation eine signifikant erhöhte Gefäßdichte. Die T-Zellzahl war ebenso für die sofortige ($p=0,0002$) und verzögerte ($p=0,001$) Transplantation signifikant erhöht. Gewebsmakrophagen waren nach verzögerter Transplantation ($p=0,016$), jedoch nicht nach sofortiger Transplantation ($p=0,054$) vermehrt

nachzuweisen. Der Anteil der Fast Myosin Heavy Chain-positiven Muskelfasern war signifikant erhöht nach einer verzögerten Transplantation ($p=0,04$). Nach sofortiger Transplantation sahen wir keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0,33$).

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die sofortige als auch die verzögerte Transplantation von menschlichen PLX-Zellen in den traumatisierten Rattenmuskel einen positiven Effekt auf die Muskelregeneration hat. Somit stellen PLX-Zellen eine ständig verfügbare Therapieoption dar. Eine Translation in die klinische Anwendung sowie eine weitere Differenzierung der Wirkungsweise ist in weiteren Studien zu untersuchen.

2. Abstract

Introduction: Skeletal muscle trauma caused by accidents or surgery may lead to a permanent impaired muscle function. The intrinsic regenerative capacity of skeletal muscle is very limited and therapeutic strategies used so far are insufficient. By previous studies a positive effect of autologous mesenchymal stem cells on the regeneration of damaged skeletal muscle in rats was shown. For a wider clinical approach and availability on demand an off-the-shelf product is needed since harvesting and expanding the cells is rather time consuming. PLX-cells harvested from human placenta seem to be an alternate therapeutic option. The goal of this study was to investigate the effects of human PLX-cells on the skeletal muscle regeneration in rats.

Methods: For this study 40 Sprague Dawley rats were divided into two therapy groups and two sham groups. For a better comparability to previous studies all rats underwent a cannulation of both tibiae and bone marrow extraction. 14 days after, the left soleus muscle received an open crush trauma while preserving the insertion of the neurovascular bundle. One therapy and one sham group obtained their transplantation with 2.5×10^6 PLX-cells or 20 μ l saline immediately after the trauma. The other groups underwent transplantation seven days later. Four weeks after the trauma *in vivo* functional muscle testing and a histological analysis were performed.

Results: After immediate application of PLX-cells a significant improvement in muscle force for fast-twitch stimulation ($p=0,02$) but not for tetanic stimulation ($p=0,18$) was observed. For groups that received a delayed transplantation muscle force was significantly higher for both fast-twitch ($p=0,03$) and tetanic stimulation ($p=0,04$). Between the therapy groups there was

no significant difference after fast-twitch ($p=0,6$) or tetanic stimulation ($p=0,9$). The histological analysis showed a significantly higher vessel density after immediate ($p=0,007$) and delayed ($p=0,002$) transplantation. Moreover, the T-cell-count was significantly higher for immediate ($p=0,0002$) and delayed ($p=0,001$) application of PLX-cells. For the delayed administration a significant difference for tissue macrophages ($p=0,016$) and Fast Myosin Heavy Chain-positive muscle fibers ($p=0,014$) was observed. Groups that underwent an immediate application of PLX-cells showed no significant difference in tissue macrophages count ($p=0,054$) and fast Myosin Heavy Chain-positive muscle fibers ($p=0,33$).

Conclusion: Hereby the positive effects of an immediate and delayed application of human PLX-cells after trauma of skeletal muscle in rats was shown. Therefore PLX-cells seem to be a promising and constantly available therapeutic option. Further investigations on the effects and the clinical utilization are necessary.

3. Einleitung

3.1. Skelettmuskulatur und ihr funktioneller Aufbau

Die Skelettmuskulatur ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Organismus und dient in ihrer Funktion zur Fortbewegung und Stabilisation des Körpers. Umgeben ist ein Muskel von bindegewebigem Epimysium, welches überwiegend aus Kollagen Typ I besteht und dessen Ausläufer mehrere Muskelfasern als Perimysium umschließen. Dieses besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ III und V und unterteilt den Muskel in Muskelfaserbündel. Das Endomysium, welches vorwiegend aus Kollagen Typ III aufgebaut ist, umgibt eine Muskelfaser. Diese ist das grundlegende, strukturelle Element des Muskels. Sie entsteht durch die Fusion mehrerer Myozyten. Umgeben von Sarkolemm bilden darin mehrere Myofibrillen eine strukturelle Einheit. Jede Myofibrille wiederum entsteht aus dem Zusammenschluss mehrerer weiterer Untereinheiten, den Sarkomeren. Aktin und Myosin bilden darin die strukturgebende Einheit und ermöglichen auf Grund ihrer Vernetzung und Wechselwirkung die Kontraktibilität des Muskelapparats. Die Innervation und Blutversorgung der meisten Muskeln erfolgt über die Area nervovascularia, über welche Nerven, Blut- und Lymphgefäße hilusartig einsprossen [1, 2].

Die Fasern der quergestreiften Skelettmuskulatur können in langsame (Typ I) und schnelle (Typ II) Fasern unterschieden werden. Muskelfasern vom Typ I weisen dabei einen hohen Anteil an Myoglobin, eine reiche Blutversorgung und viele Mitochondrien auf. Die Energiegewinnung findet überwiegend mittels oxidativer Phosphorylierung statt. Die schnell zuckenden Muskelfasern vom Typ II sind dicker und mit weniger Mitochondrien ausgestattet. Der Hauptanteil der benötigten Energie wird über die anaerobe Glykolyse bereitgestellt. Beide Fasertypen können anhand der Isoformen der schwereren Kette des Myosins und Enzymen des Energiemetabolismus in weitere Untergruppen aufgeteilt werden [3-5].

3.2. Muskelverletzungen

Die Skelettmuskulatur macht 40 bis 50 % der Masse des menschlichen Körpers aus und ermöglicht unter anderem die Fortbewegung und Stabilisation des Körpers [6]. Verletzungen der Muskulatur sind daher ein ernst zu nehmendes Problem, vor allem in Anbetracht der Häufigkeit ihres Auftretens. So zeichnen sie für 35 – 55% der langwierigen Sportverletzungen

verantwortlich, wobei über 90% dieser Verletzungen Prellungen und Zerrungen darstellen [7-9]. Die traumatische Kompression gegen eine härtere Struktur führt bei der Kontusion zur Schädigung von Gefäßen und Muskelfasern [2, 10]. Die aktive oder passive Überschreitung der Muskeldehnbarkeit ist die Ursache für eine Muskelzerrung und kann im äußersten Fall bis zur ausgedehnten Zerreißen der Muskelfasern führen [9]. Häufige Lokalisation hierfür ist der Muskelsehnenübergang mehrgelenkiger Muskeln [2]. Zu den gravierenden Verletzungen, welche mit einer Kontinuitätsunterbrechung des Muskels einhergehen können, zählen Stich- und Schnittwunden. Aber auch Unfälle mit Fahrzeugbeteiligung und Verletzungen in kriegerischen Auseinandersetzungen durch Schusswaffen oder Granaten können zu einem Volumenverlust führen [11]. Bei geschlossenen Kontusionsverletzungen addiert sich die Gefahr der Ausbildung eines Kompartmentsyndroms. Durch das begleitende Ödem bedingt, übersteigt hierbei der intramuskuläre Druck den Kapillardruck. Dies führt zu einer Minderdurchblutung der distal gelegenen Areale und im schlimmsten Fall zur Nekrose und Amputation der Extremität [12].

Über die akzidentellen Ursachen hinaus führen auch iatrogene Eingriffe zur Schädigung von Muskulatur. Im Besonderen im Bereich der Endoprothetik gehören Muskel- und Nervenschädigungen trotz minimalinvasiver Zugangswege zu den möglichen, unerwünschten Nebenwirkungen [13]. Die dadurch bedingte Kraftminderung kann zur Abnahme der Knochendichte und somit einer verminderten Lebensdauer der Prothese führen [14]. Bewusst durchgeführt wird die Resektion von gesundem Muskelgewebe bei der chirurgischen Entfernung invasiv wachsender Tumore. Hinzu kommt die bereits durch den Tumor betroffene Muskulatur [15]. Embolien und operationsnotwendige Blutsperrungen können auf Grund einer Ischämie zum Untergang und Funktionsverlust von Muskelfasern führen [16].

Die genannten Verletzungen und Erkrankungen verursachen Volumen- und Kraftverlust, Atrophie, Kontrakturen sowie Schmerzen und gehen mit einer erhöhten Wiederverletzungsgefahr einher [17]. Die sich daraus ergebende teilweise oder vollständige Immobilisation der Patienten erhöht das Risiko des Auftretens von Infektionen, Pneumonien, thrombotischen oder embolischen Ereignissen und kann somit im schlimmsten Fall zum Tode führen [18].

Muskelverletzungen werden unter anderem nach der Klassifikation von Müller-Wohlfahrt et al. eingeteilt. Diese Konsensus-Klassifikation unterscheidet direkte Muskelverletzungen, zu denen Kontusion und Laceration gezählt werden, von indirekten Verletzungen. Letztere werden noch weiter unterteilt. Die ermüdungsbedingte Muskelverhärtung (Typ 1A), die Delayed-Onset Muscle Soreness („Muskelkater“, Typ 1B) sowie die spinal (Typ 2A) und

muskulär („Muskelzerrung“, Typ 2B) vermittelte neuromuskuläre Schädigung resultieren aus einer funktionellen Schädigung. Das heißt, dass zu diesen Schädigungen kein Korrelat in Ultraschall oder MRT gesehen wird. Zu den strukturellen Muskelschädigungen, welche mit makroskopischen Hinweisen in Ultraschall oder MRT einhergehen, werden der Muskelfaserriss (Typ 3A), der Muskelbündelriss (Typ 3B) und der (Sub-)totale Muskelriss bzw. der Austriss der Sehne am Knochen-Sehnen-Übergang (Typ 4) gezählt [19].

3.3. Muskelregeneration

Der natürliche Regenerationsprozess folgt einem gut untersuchten Muster von Destruktion/Inflammation (I), Reparation (II) und Wiederherstellung/Remodellierung (III) [6].

I Destruktion/Inflammation: In der ersten Phase der Regeneration, direkt nach dem Trauma, kommt es zum Untergang von Muskelfaseranteilen. Um dies lokal zu begrenzen bilden sich Kontraktionsbänder aus dem Zytoskelett [20]. Des Weiteren erreichen, durch Inflammation und die Schädigung der vorhandenen Blutgefäße bedingt, unter anderem Makrophagen, T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten das Traumaareal [21-23]. Neben der Phagozytose des nekrotischen Zelldetritus sind die Makrophagen an der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt. Die Freisetzung von Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) durch M1-Makrophagen wirken als pro-inflammatorische Mediatoren und haben somit einen proliferationsfördernden Effekt auf die Satellitenzellen. Im weiteren Verlauf vollzieht sich ein Phänotypenwechsel der Makrophagen von M1- zu M2-Zellen, welche die Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) sezernieren und somit anti-inflammatorisch wirken und zur Differenzierung der Myoblasten beitragen [24, 25]. Ebenso untersucht ist die Beteiligung der T-Lymphozyten. So wird der beschriebene Phänotypenwechsel der Makrophagen von den CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (Treg) beeinflusst [26]. Die CD8⁺ T-Zellen scheinen hierbei über die Expression des Chemokininligand 2 (CCL2) die Migration der Makrophagen zu unterstützen [27]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowohl einen Effekt auf die frühe Aktivierung myogener Vorläuferzellen hat als auch als Botenstoff in der Regulation der inflammatorischen Antwort fungiert. So führte eine Depletion der iNOS zu einer geringeren Anzahl und kleineren Größe regenerierender Muskelfasern und zu einer verlängerten Inflammation [28]. Es lässt sich zeigen, dass bereits in dieser Phase die Regeneration der Muskulatur beginnt, jedoch noch durch das Hämatom

und die damit verbundene Bildung von Granulations- und darauffolgendem Narbengewebe eingeschränkt wird [2, 20].

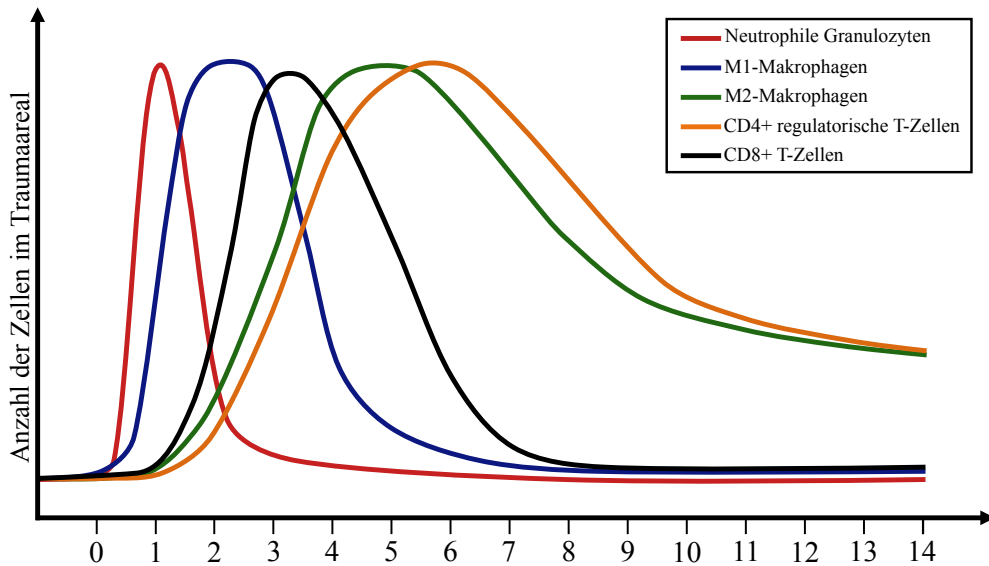


Abbildung 1: Die zelluläre Antwort in zeitlicher Relation zum Muskeltrauma und der Regeneration in den ersten 14 Tagen.

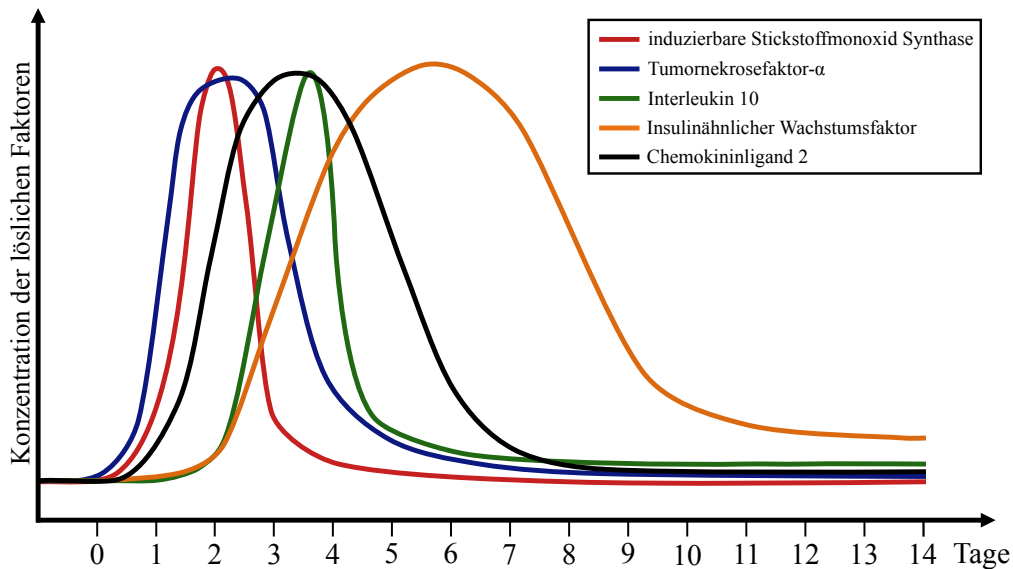


Abbildung 2: Die Nachweisbarkeit der löslichen Faktoren in zeitlicher Relation zum Muskeltrauma und der Regeneration in den ersten 14 Tagen.

Abbildungen 1 und 2 zeigen den zeitlichen Verlauf der lokalen Konzentrationen einer Auswahl der löslichen Faktoren und Zellen, die an der Muskelregeneration beteiligt sind, in den ersten 14 Tagen nach dem Trauma. Gut nachvollziehen lässt sich hier der Phänotypenwechsel der M1- und M2-Makrophagen unter Beteiligung der T-Zellen, sowie die zeitliche Abfolge der löslichen Faktoren [29].

II Reparatur: Mit einem fließenden Übergang spricht man ab 7-10 Tagen nach dem Trauma von der Phase der Reparatur. Der Zelldetritus wird abgeräumt und die Regeneration erreicht um den 14. posttraumatischen Tag ihren Höhepunkt. Neben der forcierten Einsprossung neuer Kapillaren kommt es dabei zu Rekrutierung sowie gegebenenfalls Fusionierung und Differenzierung der an der Regeneration beteiligten Zellen. [2, 6, 7, 29]. Geschädigtes Muskelgewebe besitzt die Fähigkeit zur Regeneration. Jedoch sind die Kerne der Muskelzellen postmitotisch und können sich folglich nicht mehr teilen, um an diesem Prozess teilzunehmen. Zu einem großen Teil geht die Regenerationsfähigkeit der Muskulatur daher von gewebespezifischen, mononukleären Satellitenzellen aus, welche ihren Sitz zwischen Sarkolemm und Basallamina der einzelnen Muskelfasern haben [30, 31]. Wachstumsfaktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF), und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), welche im Zuge der Inflammation und des Traumas freigesetzt werden, aktivieren diese myogenen Vorläuferzellen [32-35]. Die Satellitenzellen proliferieren durch asymmetrische Teilung in einen Myoblasten und eine Satellitenzelle, welche weiterhin die Fähigkeit zur Teilung besitzt und somit das Zellreservoir aufrecht erhält [36]. In der Folge können die entstandenen Myoblasten direkt mit den geschädigten Muskelfasern fusionieren oder sie bilden zunächst neue mehrkernige Muskelzellen, um sich im weiteren Verlauf mit den ortsständigen Fasern zu vereinigen [37, 38]. Darüber hinaus wird vermutet, dass verschiedene Subpopulationen von Satellitenzellen existieren und sich in ihrem Reaktionsmuster auf ein Trauma unterscheiden. So werden Stammsatellitenzellen zunächst zur Proliferation angeregt, wohingegen determinierte Satellitenzellen direkt in Myoblasten differenzieren. Dies kann auch Ausdruck eines unterschiedlichen Differenzierungsgrades sein [36, 39, 40]. Eine weitere mögliche Unterscheidung wird anhand der Proliferationsgeschwindigkeit im Bezug zu Fusionscharakteristika getroffen. So fusionieren sich schnell teilende Satellitenzellen mit bereits differenzierten Muskelfasern und langsam proliferierende Satellitenzellen bevorzugt miteinander [41]. Weitergehend wird vermutet, dass die Proliferationsgeschwindigkeit Aufschluss über das Schicksal der Satellitenzellen geben kann. Schnell proliferierende Zellen führen zu einer größeren Anzahl von myogen differenzierten Zellen. Hingegen weisen Satellitenzellen, welche sich langsam

teilen, ein hohes und langfristigeres Selbsterneuerungspotential auf. Letztere machen dabei den kleineren Anteil am Zellpool aus [42, 43]. Eine weitere Gruppe lokaler Zellen, welche an der Regeneration der Skelettmuskulatur beteiligt sind, stellen die aus dem Muskel abgeleiteten Stammzellen dar [44, 45]. Zu dieser heterogenen Zellpopulationen werden Mesangioblasten, Seitenpopulation der Muskulatur (MSPs), PW1+/Pax7- interstitielle Zellen (PICs), SK34-Zellen sowie langsam anhaftende Stammzellen (SASCs) gezählt. Sie besitzen die Fähigkeit zur myogenen Differenzierung und nehmen somit direkt an der Regeneration der geschädigten Muskulatur teil [46-53]. Neben den genannten ortsständigen Fasern nehmen auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark (BMMSCs) an dem Regenerationsprozess teil [54, 55]. Diese werden auf Grund des traumatischen Reizes rekrutiert und wandern daraufhin in den Bereich des geschädigten Muskels ein. Jedoch ist die Beteiligung der mesenchymalen Stammzellen als gering einzuschätzen [56, 57]. Zumeist werden die Zylinder vorhandener Basallaminae als Leitstruktur der Einsprossung genutzt. Anhand dieser nähern sich die regenerierenden Muskelfasern beidseits des Granulations- und Narbengewebes einander an und verankern sich im Verlauf mittels myotendinöser Verbindungen (MTJ), um so die Übertragung der Kontraktionskraft sicher zu stellen [58, 59].

III Wiederherstellung/Remodellierung: Die dritte Phase der Regeneration, welche bis zu vier Wochen andauern kann, ist geprägt von der endgültigen Differenzierung und Ausreifung der Muskelfasern, sowie der nervalen Reinnervation und dem Abschluss der Revaskularisierung [2, 6]. Die Aussprossung neuer Kapillaren in den geschädigten Muskel beginnt bereits circa vier bis fünf Tage nach dem Trauma [60, 61]. Neben der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen unterstützen die Endothelzellen die Regeneration auch durch die Mobilisation inflammatorischer Zellen und die Freisetzung von Zytokinen wie zum Beispiel dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) [62, 63].

Trotz dieser ausgeprägten Regenerationskapazität der Skelettmuskulatur ist selbst bei kleinen Verletzungen eine vollständige Wiederherstellung von Funktion und Kraft kaum zu erreichen [6, 58]. Ein limitierender Faktor der vollständigen Muskelregeneration ist die Entwicklung von Narbengewebe. Nach Schädigung des Muskels produzieren Myofibroblasten Fibronectin und Tenascin C und im weiteren Verlauf Kollagen III und vor allem Kollagen I [6, 64]. Das resultierende Narbengewebe stellt ein mechanisches Hindernis des Regenerationsprozesses dar und führt über eine verminderte Elastizität zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für erneute Verletzungen [2, 6]. Hinzu kommt, dass die Quantität der zur Verfügung stehenden Satellitenzellen, welche den größten Teil der regenerativen Kapazität ausmachen, mit dem

Alter abnimmt. Im Besonderen chronische De- und Regenerationsprozesse, wie sie zum Beispiel bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne auftreten, erschöpfen den Zellpool vorzeitig [65, 66]. Diese Feststellungen führen zu dem Wunsch die natürlichen Regenerationsprozesse iatrogen zu unterstützen, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

3.4. Therapie

3.4.1. Konventionelle Therapie

In der Therapie der Skelettmuskelverletzungen existieren verschiedene therapeutische Ansätze. Sehr häufig und im Besonderen bei leichten Verletzungen wird das RICE-Prinzip (Rest, Ice, Compression, Elevation) angewandt [2, 67]. Bei diesem leicht durchzuführenden Therapieregime wird schnellstmöglich nach dem Trauma mit der Ruhigstellung des verletzten Bereichs begonnen, um das Granulationsgewebe so weit ausreifen zu lassen, dass es der Zugbelastung durch die Muskelkontraktion widerstehen kann. Frühzeitige Rerupturen sollen so vermieden werden [60]. Nach einer initialen Phase der Ruhigstellung wird frühzeitig mit der Mobilisation begonnen, da diese sowohl die Angiogenese als auch das zielgerichtete Wachstum der regenerierenden Muskelfasern begünstigt [60, 68]. Die unterstützende Kühlung wird unterschiedlich bewertet. Zum einen konnte eine Reduktion der mikrovaskulären Dysfunktion und Nekrosebildung beobachtet werden [69]. Jedoch zeigte sich zum anderen, dass die supprimierte Inflammation mit einer erhöhten Bildung von Bindegewebe einhergeht und die Aktivierung der Satellitenzellen verzögert wird [70]. Zur positiven Wirkung der Kompressionstherapie gibt es keine belastbaren Daten. Zusätzlich muss die entstehende Verringerung des intramuskulären Blutflusses im Bezug zum Risiko der Ausbildung eines Kompartmentsyndroms kritisch betrachtet werden [71]. Die Hochlagerung der traumatisierten Extremität basiert auf einem ähnlichen Prinzip. Der arterielle Zustrom wird verringert und gleichzeitig der venöse Rückstrom forciert, um so der Ausbildung eines lokalen Ödems entgegen zu wirken [20]. Die regenerativen Ergebnisse der alleinigen Anwendung des RICE-Regimes sind jedoch als insuffizient zu bewerten.

3.4.2. Medikamentöse Therapie

Zur Unterstützung der Regeneration nach Muskeltrauma kommen darüber hinaus nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) zur Anwendung. Diese unterdrücken die gesteigerte Prostaglandinsynthese über die Hemmung der Cyclooxygenase. Neben der Linderung des Schmerzes und einer Verringerung des Begleitödems kommt es zu einer Abschwächung der inflammatorischen Reaktion, wodurch sich ein Benefit für die Muskelregeneration erhofft wird [72, 73]. In der Frühphase nach dem Trauma konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von NSAIDs weder einen negativen Einfluss auf die Proliferation der Satellitenzellen oder Kontraktionsfähigkeit der Muskulatur hat noch die Bildung von Muskelfasern oder Kapillaren behindert [7, 74, 75]. Jedoch wurde bisher kein sicherer Nachweis eines therapeutischen Vorteils durch die unterstützende Therapie mit NSAIDs erbracht. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass NSAIDs die muskuläre Regeneration sogar verzögern können [72]. Im Besonderen die langfristige Anwendung sollte daher kritisch evaluiert werden.

Als obsolet angesehen werden kann die Anwendung von Steroiden, welche ebenso auf Grund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften genutzt wurden. Trotz ihrer initial unterstützenden Wirkung konnte gezeigt werden, dass die Steroide zu einer Verminderung der biomechanischen Belastbarkeit und Kontraktionskraft führen [7, 76, 77].

Zu den nicht-invasiven Therapieansätzen gehört auch die hyperbare Sauerstofftherapie. Dabei wird mit zwei- bis dreifachem Atmosphärendruck 100% Sauerstoff angereichert, um so die Vaskularisation und Muskelregeneration nach einem Trauma positiv zu beeinflussen [68]. In Studien mit myotoxischen und dehnungsbedingten Traumata konnte eine Steigerung der Maximalkraft nachgewiesen werden [78, 79]. Eine klare Empfehlung kann auf Grund von fehlenden klinischen Daten und der wenigen bekannten Studien nicht ausgesprochen werden. Ähnlich verhält es sich mit der Applikation von therapeutisch genutztem Ultraschall. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Satellitenzellproliferation erhöht wird, jedoch konnte eine Verbesserung der Regeneration oder Muskelkraft nicht objektiviert werden [80].

3.4.3. Chirurgische Intervention

Der Großteil der Muskelverletzungen wird konservativ therapiert, jedoch gibt es Indikationen bei der ein chirurgisches Vorgehen sinnvoll sein kann. Im Besonderen bei ausgedehnten oder kompletten Muskelrissen ist die chirurgische Intervention ebenso wie bei der Ausräumung

großer Hämatome indiziert [81-83]. Jedoch ist angesichts des histologischen Aufbaus eines Muskels die Rekonnektion im Muskel-Sehnen-Übergangsbereich erfolgsversprechender, da hier die Muskelfaszien, welche via Naht verbunden werden, deutlich kräftiger sind [2].

3.4.4. Experimentelle Therapieansätze

3.4.4.1. Antifibrotische Therapie

Wie zuvor erwähnt ist die überschießende Bildung von fibrotischem Gewebe ein limitierender Faktor für die vollständige muskuläre Regeneration. Folglich scheint die Reduktion der Fibrose erstrebenswert. Im Zentrum der bisherigen Forschung stand die Modulation des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). So hemmte Suramin in-vitro die Proliferation von Fibroblasten durch die Antagonisierung von TGF- $\beta 1$. Diese Ergebnisse konnten in-vivo bestätigt werden und eine verbesserte Kontraktionskraft erreicht werden [84-86]. Ein weiterer Ansatz besteht in der Applikation von Decorin, welches ebenso die Bildung von Fibrose über die Inhibierung von TGF- $\beta 1$ reduziert. Ähnliche Erfolge konnten mit der Anwendung von Angiotensin-II-Antagonisten erreicht werden [87-89]. Klinische, belastbare Ergebnisse zur Anwendung gibt es derzeit nicht.

3.4.4.2. Zelltherapie

Im Bereich regenerativer Therapien haben zellbasierte Therapieansätze in den letzten Jahrzehnten deutlich an Aufmerksamkeit gewonnen. Im Bereich der Muskelregeneration waren die Satellitenzellen für lange Zeit die Hoffnungsträger. Die regenerative Kapazität ist – wie oben beschrieben – bekannt und gut erforscht. Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass bereits eine einzelne, transplantierte Satellitenzelle zur Entstehung neuer Muskelfasern und Satellitenzellen beitragen kann [90]. Jedoch sind die Limitationen des Einsatzes ausgeprägt. Der Zellpool stellt sich als äußerst heterogen dar, weist ein mangelndes Überleben im Empfängergewebe auf und die Kultivierung ex-vivo reduziert das regenerative Potential [91-93]. Auf der Suche nach weiteren Zelllinien, welche die Regeneration fördern können, sind die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in den Fokus gerückt und sollen im Weiteren ausführlicher besprochen werden.

3.5. Stammzellen in der Geweberegeneration

3.5.1. Mesenchymale Stammzellen

Die erstmalig in den 1960er Jahren von Friedenstein et al. beschriebenen MSCs werden aus einer Vielfalt an Quellen gewonnen. In adultem Gewebe können diese unter anderem aus der Leber, der Zahnpulpa, Fettgewebe, peripher gewonnenem Blut, dem Ligamentum flavum, Endometrium und dem Knochenmark isoliert werden [94-99]. Als fetale Quellen stehen darüber hinaus das Fruchtwasser, Chorionzotten, die Nabelschnur und deren Blut, die Wharton-Sulze und Plazenta zur Verfügung [100-105]. Als multipotente Zellen sind MSCs mit dem Potential zur Adipogenese, Chondrogenese, Fibrogenese, Osteogenese und Myogenese ausgestattet [96]. Die Quelle der MSCs scheint dabei einen Einfluss auf die Eigenschaften der Zellen zu haben. Hass et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass MSCs, welche aus Plazenta und Nabelschnurgewebe gewonnen wurden, in vitro eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu MSCs aus adulten Quellen aufwiesen. Insbesondere unter hypoxämischen Bedingungen wurde dieser Effekt deutlich [106]. Unterschiede zwischen den aus den verschiedenen Quellen gewonnenen MSCs bestehen aber nicht nur in der Proliferationsrate, sondern auch der Fähigkeit zur Differenzierung. So haben MSCs aus Knochenmark und Fettgewebe ein erhöhtes Potential zur osteoblastären Entwicklung [107, 108]. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Nutzbarkeit der MSCs hat, scheint das Alter des Spenders zu sein. Zhou et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass MSCs, welche aus dem Knochenmark gewonnen wurden, in Abhängigkeit des Spenderalters, eine bis zu 1,7x-fach längere Verdopplungszeit hatten. Auch fanden sich bei älteren Spendern mehr apoptotische Zellen und die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten nahm ab [109].

Da MSCs nicht als absolut homogen anzusehen sind, ist zu vermuten, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen mit gering unterschiedlichen Zellen arbeiten [110]. Zur genaueren Charakterisierung hat die „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ Minimalkriterien definiert. Demnach müssen MSCs in Kulturbedingungen an Plastikoberflächen adhärent sein. Sie müssen zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten in der Lage sein. Und in der Durchflusszytometrie müssen 95% der Zellpopulation positiv für die Marker CD 105, CD73 und CD90, sowie negativ für humanes Leukozytenantigen (HLA) Klasse 2 Oberflächenmarker, CD45 (Leukozyten), CD34

(Hämatopoetische Progenitorzellen und Endothelzellen) und entweder für CD11b oder CD14 (Makrophagen und Monozyten) sowie für CD19 oder CD79a (B-Zellen) [111, 112].

Zur Forschung wurden die MSCs in der Vergangenheit bevorzugt aus dem Knochenmark gewonnen [113]. In etwa eine MSC kommt hier auf 10000 kernhaltige Zellen im Knochenmark. Bei 2,25 – 22 Millionen kernhaltigen Zellen pro Milliliter ist darüber hinaus eine bis zu 50-fache Verdopplung der Zellpopulation in-vitro möglich. [114-117]. Inzwischen finden andere Gewebe zur Gewinnung von MSCs breite Anwendung, so zum Beispiel Fettgewebe. Vorteilhaft ist hier im Besonderen die weniger invasive Verfügbarkeit. Das Fettgewebe kann unter anderem bei Liposuktionen gewonnen werden. Dies hat unter anderem den Vorteil, dass eine deutlich größere Menge an MSCs gewonnen werden kann. Nachteilig ist jedoch, dass diese aus dem Fettgewebe gewonnen MSCs (ADMSCs) durchschnittlich eine zweifach so lange Verdopplungszeit haben, wie die Zellen aus dem Knochenmark. Und auch das osteogene und chondrogene Potential ist im Vergleich geringer [118].

In verschiedenen Studien konnte das Differenzierungspotential von MSCs zu u.a. Kardiomyozyten, Hepatozyten und Pankreaszellen bereits nachgewiesen werden. Ob die MSCs im Empfänger differenzieren, fusionieren oder beides tun bleibt diskutabel [103]. Im Mausmodell mit einem Gendefekt der Fumarylacetoacetase gelang Spitkovsky et al. zum Beispiel die Wiederherstellung der Leberfunktion und es konnte eine Fusion der transplantierten BMMSCs mit Hepatozyten nachgewiesen werden [119]. In einer mit Allylalkohol behandelten Rattenleber wurde eine Differenzierung der transplantierten BMMSCs von Vassilopoulos et al. beobachtet [120]. In beiden Fällen hatte die Applikation der BMMSCs einen positiven Effekt auf die Regeneration. Auch für die ADMSCs wurde ein positiver Effekt auf die Regeneration von Lebergewebe im Rahmen einer Leberzirrhose beschrieben. So wird vermutet, dass die Produktion von Zytokinen wie HGF und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) dazu beitragen [121]. Für MSCs aus der Zahnpulpa gelang Ishkitiev et al. der Nachweis, dass in vitro eine Kultivierung der MSCs zu hepatozyten-ähnlichen Zellen möglich ist. Okada et al. zeigten, dass die Differenzierungskapazität mit der der BMMSCs zu vergleichen ist. Nachteilig ist hierbei jedoch die Ressourcenmenge und Verfügbarkeit zu sehen [122, 123]. Ein weiteres Forschungsfeld, in welchem MSCs zur Anwendung kommen, sind Knochen- und Knorpeldefekte. So scheint die Applikation von autologen Knochenmarkszellen in der

Osteonekrose des Femurkopfes vorteilhaft für den Heilungsprozess zu sein [124]. Auch im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls wurden BMMSCs als möglicher progenerativer Faktor identifiziert. Bang et al. transplantierten die autologen Zellen intravenös und konnten im Verlauf eines Jahres eine signifikante Verbesserung der neurologischen Symptomatik im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten [125]. ADMSCs weisen ebenso eine regenerative Kapazität bei neurologischen Strukturdefekten auf. Im Besonderen bei peripheren Nervenschädigungen wurde eine verbesserte Regeneration gezeigt. Beobachtet wurde dabei die Sekretion von Cytokinen wie zum Beispiel dem Brain-Derived Neutrophic Factor oder Myelin-Basischen Protein und auch die Differenzierung in Zellen mit neuronalem Phänotyp [126-128]. Im direkten Vergleich zu BMMSCs wurde kein signifikanter Unterschied der regenerativen Kapazität gesehen [129]. Auf Grund der diskutierten immunmodulatorischen Effekte der MSCs wurden Untersuchungen zu autoimmun-vermittelten Erkrankungen durchgeführt. Le Blanc zeigte, dass die Transplantation von BMMSCs mit einem Überlebensvorteil bei der steroidresistenten Graft-Versus-Host Disease einhergeht [130]. Darüber hinaus konnte für den therapierefraktären Systemischen Lupus Erythematoses ein positiver Effekt auf die Nierenfunktion und Krankheitsaktivität nachgewiesen werden, ohne dass transplantationsassoziierte Nebenwirkungen registriert wurden. Die Aussagekraft ist jedoch mit Einschränkungen zu betrachten, da es sich nicht um eine randomisierte und kontrollierte Studie handelte [131]. Aktuell ist auch die Behandlung der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) Gegenstand der Forschung. Zhang et al. applizierten MSCs aus der Wartonschen Sulze (WJMSCs) intravenös und beobachteten eine klinische Besserung sowie eine deutliche Abnahme der Serumlevel von IL-6, TNF- α und dem C-reaktiven Protein (CrP) [132]. Shu et al. führten eine randomisierte, kontrollierte Studie mit 41 Patienten durch. Nach Transplantation von aus der Nabelschnur gewonnenen MSCs wiesen auch sie eine signifikante Reduktion der Serumkonzentrationen von IL-6 und CrP nach. Darüber hinaus hatten die behandelnden Patienten einen Überlebensvorteil [133].

3.5.2. Mesenchymale Stammzellen in der Muskelregeneration

Wie bereits konstatiert ist die natürliche Muskelregeneration, im Besonderen bei ausgeprägten Traumata, insuffizient. Naheliegender ist daher der Versuch MSCs als Mediatoren einer verbesserten Regeneration nach Trauma oder anderen Muskelschädigungen einzusetzen. Weitere Forschungsfelder zum Einsatz von MSCs sind das Herzinfarktmodell und die ischämische Kardiomyopathie. Eine Verringerung der Narbenausdehnung in Bezug auf die

Gesamtmuskelmasse des Herzens und die Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion sowie der myokardialen Perfusion konnte in verschiedenen Studien erreicht werden [134, 135]. Amado et al. zeigten in ihrer Studie im Schwein, dass die Injektion von BMMSCs in den ischämisch geschädigten Herzmuskel die Narbenbildung deutlich reduzierte und zu einer annähernd normalen muskulären Funktion führte [136]. In einer weiteren Studie gelang es derselben Arbeitsgruppe nachzuweisen, dass auch innerhalb des fibrotischen Areal Muskelfasern regenerierten und die Kontraktionskraft zunahm [137]. Unterstützt wurden diese Ergebnisse unter anderem durch Zhang et al., welche im Herzinfarktmodell der Maus eine verbesserte Regeneration nachwiesen. Diesen Effekt schrieben sie der verstärkten Neovaskularisation zu [138]. Bezüglich der Anwendung im Menschen sind die publizierten Ergebnisse nicht eindeutig. Wollert et al. wiesen nach Myokardinfarkt und Transplantation von BMMSCs eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach [139]. Im Gegensatz dazu sahen Süder et al. keine Verbesserung der Ejektionsfraktion zwölf Monate nach Myokardinfarkt [140]. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Traverse et al., die nicht nur keine Verbesserung der Ejektionsfraktion sahen, sondern auch keine Reduktion der Infarktgröße [141]. ADMSCs wurden von Perin et al. zur Behandlung der chronischen, ischämischen Kardiomyopathie genutzt. Die Transplantation der ADMSCs führte zu einer Verbesserung der linksventrikulären Muskelmasse und verhinderte den Progress der klinischen Symptome signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe [142]. Gao et al. untersuchten WJMSCs und ihre Auswirkung auf die Regeneration des Myokards nach einem Myokardinfarkt. In dieser Studie verbesserte sich die Durchblutung und Ejektionsfraktion auch 18 Monate nach Infarkt und Transplantation deutlich. Transplantationsassoziierte Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet [143].

Ebenso wurden MSCs im Tiermodell als Behandlungsoptionen von Muskeldystrophien genutzt. Im Besonderen die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne wurde hier untersucht. Rodriguez et al. transplantierten menschlichen ADMSCs in *mdx* Mäuse, welche an Duchenne Muskeldystrophie litten. In mehr als 50% der Muskelfasern ließ sich anschließend humanes Dystrophin nachweisen [144]. Als Standardmodell wird der Golden Retriever mit Duchenne Muskeldystrophie genutzt. Mit einer xenogenen und intravenösen Transplantation von menschliche ADMSCs gelang es Vieira et al. nachzuweisen, dass bis zu sechs Monate nach Applikation menschliches Dystrophin in den geschädigten Muskeln vorhanden war. Darüber hinaus konnten sie die Sicherheit einer xenogenen Transplantation in nicht-immundefiziente Tiere aufzeigen [145]. Klimczak et al. führten in einer Fallstudie mit drei Patienten, welche an einer Duchenne-Dystrophie erkrankt waren, die Co-Transplantation von BMMSCs und

Stammzellen aus dem Skelettmuskel durch und beobachteten eine funktionelle Verbesserung der untersuchten Muskeln sowie eine Senkung der Kreatinkinase und pro-inflammatorischer Zytokine [146].

In der Skelettmuskulatur fanden MSCs erstmalig Anwendung in einem Cardiotoxin geschädigten Muskel der Maus. Ferrari et al. wiesen nach, dass die Transplantation von BMMSCs die Muskelregeneration verbessert [54]. Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Traumamodelle entwickelt, welche sich näher am klinischen Alltag bewegten, als die Injektion von myotoxischen Substanzen. Matziolis et al. nutzten ein offenes Quetschtrauma des M. soleus unter Aussparung der Gefäß-Nerven-Insertion in der Ratte. Die Kontraktionskraft konnte signifikant durch die autologe Transplantation von BMMSCs verbessert werden [147]. In Folgestudien konnte in unserer Arbeitsgruppe unter anderem gezeigt werden, dass die Dosis, jedoch nicht der Zeitpunkt der Applikation von MSCs entscheidend für den Therapieerfolg ist [148, 149]. Ebenso den M. soleus der Ratte untersuchten Andrade et al. in ihrem Traumamodell. Bei diesem Modell erfolgte zu Beginn, nach sieben und nach 14 Tagen die mechanische Schädigung des Muskels. Neben der verbesserten Muskelkraft, welche nach zwei und vier Wochen nach dem Trauma gemessen wurde, verzeichneten sie eine erhöhte Anzahl von gereiften Muskelzellen. In der Ausbildung des Narbengewebes war hingegen kein Unterschied zu sehen [150]. Oh et al. untersuchten die Auswirkung einer Transplantation von ADMSCs auf die Heilung der Rotatorenmanschette im Hasen und sahen eine Tendenz zur einer verbesserten Muskelkraft [151]. Ebenso genutzt wurden ADMSCs von Gumucio et al. in ihrer Studie zum Modell zur fettigen Degeneration der Rotatorenmanschette in der Ratte. Hier konnte eine signifikante Reduktion des fibrotischen Gewebes erreicht werden. Die Tendenz zur verbesserten Kontraktilität erreichte jedoch kein signifikantes Niveau [152]. Eine teilweise signifikante Verbesserung der Muskelkraft nach Transplantation von ADMSCs in den traumatisierten M. soleus der Ratte konnte von Pecanha et al. nachgewiesen werden. Diese wurde zwei Wochen nach Transplantation beobachtet. Weitere zwei Wochen später glichen sich die Ergebnisse der Muskelkraftmessung von Therapie- und Kontrolltieren wieder an [153]. Im direkten Vergleich von BMMSCs und ADMSCs zeigten beide Stammzellpopulationen ein vergleichbares Potential zur Muskelregeneration, jedoch wurde nach Transplantation der ADMSCs zusätzlich eine signifikante Reduktion des fibrotischen Areals nachgewiesen [154]. Wie bereits erwähnt, ist die Wirkungsweise der transplantierten MSCs auf die Muskelregeneration nicht abschließend geklärt. Zwar besitzen die MSCs die Fähigkeit zur myogenen Differenzierung und auch Fusionsereignisse wurden bereits beschrieben, jedoch

wird die verbesserte Regeneration verstärkt parakrinen Faktoren zugeschrieben [54, 155-160]. So wird vermutet, dass die Freisetzung von VEGF die Vaskularisation anregt und HGF die Bildung von fibrotischem Gewebe moduliert. Ebenso wird vermutet, dass die MSCs in die oben beschriebene Wirkung von Makrophagen und T-Zellen eingreifen [118,120].

3.5.3. Mesenchymale Stammzellen der Plazenta

Im klinischen Alltag wird die Plazenta zumeist als medizinischer Abfall entsorgt. Jedoch lassen sich auch aus ihr, genauso wie aus Knochenmark, Fett, Muskeln oder Blut, mesenchymale Stammzellen gewinnen [161-164]. Der praktische Vorteil ist die geringe Invasivität, da die Plazenta nach der Geburt zur Verfügung steht. Ebenso können diese plazentaren mesenchymalen Stromazellen (PMSCs) allogene und somit bei Notwendigkeit flexibel eingesetzt werden. Innerhalb der Plazenta gibt es darüber hinaus unterschiedliche Quellen der zu gewinnenden Zellen. Sie können dem Amnion und Chorion, der Dezidua oder der Nabelschnur entspringen [165, 166]. Je nach maternaler oder fetaler Herkunft ist zu vermuten, dass die PMSCs sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Papait et al. wiesen für beide Zelltypen einen immunmodulatorischen Effekt auf T-Zellen und myeloische Zellen nach. So reduzierten die fetalen und maternalen Zellen die zytotoxische Aktivität von CD4⁺ und CD8⁺-positiven Zellen und natürlichen Killerzellen, wobei die fetalen PMSCs eine größere Kapazität zur Modulation der Proliferation und Differenzierung der Immunzellen aufwiesen. Keine Unterschiede wurden gesehen bei dem Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten. Für beide Zellgruppen wurden Indikatoren gefunden, die darauf hinwiesen, dass die Differenzierung zu M1-Makrophagen reduziert und zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen unterstützt wurde. Ebenso wurde der Einfluss auf die Zytokinproduktion untersucht. Fetale und maternale Zellen reduzierten die Konzentration von Interferon gamma (INF- γ), IL-5 und TNF- α in vergleichbarer Weise. IL-17A hingegen war nur in der Kultur mit maternalen PMSCs signifikant reduziert. Von geringen Unterschieden in den immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften ist folglich auszugehen [167].

Ihre regenerativen Eigenschaften konnten die PMSCs bereits in verschiedenen Studien unter Beweis stellen. So konnte gezeigt werden, dass die Anwendung am Herzen die systolische Funktion bei ischämischer Herzinsuffizienz verbesserte. Chen et al. applizierten PMSCs nach einem iatrogenen Trauma des Herzmuskels der Maus. In der Folge beobachteten sie eine Verbesserung der systolischen Pumpfunktion sowie eine Reduktion der Fibrose. Als Wirkmechanismus wird die Sekretion parakriner Faktoren angenommen. Hauptsächlich

stützte die Arbeitsgruppe ihre Vermutung auf die Tatsache, dass die PMSCs maximal zwei Tage nach Transplantation nachgewiesen werden konnten. Die parakrinen Faktoren hätten dann zur Regeneration und Proliferation von Myozyten und Endothelzellen geführt [168]. Einen ebenso positiven Effekt auf die Funktion von Muskelgewebe durch die Verwendung von PMSCs zeigten Zhan et al. auf. Nach induzierter Ischämie durch Ligatur der zuführenden Gefäße des Hinterlaufs der Maus transplantierte die Arbeitsgruppe lokal PMSCs in die geschädigte Muskulatur. Beobachtet wurde im Verlauf eine signifikante Reduktion der Fibrose und eine deutlich erhöhte muskuläre Ausdauer auf dem Laufband. Auch hier werden parakrine Faktoren als Auslöser der Wirkung vermutet. Im Besonderen die Immunodulation durch Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α und die Anreicherung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 wurde diskutiert, weniger das myogene Differenzierungspotential, welche unter anderem durch Arakawa et al. beschrieben wurde [169, 170]. Darüber hinaus konnte auch ein direkter Einfluss auf die Angiogenese beobachtet werden. Xie et al. verwendeten hierzu dasselbe Ischämiemodell wie zuvor beschrieben und es erfolgte ebenso die lokale Transplantation der PMSCs. Dies führte zu einer signifikant erhöhten Gefäßdichte und somit einer verbesserten Blutversorgung [171]. Unterstützt wird dies durch die Arbeit von Yin et al., welche vier Wochen nach Transplantation der PMSCs in den ischämisch geschädigten Hinterlauf der Maus ebenso eine signifikant verbesserte Vaskularisation nachweisen konnten [172]. Komaki et al. wiesen in ihrer Arbeit nach, dass auch Exosome der PMSCs die Angiogenese nach ischämischer Schädigung von Skelettmuskulatur signifikant verbesserten [173]. Eine verbesserte Regeneration durch die Transplantation von PMSCs ist jedoch nicht nur auf die Anwendung in traumatisierter Muskulatur beschränkt. Auch im Schlaganfallmodell wiesen Kranz et al. eine verbesserte regenerative Kapazität nach. Die Applikation der PMSCs erfolgt hierbei intravenös nach totaler Okklusion der A. cerebri media in der Ratte. Für maternale PMSCs konnte im Anschluss ein verbessertes neurologisches Outcome beobachtet werden. Vorteilhaft war zusätzlich die zweizeitige Transplantation von PMSCs acht und 24 Stunden nach dem Schlaganfall gegenüber einer einmaligen Transplantation nach 24 Stunden [174]. Chen et al. zeigten ebenso die neuroprotektiven Effekte der PMSCs im Schlaganfallmodell der Ratte. Die Transplantation erfolgte hier vier Stunden nach der Schädigung und verbesserte im Verlauf das neurologische Outcome und reduzierte die Schädigung. Diskutiert wird auch hier die Rolle der parakrinen Faktoren. So konnte eine erhöhte Konzentration von VEGF und HGF sowie eine reduzierte Apoptose in der Penumbra nachgewiesen werden [175]. Gestützt werden diese Ergebnisse unter anderem von Barzegar et al., die in ihrer Studie humane

PMSCs intraperitoneal transplantierten, nachdem die A. cerebri media transient okkludiert wurde. Im Vergleich zu Kontrollgruppe sahen Barzegar et al. eine signifikant verbesserte Perfusion der ipsilateralen Hemisphäre [176]. Untersucht wurde der Einfluss von humanen PMSCs auch auf die akute intrazerebrale Blutung im Rattenmodell. Choi et al. applizierten die PMSCs und konnten in der akuten Phase 24 Stunden nach Blutungsinduktion eine geringere Ausdehnung des Hämatoms, weniger neuronalen Zelltod und ein geringeres Hirnödem feststellen. Als wesentlichen Erklärungsfaktor vermutete die Arbeitsgruppe eine verbesserte Integrität der Gefäßpermeabilität, welche durch eine erhöhte Produktion von Proteinen der Zona occludens repräsentiert wurde [177]. Die zuvor beschriebenen immunmodulatorischen Effekte ließen sich jedoch nicht nur im Muskeltrauma oder Ischämiemodell nachweisen. Auch die erhöhte Kapazität zur Wundheilung in der an Diabetes mellitus erkrankten Ratte wird auf eben diese Effekte zurückgeführt. Verantwortlich hierfür scheint die Reduktion von NF- κ B und erhöhte Expression an IL-10 zu sein, welches zu einer reduzierten Inflammation und verbesserten Wundheilung führt wie Wang et al. nachwiesen [178]. Den immunmodulatorischen Effekt untersuchten auch Lin et al. in ihrer Studie. Hier reduzierte die Anwesenheit von PMSCs in vitro in einem Medium mit mononukleären Zellen von an Asthma bronchiale erkrankten Kindern die Aktivierung von CD4⁺ - und CD8⁺ - T-Zellen sowie die Spiegel von IL-5 [179]. Ebenso einen positiven Effekt hatte die immunmodulatorische Kapazität der humanen PMSCs im Rattenmodell zur Lupusnephritis. Die Transplantation 16, 18 und 20 Wochen nach der Geburt reduzierte die Proteinurie und Anti-Doppelstrang-DNS-Antikörper-Titer. Auch die renale Inflammation wurde über die Senkung der Spiegel des nukleären Faktors-kappa B (NF- κ B), von TNF- α und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 reduziert [180].

3.5.4. Placental-derived adherent mesenchymal stromal cells

Wie auch bei MSCs entsprechen die Oberflächenmarker mit ihrer Positivität für CD105, CD73 und CD90 und der Negativität für CD14, CD19, CD34 und CD45 den Kriterien der ISCT. Lediglich beim Differenzierungspotential unterscheiden sich diese ebenfalls aus der Plazenta gewonnenen Zellen [112, 181]. Eine ausführliche Charakterisierung und Vergleich zu BMMSCs erfolgte durch Winkler et al. mit Hilfe eines „Human Cell Surface Marker Screening (PE)“-Kit (Biolegend, San Diego, California, USA). Die Placental-derived adherent mesenchymal stromal cells (PLX-Zellen) wiesen dabei ebenso das typische Expressionsmuster von MSCs auf. Jedoch umfasste dies darüber hinaus ein breiteres

Spektrum im Vergleich zu den BMSCs. So exprimierten PLX-Zellen CD-Moleküle zur Inhibition der Komplementaktivierung (CD45, CD55 und CD 59) sowie der T-Zellfunktion und der Regulation von Metalloproteasen (CD10). Die Expression der Moleküle war für verschiedene Kulturen oder Spender fast identisch, was als Qualitätskriterium des Herstellungsprozesses gewertet wurde [182]. In der Herstellung werden die PLX-Zellen aus der maternalen Seite der Plazenta isoliert und in Bioreaktoren kultiviert. Bei einer spindelförmigen Struktur besitzen sie eine Größe von 15-19 µm im Durchmesser [112, 183]. Ihre Unbedenklichkeit stellten die PLX-Zellen in initialen Studien unter Beweis. Im Rahmen der Anwendung in immundefizienten NOD-SCID Mäusen, bei der eine gegen Placebo getestete Injektion von 10^6 Zellen in die Hüftmuskulatur durchgeführt wurde, konnte eine unerwünschte Wirkung ausgeschlossen werden [184].

Im Modell des chronischen Ischämiesyndroms der Extremitäten (CLI) konnte nach Applikation der PLX-Zellen in die Hinterlaufmuskulatur eine dopplersonographisch verifizierte Verbesserung der Extremitätendurchblutung erreicht werden. Prather et al. führten dazu eine Ischämie am Hinterlauf der Maus herbei und transplantierten die PLX-Zellen lokal via intramuskulärer Injektion. Vermutet wurde hier eine verstärkte Angiogenese, welche sich in der Histologie als erhöhte Kapillardichte präsentierte, sowie eine Reduktion des oxidativen Stresses am Endothel [183]. Gestützt werden diese Resultate durch die Arbeit von Zahavi-Goldstein et al., welche ebenso eine verbesserte Durchblutung nach Transplantation von PLX-Zellen in die iatrogen geschädigte Muskulatur der Hinterläufe in der Maus verzeichneten [185]. Eine Phase III Studie zur Anwendung der PLX-Zellen und deren therapeutischen Potentials bei CLI im Menschen wird derzeit durchgeführt. [186]. Weitere Ergebnisse wurden aus einer Studie zum Myokardinfarkt publiziert. Roy et al. ligierten den Ramus interventricularis anterior und injizierten im Anschluss PLX-Zellen in das Randgebiet des Infarktareals. Vier Wochen nach der Therapie konnte eine Reduktion der Infarktgröße, eine verbesserte Kontraktionskraft sowie eine erhöhte Gefäßdichte und dickere Ventrikelwand in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Wie auch schon bei den PMSCs wurde auch bei den PLX-Zellen eine antiinflammatorische und proangiogenetische Wirksamkeit diskutiert. Unterstützt wurde diese These durch die erhöhte Nachweisbarkeit von Angiopoetin-1, VEGF und IL-10 in den behandelten Tieren [187]. Van Linthout et al. untersuchten ebenso die kardiale Funktion nach Transplantation von PLX-Zellen. In ihrem Modell induzierte die Arbeitsgruppe Diabetes mellitus in der Maus durch die Gabe von Streptozotocin an fünf aufeinander folgenden Tagen. Nach einer weiteren Woche erfolgte die Applikation der PLX-Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche

Natriumchlorid-Injektionen erhalten hatten. Bei den Versuchstieren, welche die PLX-Zellen erhielten, konnte eine verbesserte diastolische Relaxation nachgewiesen werden. Auch hier konnte eine erhöhte Konzentration von VEGF sowie erhöhte Gefäßdichte registriert werden [188]. Neuroprotektive Eigenschaften wurden durch Lahiani et al. in-vitro nachgewiesen. Dabei wurde der Zelluntergang von PC12-Zellen unter ischämischen Konditionen durch eine Co-Kultivierung mit PLX-Zellen reduziert und eine signifikant erhöhte Expression von IL-6 und VEGF gemessen [189]. Ma et al. untersuchten die Transplantation von PLX-Zellen nach Schädigung der Patellarsehne mittels Kollagenaseinjektion. Zwei Wochen nach Transplantation der Zellen in die geschädigte Sehne konnte eine höhere Maximalbelastung gemessen werden. Dies war verbunden mit höheren Spiegeln an IL-1 und IL-6 und somit einer vermutet stärkeren Inflammation. Dieser Vorteil in der Maximalbelastung, war nach vier Wochen jedoch nicht mehr vorhanden, sodass die Arbeitsgruppe nur von einem transienten Vorteil bei der Regeneration ausgehen konnte [190]. Eine kleine Fallstudie zur Wirkung der PLX-Zellen bei Patienten mit COVID-19 wurde von Barkama et al. durchgeführt. Nach intramuskulärer Injektion der Zellen wurde ein deutlicher Abfall des CrP-Spiegels verzeichnet, eine Reduktion des positiven endexpiratorischen Atemwegsdrucks war möglich und der Horovitz-Index besserte sich bei fünf von acht Patienten. Jedoch handelte es sich hierbei um eine Studie mit geringer Fallzahl und ohne Kontrollgruppe, sodass die Aussagekraft entsprechend kritisch zu bewerten ist [191].

Winkler et al. untersuchten die Anwendung von PLX-Zellen nach Implantation einer Hüft-Totalendoprothese über einen transglutealen Zugang im Menschen. Die Patienten erhielten entweder eine Plazebo-Injektion im Kontrollarm der Studie oder $1,5 \times 10^8$ bzw. $3,0 \times 10^8$ PLX-Zellen in den Gluteus medius. Nach 26 Wochen konnte eine signifikante Verbesserung der isometrischen Kontraktionskraft des ipsilateralen und kontralateralen Gluteus medius in der Gruppe mit $1,5 \times 10^8$ Zellen im Vergleich zur Plazebo-Gruppe gemessen werden. Dies galt nicht für die Therapiegruppe, welche $3,0 \times 10^8$ PLX-Zellen erhielt. Ursächlich vermutet wurde, dass eine verspätete Immunantwort die initial deutliche Verbesserung des Kraftniveaus im Vergleich zur Plazebogruppe beeinträchtigt haben könnte [182].

3.6. Zielsetzung und Hypothesen der Dissertation

Die natürliche Muskelregeneration ist ein effektiver Prozess bei kleineren Verletzungen. Bei größeren Traumata jedoch ist die Regenerationskapazität schnell erschöpft und es bleibt ein insuffizient geheilter Muskel zurück. Dieser ist wiederum einer erhöhten Anfälligkeit für erneute Schädigungen ausgesetzt. Gleiches gilt für die aktuell angewandten Therapieoptionen zur Unterstützung der Restitutio. Konservative wie chirurgische Verfahren konnten keine zufriedenstellende Verbesserung gewährleisten. Da jedoch muskuläre Verletzungen von immenser Bedeutung sowohl in ihrer Häufigkeit als auch für die Mobilität und das Überleben der Patienten sind, sind aktuelle Therapieverfahren nicht zufriedenstellend. Die Anwendung von autolog transplantierten MSCs zeigte bereits in vorangegangenen Studien ein ausgeprägtes Potential zur Unterstützung der Muskelregeneration. Jedoch blieb das Problem, dass die entsprechenden Zellen zuvor gewonnen und kultiviert werden mussten. Ein zeitaufwendiger Prozess, der eine unmittelbare und flexible Applikation nach einem Trauma nicht zuließ. Die aus der Plazenta gewonnenen PLX-Zellen bieten diese Möglichkeit, da diese nicht zunächst invasiv gewonnen werden müssen und somit jederzeit zur Verfügung stehen. Des Weiteren sind PLX-Zellen sehr gut charakterisiert und weisen eine höhere Homogenität als autolog gewonnene MSCs auf. Zur Untersuchung der Wirksamkeit der xenogenen Transplantation von menschlichen PLX-Zellen in die Ratte steht ein sehr gut etabliertes und erprobtes Verletzungsmodell zur Verfügung.

Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung, ob die Transplantation von menschlichen PLX-Zellen in den traumatisierten M. soleus der Ratte zu einer Verbesserung der Muskelkraft führt. Darüber hinaus soll die Analyse morphologischer Veränderungen der Muskulatur erfolgen, um Hinweise auf eine Genese der verbesserten regenerativen Kapazität zu erhalten.

Untersucht wird dazu die Muskelkraft nach Trauma sowie Transplantation und ob der Zeitpunkt der Transplantation einen Einfluss auf die Regeneration hat. Auf mikroskopischer Ebene werden die histologisch aufbereiteten Muskeln untersucht. Im Rahmen dessen werden die Fasertypenverteilung, die Gefäßdichte, die Fibrosefläche sowie die Infiltration durch T-Lymphozyten und Makrophagen evaluiert.

Für die Dissertation wurden folgende Hypothesen formuliert:

Nullhypothese:

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PLX-Gruppen und den Plazebogruppen in der Kraftmessung oder den mikromorphologischen Parametern nach Trauma und Transplantation.

Alternativhypothese:

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den PLX-Gruppen und den Plazebogruppen in der Kraftmessung oder den mikromorphologischen Parametern nach Trauma und Transplantation.

4. Material und Methoden

4.1. In Vivo

4.1.1. Versuchstiere

In dieser Studie wurden 40 weibliche und immunkompetente Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 140 – 160 Gramm von der Charles River Company in Massachusetts/USA verwendet. Die Versuchsreihe unterlag den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen nach §2 und §8 des Tierschutzgesetzes und wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin mit der Antragsnummer G 290_09 und G112_10 genehmigt. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer in klimatisierten Räumen mit 27°C Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 60% gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Standardnahrung (Altromin Pellets, Altromin-GmbH, Lage, Deutschland). Des Weiteren wurde ein regelmäßiger zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistet.

4.1.2. Narkose und Schmerztherapie

Die Injektionsnarkose erfolgte mit einer Mischung aus Ketamin (Ursotamin, 100mg/ml, Serum-Werk Bernburg AG) und Xylazin (Rompun, 20mg/ml, Bayer HealthCare) im Verhältnis von 5:1. Die Tiere bekamen zum Erreichen einer suffizienten Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation 0,15ml dieser Lösung subcutan gespritzt. Zur Schmerztherapie erhielten die Tiere 5mg/kg KG Rimadyl (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) direkt postoperativ sowie 24 Stunden danach.

4.1.3. Versuchsablauf

Versuchsgruppen	Tieranzahl	Transplantation
Interventionsgruppe 1 <i>Sofortige (Immediate) Transplantation</i>	10	2,5x10 ⁶ PLX-Zellen
Interventionsgruppe 2 <i>Verzögerte (Delayed) Transplantation</i>	10	2,5x10 ⁶ PLX-Zellen
Kontrollgruppe 1 <i>Sofortige (Immediate) Transplantation</i>	10	0,9% NaCl
Kontrollgruppe 2 <i>Verzögerte (Delayed) Transplantation</i>	10	0,9% NaCl

Table 1: Verteilung der Ratten auf die einzelnen Versuchsgruppen mit Angabe der Zellzahl der transplantierten Zellen

Die Tiere wurden nach Vorgabe des LaGeSo Berlin in zwei Kohorten operiert. Die Tiere der Kontrollgruppen wurden unter gleichen Bedingungen innerhalb der Genehmigungsnummer 290/09 operiert und konnten damit auch als Kontrollgruppe einer anderen Versuchsreihe mit autologen MSCs verwendet werden. Da diese Ratten eine Knochenmarkaspiration aus beiden Tibiae erhalten hatten wurde die Knochenmarkaspiration auch bei den Tieren der Interventionsgruppen zu Beginn der sechswöchigen Versuchsreihe am Tag 0 durchgeführt. Das gewonnene Material wurde verworfen. An Tag 14 wurde bei allen Tieren das Muskeltrauma gesetzt. Sowohl die Interventionsgruppe 1 als auch die Kontrollgruppe 1 erhielten an diesem Tag ihre Transplantation. Die entsprechenden Interventions- und Kontrollgruppen 2 wurden an Tag 21 des Protokolls transplantiert. Die funktionelle Auswertung und Gewinnung des Muskels zur weiteren histologischen Auswertung wurden am Tag 42 durchgeführt. Bei der Aufarbeitung wurde drei Muskelpräparate der Kontrollgruppe 2 so beschädigt, dass sie nicht zur Auswertung genutzt werden konnten.

	Tag 0	Tag 14	Tag 21	Tag 42
Interventionsgruppe 1 - Sofortige Transplantation	Biopsie	Trauma und Transplantation		Funktionelle Auswertung
Interventionsgruppe 2 - Verzögerte Transplantation	Biopsie	Trauma	Transplantation	Funktionelle Auswertung
Kontrollgruppe 1 – Sofortige Transplantation	Biopsie	Trauma und Transplantation		Funktionelle Auswertung
Kontrollgruppe 2 – Verzögerte Transplantation	Biopsie	Trauma	Transplantation	Funktionelle Auswertung

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihe

4.1.4. Operative Verfahren

4.1.4.1. Biopsie

Das Tier wurde nach erfolgreicher Anästhesie und Analgesie auf dem Rücken gelagert und die Beine mit einer Schermaschine (Favorita II, Aesuclap, Tuttlingen, Deutschland) rasiert. Anschließend erfolgte die Desinfektion des Operationsgebiets mit einer antiseptischen Lösung (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) sowie die zirkuläre Abdeckung des Operationsgebietes. Nach Aufsuchen des Ligamentum patellae und der Tuberositas tibiae wurde die Haut über dem Tibiakopf 1mm medial des Ligamentum auf einer Länge von circa 5mm inzidiert. Das Ligamentum wurde dargestellt, das Periost nach medial abgeschoben und das Operationsgebiet mit einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gespült. Die Kortikalis wurde medial der Tuberositas mit Hilfe eines 1mm messenden Handbohrers unter Spülung (Krick, Knittlingen, Deutschland) eröffnet. Nach Einführung einer 18G Nadel an einer 5ml Spritze in den Bohrkanal wurde das Knochenmark aspiriert. Es erfolgte eine erneute Spülung des OP-Gebietes mit NaCl. Das Aspirat wurde verworfen und die Haut mit einer fortlaufenden Naht spannungsfrei verschlossen. Ein selbiges Vorgehen erfolgte auch auf der kontralateralen Seite.

4.1.4.2. Trauma

Die Vorbereitungsmaßnahmen entsprachen denen der Biopsie. Die Tiere wurden für die Muskeltraumatisierung jedoch auf den Bauch gelagert. Die Traumatisierung erfolgte bei allen Tieren am linken M. soleus. Mittels eines Skalpells der Größe 15 erfolgte der Hautschnitt 3mm kranial des Calcaneus und lateral der Achillessehne über 1,5cm am lateralen Rand des M. gastrocnemius. Der Hautmuskel wurde dargestellt, durchtrennt und von den darunterliegenden Strukturen gelöst. Unter Erhaltung des Gefäß-Nerven-Bündels wurde anschließend der M. soleus vom M. gastrocnemius und der tiefer gelegenen Peronealmuskulatur freipräpariert. (Abbildung 3) Der M. soleus wurde anschließend stumpf mit einer Schere am Beginn der Achillessehne angehoben und eine krumme Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland), deren Branchen zur Schonung der Muskelfaszie mit einem Polyethylenschlauch ummantelt waren, von medial eingeführt. Das erste Trauma erfolgte am Beginn der Sehne über ein Schließen der Klemme bis zur dritten Stufe, die beiden Folgenden jeweils darüber. Die Traumatisierungen vier und fünf wurden kranial des Gefäß-Nerven-Bündels gesetzt. Der Klemmendruck entsprach $112 \pm 5,1\text{N}$ und wurde in Voruntersuchungen mit dem Materialprüfgerät Zwick 1455 (Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) ermittelt. Nach einer Spülung mit NaCl erfolgte der Verschluss des Hautmuskels mit 3 Einzelknopfnähten und der Haut mit einer spannungsfreien fortlaufenden Naht.

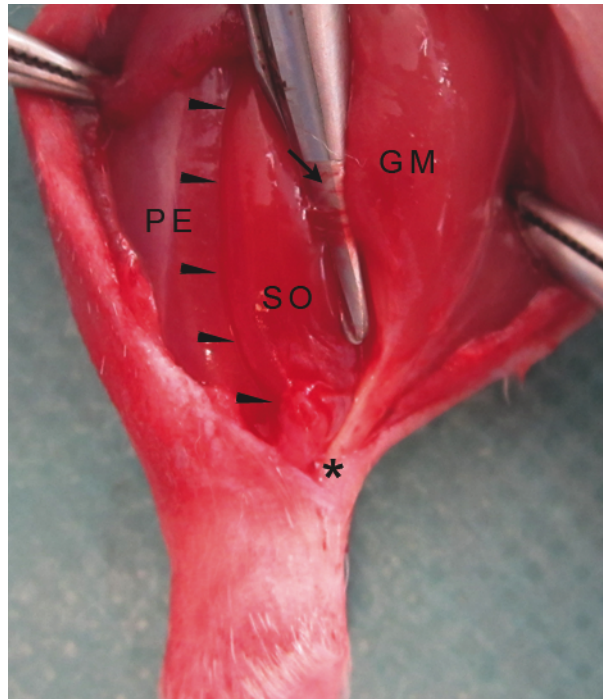


Abbildung 3: *In vivo* Darstellung des präparierten *M. gastrocnemius* (GM), *M. soleus* (SO), Achillessehne (*), der Gefäß-Nerven-Insertion(↘), der peronealen Muskelgruppe (PE) sowie Traumaregion an denen das Trauma gesetzt wurde (▶). Es handelt sich hier um eine übernommene Darstellung aus der Arbeit derselben Arbeitsgruppe „Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma“ von Winkler et al. [192].

4.1.4.3. Vorbereitung der PLX-Zellen und Transplantation

Die PLX-Zellen wurden aufgetaut, dreimal mit Phosphatpufferlösung (PBS) gewaschen und gezählt (CASY cell counter, Schärfe Systems, Teutlingen, Germany). 2.5×10^6 Zellen wurden in 20 μ l 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert.

Die Anästhesie und Analgesie erfolgten wie zuvor beschrieben. Nach Rasur und Bauchlagerung des Tieres wurde die vorhandene Narbe auf einer Länge von einem Zentimeter distal eröffnet, daraufhin der Hautmuskeln präpariert, auf ganzer Schnittlänge durchtrennt und der *M. gastrocnemius* und *M. soleus* dargestellt. Die vorbereiteten Zellen wurden unter Zuhilfenahme einer Tuberkulin-Spritze (25G, Norm-Ject, HSW, Tuttlingen, Germany) aspiriert. Die Nadel wurde von distal in den *M. soleus* eingeführt und die Zellen transplantiert. Der anschließende Wundverschluss erfolgte wie oben beschrieben.

Auf gleiche Weise erhielten die Kontrolltiere eine Injektion von 20 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung ohne Zellen.

4.1.5. Biomechanische Auswertung

4.1.5.1. Vorbereitung und Präparation

Narkose und Rasur beider Beine des Tieres erfolgte nach dem beschriebenen Standard. Daraufhin wurde in Bauchlagerung vom Calcaneus ausgehend die Haut über dem M. gastrocnemius und der Ischiocruralen-Muskulatur bis zum Os sacrum inzidiert. Unter Schonung der darunterliegenden vaskulären Strukturen wurde der Hautmuskel eröffnet, der Nervus ischiadicus dargestellt und die Präparation in Richtung des Os sacrum fortgeführt. Zur vollständigen Darstellung des M. soleus und des Gefäß-Nerven-Bündels erfolgte die weitere Präparation nach distal. Nun konnte die Achillessehne in die Anteile des M. gastrocnemius und des M. soleus separiert und der M. soleus direkt am Calcaneus abgesetzt werden. Zum Anschluss an die Messanlage wurde das Ende der Achillessehne je einmal in sagittaler und koronarer Ebene mittels Vicryl-Nahtmaterial der Stärke 4-0 (Johnson & Johnson Medical, Schweiz) durchstoßen und mit einem Knoten gesichert. Die Präparation und Kraftmessung wurde in allen Fällen zunächst rechts durchgeführt und danach in gleicher Weise links.

4.1.5.2. Messvorrichtung und Kraftmessung

Zur funktionellen Auswertung wurde eine computergestützte Messanlage (Experimetria, Budapest, Ungarn) verwendet. Dabei wurde der N. ischiadicus mit Hilfe einer Elektrode gereizt und so die Kontraktion des M. soleus herbeigeführt. Die Kraftentwicklung wurde in Newton gemessen. Dabei standen je ein Modus für Fast Twitch und für tetanische Kontraktion zur Verfügung. Diese wurden zuvor von der Arbeitsgruppe in Visual Basic (Version 8, Microsoft, Redmond, Washington, USA) programmiert.

Für die Fast Twitch Kontraktion wurde der Nerv fünf mal mit einer Stromstärke von 9 mA und 75 Hz (bipolar) für 0,1 Sekunden stimuliert, für die tetanische Kontraktion wurde der N. ischiadicus fünf Mal über drei Sekunden bei gleicher Stromstärke und Frequenz stimuliert. Insgesamt wurde der Muskel somit zehn Mal mit einem Pausenintervall von jeweils fünf Sekunden stimuliert.

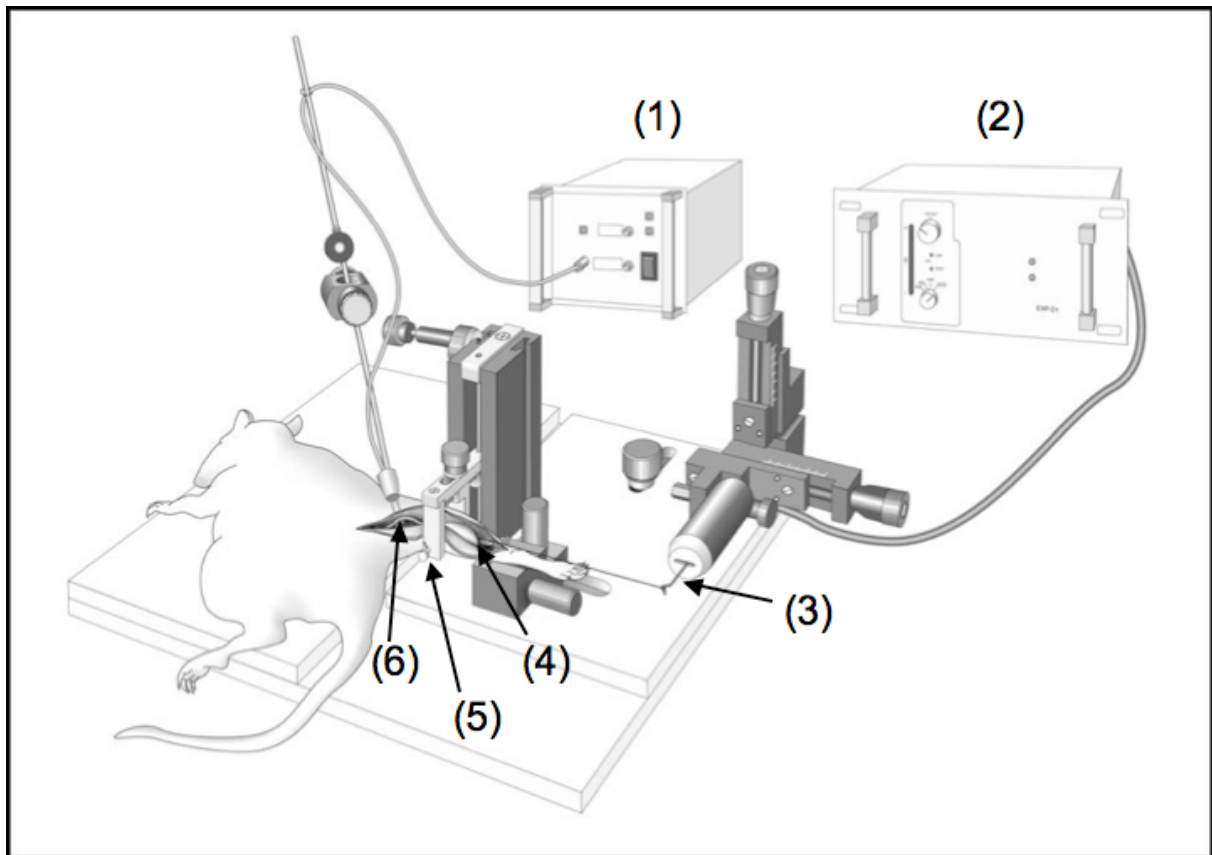


Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Muskelkraft-Messanlage. Im Hintergrund: Der Impulsgeber (1) und das Gerät zur Kraftaufzeichnung (2), vorne der Abnehmer für die Kraftentwicklung (3), der präparierte M. soleus (4), die Fixierung der zu messenden Extremität auf Höhe des Knies (5) und der frei liegende N. ischiadicus (6). Diese Darstellung wurde aus der Arbeit „Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats“ von Winkler et al. übernommen [193].

Vergleichbar mit dem in Abbildung 4 zu sehenden Versuchsaufbau wurde das Tier für die Kraftmessung auf dem Untersuchungstisch platziert, der N. ischiadicus an die Messelektrode angeschlossen, das zu messende Bein auf Höhe des Knies fixiert und der M. soleus mit Hilfe des vorher befestigten Vicryl-Fadens mit dem Kraftabnehmer fest verbunden. Die Messanlage wurde mit einem Notebook (Acer, Taipeh, Taiwan) gesteuert und die Ergebnisse so simultan aufgezeichnet. Nach der Messung erfolgte die Explantation des M. soleus sowie das sofortige Kryokonservieren wie unter 4.2.2.1 beschrieben zur Verwendung für weiterführende histologische Untersuchungen. Am Ende der Untersuchung wurde das Tier euthanasiert.

4.2. Ex Vivo

4.2.1. Herstellung der PLX-Zellen

Die Isolation der PLX-Zellen erfolgte durch die Biotechnologiefirma Pluristem Therapeutic Inc. (Haifa, Israel) aus dem maternalen Anteil von Plazenten, welche bei einer geplanten Kaiserschnittgeburt gewonnen wurden. Die gesunden Spenderinnen gaben zuvor nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis basierend auf der Deklaration von Helsinki (WMA, 2008). Für ihre Spende erhielten sie keine Form finanzieller oder materieller Kompensation. Die Plazenten wurden zunächst gewaschen und mit Kollagenase behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Kultivierung für zwei bis drei Tage bei 37°C in 2D-Kulturflaschen und die Hinzugabe eines entsprechenden Kulturmediums für mesenchymale Stromazellen. Nach Testung auf Sterilität, Kontamination durch Mykoplasmen und Zell-Vitalität erfolgte die immunphänotypische Charakterisierung. PLX-Zellen exprimieren CD73, CD90, CD29, und CD105. Darüber hinaus charakterisieren sie sich durch die Abwesenheit von CD34, CD45, CD19 und CD14. Auch exprimieren sie keine HLA Klasse-II-Antigene, CD31, Glycophorin A, CD80, CD86 oder CD40. Anschließend erfolgte die Expansion im 3D-Bioreactor (CelliGen Plus, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) für ein bis zwei Wochen. Nach der anschließenden Entnahme erfolgte eine erneute Testung auf phäno- und karyotypische Veränderungen und abschließend die Kühlung und Lagerung bei $-170 \pm 30^\circ\text{C}$. Winkler et al. führten eine ausführliche Charakterisierung der PLX-Zellen durch und verglichen diese mit BMMSCs. Die folgende Tabelle ist aus den Ergebnissen dieser Charakterisierung adaptiert und auf die exprimierten Marker reduziert. Der quantitative Vergleich der Expression erfolgte in Relation zu der bei den Isotypenkontrollen [182].

Marker	PLX-Zellen	BMMSCs	Marker	PLX-Zellen	BMMSCs
CD9	+	+	CD81	++	+
CD10	+	-	CD90	+	+
CD13	+	++	CD95	+	+
CD29	+	++	CD99	+	++
CD44	++	++	CD105	+	+
CD46	+	-	CD108	+	+
CD47	+	+	CD109	-	+

CD49a	+	-	CD112	-	+
CD49c	+	+	CD140b	+	-
CD49d	+	-	CD144	+	-
CD49e	+	+	CD146	+	+
CD49f	+	+	CD150	+	-
CD51	+	+	CD154	-	+
CD55	+	+	CD164	+	+
CD58	+	+	CD166	+	++
CD59	++	-	CD273	+	-
CD61	+	-	CD274	+	-
CD62P	-	+	HLA-ABC	+	+
CD63	+	++	Epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGF)	+	+
CD71	+	+	Beta-2- Mikroglobulin	+	++
CD73	+	+			

Tabelle 3: Expressionsmuster der PLX-Zellen im Vergleich zu BMMSCs. Diese Tabelle wurde aus der Arbeit „Immunomodulatory placental-expanded, mesenchymal stromal cells improve muscle function following hip arthroplasty“ von Winkler et al. adaptiert und auf die positiven Reaktionen reduziert [182]. Die Quantität ist als Faktor der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Isotypenkontrollen angegeben (- : negativ, + : > 10fach, ++ : > 100fach, +++ : > 1000fach)

4.2.2. Histologie

4.2.2.1. Aufbereitung der histologischen Präparate

4.2.2.1.1. Materialien und Reagenzien

Materialien

- a. Cryomolds
- b. Kryotütchen mit Clipverschluss
- c. Kryobox für -80°C Gefrierschrank
- d. Handschuhe, Kälteschutzhandschuhe, Schutzbrille, Pinzette, Permanentschreiber
- e. Sicherheitsbehälter für flüssigen Stickstoff
- f. Metallbehälter zum Einhängen (Eigenbau) für Isomethylbutan
- g. Styroporkarton mit Deckel für Trockeneis

Reagenzien

- a. Isomethylbutan (2-Methylbutan) (Firma (Fa.) Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A., # Cat.: M3 263-1, 2,5l)
- b. 0,9% Natriumchlorid-Lösung (eigener Ansatz)

Medium

- a. Tissue-Tek (Fa. Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande # 4583, 120ml)
- b. Flüssiger Stickstoff
- c. Trockeneis
- d. Crushed-Eis

Geräte

- a. Tiefkühler -80°C, Dometic, Emsdetten, Deutschland
- b. Kryostat (Fa. Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland)
- c. Objektträger, Marienfeld, Histo Bond Adhäsions-Objektträger 75 x25 x 1 mm

4.2.2.1.2. Vorbereitung und Durchführung

Nach der funktionellen Auswertung der Muskelkraft wurden die Tiere euthanasiert und der linke sowie rechte M. soleus entnommen. Es erfolgte die Kryokonservierung der Präparate.

Hierzu wurden die Muskeln zunächst kurz mit gekühlter 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gespült und in ein mit Tissue-Tek gefülltes Cryomold gegeben. Dieses wurde unmittelbar mit Tissue-Tek luftblasenfrei aufgefüllt und anschließend in Isomethylbutan für 20 Sekunden gefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C in einem Tiefkühler (Dometic, Emsdetten, Deutschland). Zur weiteren Verarbeitung wurden die gefrorenen Präparate im Kryostaten in 10µm dicke Schnitte geschnitten, und mittels Wärme auf Objektträger aufgebracht. Das weitere Prozedere erfolgte nach den Protokollen der jeweiligen Färbungen und Reaktionen.

4.2.2.2. Konventionelle Histologie

4.2.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

4.2.2.2.1.1 Materialien und Reagenzien

Reagenzien

- a. 4%ige Formalinlösung (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)
- b. Hämatoxylin nach Harris (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- c. Salzsäure (HCl)-Alkohol: 0,25% HCl in 70%igen Alkohol (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)
- d. Eosin (Fa. Chroma-Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) Verdünnung: 0,2% plus 2 Tropfen. Eisessig ad 200ml Aqua destillata
- e. Aqua destillata (Aqua dest.)
- f. Xylol (Fa. J.T.Baker, Center Valley, Pennsylvania)
- g. Vitroclud (Fa. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

4.2.2.2.1.2 Vorbereitung und Durchführung

Die Schnitte wurden nach 40 Minuten Lufttrocknung für fünf Minuten in 4%igem Formalin (Herbeta, Berlin, Deutschland) fixiert, für weitere fünf Minuten gespült mit Aqua dest. und anschließend Hämatoxylin nach Harris für sieben Minuten gefärbt. Nach erneuter, kurzer Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Differenzierung in HCl-Alkohol aus eigenem Ansatz mit 0,25% HCl in 70%igen Alkohol. Daraufhin wurden die Präparate zehn Minuten mit Leitungswasser gebläut und Eosin für zwei Minuten gefärbt. Die Differenzierung und

Entwässerung wurde durch eine aufsteigende Alkoholserie erreicht. Dabei erfolgte jeweils zweimal die Spülung für vier Sekunden mit 96%igem und 100%igem Alkohol. Anschließend erfolgte die weitere Prozessierung mit Xylol für zweimal zwei Minuten und die Eindeckung in Vitroclud. Zellkerne und Mukossubstanzen wurden blau gefärbt. Zytoplasma, Muskelgewebe und Bindegewebe färbten sich in Abstufungen von rot.

4.2.2.2.2. Sirius Rot

4.2.2.2.2.1. Materialien und Reagenzien

Reagenzien

- a. 4%ige Formalinlösung (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)
- b. Aqua dest.
- c. Sirius Rot Fluka, Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- d. Pinkrinsäure (Fa. Honeywell Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland)
- e. Xylol (Fa. J.T.Baker, Center Valley, Pennsylvania, U.S.A.)
- f. Alkohol (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)
- g. Essigsäure 0,5%ig

4.2.2.2.2.2. Vorbereitung und Durchführung

Die kryokonservierten Schnitte wurden 40 Minuten luftgetrocknet, anschließend in 4%iger Formalinlösung (Herbeta, Berlin, Deutschland) für 5 Minuten fixiert und zweimalig mit Aqua dest. gespült. Zur Vorbereitung der Färbung wurden 0,5g Sirius Rot in 500ml gesättigter Pinkrinsäure gelöst. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Präparate für eine Stunde mit der genannten Lösung. Daraufhin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholserie dehydriert. Dabei erfolgte jeweils zweimal die Spülung für vier Sekunden mit 96%igem und 100%igem Alkohol. Zuletzt wurden die Präparate mit Xylol für zweimal fünf Minuten prozessiert. Kollagenes Bindegewebe wurde rot und der Hintergrund gelb gefärbt.

4.2.2.3. Immunhistochemische Reaktionen

4.2.2.3.1 Materialien und allgemeine Reagenzien

Materialien

- a. Glasküvetten #H554.1 (Fa. Roth, Balingen, Deutschland)
- b. Schiffchen (Fa. Roth, Balingen, Deutschland)
- c. Messkolben
- d. Messzylinder
- e. Kleine Glasmessbecher
- f. Feuchte Kammer
- g. Pipetten (Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- h. Pipettenspitzen (Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- i. PAP-Pen (Fettstift) (Fa. The Binding Site, Birmingham, U.K.)
- j. Glasstab
- k. Deckgläser 24x32mm (Fa. VWR International, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.)
- l. Münchner Mappe (Fa. VWR International, Radnor, Pennsylvania, U.S.A.)
- m. Präparatekasten (Fa. neoLab, Heidelberg, Deutschland)
- n. Röhrchen 13ml #55.468 (Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- o. Stöpsel #65.793 (Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)

Reagenzien

- a. Ethanol 100% #605182 (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)
- b. Aqua dest.
- c. Phosphatpufferlösung (Phosphatebuffersolution PBS) #3L-175 (Fa. Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- d. Avidin-Biotin-Komplex #AK 5000 (Fa. Biozol, Eching, Deutschland)
- e. Alkaline-Phosphate-Substratkit #SK-5100 (Fa. Biozol, Eching, Deutschland)
- f. Hämatoxylin nach Mayer #1.09249.0500 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- g. Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)-HCl #3253 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- h. TRIS-Base # 3253 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- i. Natriumchlorid #6404 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- j. Aceton #32201-2,5l (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)

- k. Normalserum Horse # S-2000 (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A)

Medium

- a. Antikörper Diluent #S3022 (Fa. Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)
- b. Aquatex (Eindeckmittel) #1.08562 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Geräte

- a. Vortexer (Fa. Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
- b. Wärmeschrank 37°C (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
- c. Magnetrührer RCT (Fa. IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- d. pH-Meter inoLab (Fa. WTW von Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland)

4.2.2.3.2. Myosin Slow-Reaktion

4.2.2.3.2.1. Antikörper und spezielle Reagenzien:

- a. Primärer Antikörper: Monoclonal Mouse Anti-Myosin (Skeletal slow), Clone NOQ7.5.4D #M8421 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- b. Sekundärer Antikörper: Biotinlyated Anti-Mouse, Rat adsorbed, made in Horse, #BA-2001 (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)
- c. Normalserum vom Pferd # S-2000 (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A)

4.2.2.3.2.2. Vorbereitung und Durchführung

Zur Herstellung des Chromogenbuffers wurden 3,96g TRIS-HCl #3253, 0,54g TRIS-Base #3253 und 2,63g Natriumchlorid in Lösung mit 300 Milliliter Aqua dest. zu einem pH von 8,2 in Lösung gebracht. Die Phosphatpufferlösung wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Das Normalserum wurde 10%ig mit der PBS verdünnt. Die Verdünnung des o.g. primären Antikörpers erfolgte 1:10000 mit dem Antikörper Diluent #S3022. Der o.g. sekundäre Antikörper wurde mit dem Normalserum vom Pferd zu 2% und der PBS 1:50 verdünnt.

Zur Vorbereitung der kryokonservierten Schnitte wurden diese 30 Minuten luftgetrocknet, für zehn Minuten in Aceton, welches zuvor für 30 Minuten bei -20°C gekühlt wurde, fixiert und anschließend mit Aqua dest. gespült.

Nach Umranden der Präparate mittels Fettstift erfolgte die Blockierung. Hierzu wurden diese zweifach für fünf Minuten mit PBS gespült und nach Pipettieren des o.g. Normalserums vom Pferd für 30 Minuten in die feuchte Kammer überführt. Folgend auf das Abkippen des Normalserums wurde der primäre Antikörper hierauf pipettiert und eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte das zweimalige Spülen für jeweils fünf Minuten in PBS. Nach Abklopfen des Objektträgers wurde der sekundäre Antikörper aufpipettiert und 30 Minuten inkubiert. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde nach Anleitung des Herstellers vorbereitet. Daraufhin erfolgte das Spülen mit PBS in oben beschriebener Weise, das unmittelbare Auftragen des Avidin-Biotin-Komplexes und eine 50minütige Inkubation. Nach erneuter Spülung mit PBS in vorbeschriebener Weise wurde der Chromogenpuffer aufgetragen und fünf Minuten inkubiert, abgeklopft und das Prozedere wiederholt.

Das Alkaline-Phosphate-Substratkit wurde nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und aufpipettiert. Die Erfolgskontrolle erfolgte unter dem Mikroskop. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Spülen mit PBS für fünf Minuten und anschließend Aqua dest. für zwei Minuten gestoppt. Es erfolgte die Gegenreaktion mit Hämatoxylin nach Mayer 1:2 verdünnt mit Aqua dest. für zwei Minuten sowie das Bläuen in Leitungswasser. Abschließend wurde das Präparat mit einem Tropfen Aquatex und einem Deckglas bedeckt und für 24 Stunden luftgetrocknet. Die langsame schwere Kette des Myosins der langsam zuckenden Typ I- Fasern reagierte rot und das übrige Gewebe kam blau zur Darstellung. Die Überprüfung der Reaktionsergebnisse erfolgte mittels Verarbeitung in gleicher Weise als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper.

4.2.2.3.3. Myosin Fast-Reaktion

4.2.2.3.3.1. Antikörper und spezielle Reagenzien

- a. Primärer Antikörper: Monoclonal Mouse Anti-Myosin (Skeletal fast) Clone My-32 #M4276 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- b. Sekundärer Antikörper: Anti-Mouse, Rat adsorbed, Biotinlyated, made in Horse #BA-2001 Biozol (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)

4.2.2.3.3.2. Vorbereitung und Durchführung

Die Vorbereitung der Präparate und des Chromogenpuffers erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschriebener Weise. Der o.g. primäre Antikörper wurde 1:4000 mit dem Antikörper Diluent verdünnt, pipettiert und das Präparat eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Abklopfen und zweimaligem Spülen mit PBS für jeweils fünf Minuten wurde der o.g. sekundäre, 1:50 verdünnte Antikörper hierauf pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Die weitere Verarbeitung der Präparate erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschrieben. Die schnelle schwere Kette des Myosins der schnell zuckenden Typ II-Fasern reagierte rot und das übrige Gewebe kam blau zur Darstellung. Die Überprüfung der Reaktionsergebnisse erfolgte mittels Verarbeitung in gleicher Weise als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper.

4.2.2.3.4. T-Zell-Rezeptor-Reaktion

4.2.2.3.4.1. Antikörper und spezielle Reagenzien

- a. Primärer Antikörper: T-Zell-Rezeptor Mouse R73, reactivity rat #554911 (Fa. Becton-Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- b. Sekundärer Antikörper: Anti-Mouse, Rat adsorbed, Biotinlyated, made in Horse, Fa Vector, # BA-2001 Biozol (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)
- c. Bovines Serumalbumin #A9706 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)

4.2.2.3.4.2. Vorbereitung und Durchführung

Die Vorbereitung der Präparate und des Chromogenpuffers erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschriebener Weise. Der o.g. primäre Antikörper wurde 1:1000 mit dem Antikörper Diulent verdünnt und mittels Pipette aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Anschließend erfolgte das zweimalige Spülen mit PBS für jeweils fünf Minuten. Der o.g. sekundäre Antikörper wurde mit Normalserum vom Pferd zu 2% und Bovine Serumalbumin (BSA) zu 2% sowie PBS 1:75 verdünnt. Zunächst wurde BSA 2% und PBS aufgetragen, für fünf Minuten inkubiert und abgeklopft. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und für weitere 30 Minuten inkubiert. Die weitere Verarbeitung der Präparate erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschrieben. Die T-Zellen reagierten rot und das übrige Gewebe

kam blau zur Darstellung. Die Überprüfung der Reaktionsergebnisse erfolgte mittels Verarbeitung in gleicher Weise als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper.

4.2.2.3.5. Faktor VIII-Reaktion

4.2.2.3.5.1. Antikörper und spezielle Reagenzien

- a. Primärer Antikörper: Faktor VIII (FVIII) Rabbit Polyclonal #CP039B (Fa. Biocare Medical, Concord, Kalifornien, U.S.A.)
- b. Sekundärer Antikörper: Goat Anti-Rabbit IgG (Heavy and Light Chain) Antibody Biotinylated #BA-1000 (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)
- c. Normalserum der Ziege #S-1000 (Fa. Biozol, Eching, Deutschland)
- d. 4%iges Paraformaldehyd (Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland)

4.2.2.3.5.2. Vorbereitung und Durchführung

Die Vorbereitung der Präparate und des Chromogenpuffers wurde wie in 4.2.2.3.2.2. beschrieben durchgeführt, jedoch erfolgte nach dem Luftrocknen der Präparate die Fixierung in Paraformaldehyd für zehn Minuten, anstatt in Aceton. Der o.g. primäre Antikörper wurde 1:200 mit Antikörper Diluent verdünnt und hierauf pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer, wurde das überschüssige Material abgeklopft und das Präparat zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gespült. Der o.g. sekundäre Antikörper wurde mit dem Normalserum der Ziege zu zwei Prozent und PBS verdünnt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 Minuten in der feuchten Kammer. Die weitere Aufarbeitung wurde nach in 4.2.2.3.2.2. beschriebener Weise fortgeführt. Das Faktor VIII-positive Endothel reagierte rot und das übrige Gewebe kam blau zur Darstellung. Die Überprüfung der Reaktionsergebnisse erfolgte mittels Verarbeitung in gleicher Weise als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper.

4.2.2.3.6. CD-68-Reaktion

4.2.2.3.6.1. Antikörper und spezielle Reagenzien

- a. Primärer Antikörper: Monoclonal Mouse, Rat adsorbed #BM 4000 (Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland).
- b. Sekundärer Antikörper: Anti-mouse, Rat adsorbed, Biotinlyated, made in Horse #BA-2001 Biozol (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)

4.2.2.3.6.2. Vorbereitung und Durchführung

Die Vorbereitung der Präparate und des Chromogenpuffers erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschriebener Weise. Der o.g. primäre Antikörper wurde 1:2000 mit dem Antikörper Diulent verdünnt und mittels Pipette aufgetragen. Anschließend erfolgte das zweimalige Spülen mit PBS für jeweils fünf Minuten. Der o.g. sekundäre Antikörper wurde mit Normalserum vom Pferd zu 2% und Bovinen Serumalbumin zu 2% sowie PBS 1:50 verdünnt. Zunächst wurde BSA 2% und PBS aufgetragen, für fünf Minuten inkubiert und abgeklopft. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und für weitere 30 Minuten inkubiert. Die weitere Verarbeitung der Präparate erfolgte wie in 4.2.2.3.2.2. beschrieben. Die CD-68-positiven Zellen reagierten rot und das übrige Gewebe kam blau zur Darstellung. Die Überprüfung der Reaktionsergebnisse erfolgte mittels Verarbeitung in gleicher Weise als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper.

4.2.3. Auswertung der histologischen Präparate

4.2.3.1. Deskription

Zur deskriptiven Beurteilung der Schnitte wurden diese in verschiedenen Vergrößerungen lichtmikroskopisch analysiert und mittels der am Mikroskop (Leica DMRB Mikroskop, Leica, Deutschland) angebrachten Kamera (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Die Steuerung und Verarbeitung erfolgte mit Axio Vision 4.4 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland).

4.2.3.2. Histomorphometrie

4.2.3.2.1. Digitalisierung

Mittels des zuvor beschriebenen technischen Aufbaus wurden die Präparate digitalisiert. Die Überlappung der Bilder wurde auf 15% festgelegt. Stitching und Konvertierung der Fotos erfolgten ebenso in Axio Vision 4.4 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland). Zuletzt wurde der Maßstabsbalken eingefügt.

4.2.3.2.2. Bestimmung der Muskelfläche und Fibrosefläche

Zunächst wurden in Photoshop CS 12.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, U.S.A.) die nicht zum Muskel gehörigen Areale des Fotos mit dem ‚Zauberstab-Werkzeug‘ markiert und entfernt. Mit Hilfe desselben Werkzeugs und einer Toleranz von 15 wurde die Muskelfläche markiert und vermessen. In gleicher Weise wurde mit der Fibrosefläche und dem Myosin Fast-Anteil der Muskulatur in den entsprechenden Färbungen und Reaktionen verfahren.

4.2.3.2.3. Messung der Faserverteilung

Zur Ermittlung der Faserverteilung wurden in ImageJ64 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.) Regionen des Interesses (ROIs) der Fläche 500x500µm erstellt und unter diesen per Zufall mindestens zehn ROIs ausgewählt, in welchen die Faserverteilung bestimmt wurden. Es erfolgte die Markierung und Auszählung der Fasertypen, bis mindestens

400 Fasern pro Schnitt ausgezählt waren. Dabei wurden je drei Schnitte in der Myosin Fast und drei in der Myosin Slow-Reaktion pro Versuchstier ausgezählt.

4.2.3.2.4. Quantifizierung der Gefäße

Für die mit Faktor VIII zur Reaktion gebrachten Schnitte wurden in ImageJ64 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.) in vorbeschriebener Weise 500x500µm ROIs erstellt und zehn von diesen randomisiert ausgewählt. Folgend wurden die Kapillaren, welche als FVIII positive Gefäße mit einem Durchmesser von weniger als 10µm definiert wurden, mit einem 10µm messenden Punkt markiert und gezählt. In einem weiteren Schritt wurden alle weiteren Gefäße gezählt, wobei eine Unterscheidung zwischen großen und kleinen Gefäßen mit einem Grenzwert von 40µm unternommen wurde. Untersucht wurden je drei Schnitte pro Muskel.

4.2.3.2.5. Quantifizierung der Gewebsmakrophagen

Zunächst erfolgte die Unterteilung des Schnitts mit CD68 positiver Reaktion in ImageJ64 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.) in ROIs in der oben beschriebenen Weise. Anschließend wurden 15 der ROIs auf CD68 positive Zellen ausgezählt.

4.2.3.2.6. Beurteilung der T-Zellen

Die histomorphometrische Auswertung der T-Zellrezeptor (TCR) positiven Zellen wurde in Photoshop CS 12.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, U.S.A.) durchgeführt. Da in den Präparaten auch Cluster von TCR-positiven Zellen gefunden wurden, wurde die Analyse wie folgt durchgeführt: Zunächst erfolgte die Bestimmung der durchschnittlichen Größe der TCR-positiven Zellen anhand einzeln vorgefundener Zellen. Dazu wurden 20 repräsentative Zellen in 20 verschiedenen Schnitten vermessen und der Mittelwert berechnet. Dieser Wert diente als Grundlage zur Bestimmung der gesamten Zellzahl. Anschließend wurden die Zellcluster in den aufgesucht und mit dem ‚Freihand-Tool‘ umfahren. Die Fläche wurde berechnet und durch die vorher ermittelte Zelldurchschnittsgröße geteilt. Einzeln liegende TCR-positive Zellen wurden als solche gezählt.

4.3. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Statistics (Version 20.0.0, IBM, Armonk, New York, U.S.A.) und Microsoft Excel (Version 14.1.0, Microsoft Corporation, Albuquerque, New Mexico, U.S.A.) durchgeführt. Die grafische Aufarbeitung erfolgte mit Prism (Version 6, Prism Software, Irvine, Kalifornien, U.S.A.). Für die deskriptive Statistik sind absolute und relative Häufigkeiten als Mittelwerte mit der Standardabweichung (SD) angegeben. Auf Grund der Skaleneigenschaften der Auswertungen war nicht von einer Normalverteilung auszugehen. Zusätzlich wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob eine Approximation einer Normalverteilung vorliegt. Dieser Test wurde gewählt, da er bezogen auf alle Arten der Verteilung und Stichprobengröße, die größte Power der entsprechenden Tests besitzt [194].

Der Shapiro-Wilk-Test für die Fast-Twitch-Stimulation der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte eine Normalverteilung ($p=0,437$). Die Schiefe wurde mit 0,758 und die Kurtosis mit -0,517 berechnet. Für die Kontrollgruppe 1 waren die Daten normalverteilt ($p=0,802$). Die Schiefe betrug 0,533 und die Kurtosis -0,321. Die Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation der PLX-Zellen und bei Fast-Twitch-Stimulation ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,654$). Die Schiefe betrug 0,039 und die Kurtosis 1,515. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung berechnet ($p=0,601$). Die Schiefe errechnete sich mit 0,744 und die Kurtosis -0,036.

Für die tetanische Stimulation der Interventionsgruppe 1 zeigte der Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung ($p=0,544$). Die Schiefe betrug 0,39 und die Kurtosis -1,146. Die Prüfung für die Kontrollgruppe 1 ergab eine Normalverteilung ($p=0,251$). Die Schiefe wurde mit -0,078 und die Kurtosis mit -1,777 errechnet. Die Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation und bei tetanischer Stimulation ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,722$). Die Schiefe betrug 0,234 und die Kurtosis -0,818. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung berechnet ($p=0,147$). Die Schiefe betrug 0,470 und die Kurtosis -1,364.

Der Shapiro-Wilk-Test für den Anteil der fastMHC-positiven Muskelfasern der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte keine Normalverteilung ($p=0,003$). Die Schiefe wurde mit 2,272 und die Kurtosis mit 5,957

berechnet. Für die Kontrollgruppe 1 waren die Daten nicht normalverteilt ($p=0,032$). Die Schiefe betrug 1,537 und die Kurtosis 3,535. Der Anteil der fastMHC-positiven Muskelfasern in der Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation ist laut dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,773$). Die Schiefe betrug 0,285 und die Kurtosis -0,781. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung ermittelt ($p=0,880$). Die Schiefe betrug 0,558 und die Kurtosis 0,472.

Für den prozentualen Anteil der Fibrose am Muskel in der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte der Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung ($p=0,459$). Die Schiefe betrug 0,743 und die Kurtosis -0,301. Die Prüfung für die Kontrollgruppe 1 ergab eine Normalverteilung ($p=0,766$). Die Schiefe wurde mit -0,085 und die Kurtosis mit -1,090 errechnet. Die Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,537$). Die Schiefe betrug -0,040 und die Kurtosis -1,546. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung berechnet ($p=0,178$). Die Schiefe betrug 0,667 und die Kurtosis -0,911.

Der Shapiro-Wilk-Test für die Gefäßdichte der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte eine Normalverteilung ($p=0,458$). Die Schiefe wurde mit 0,825 und die Kurtosis mit 0,013 berechnet. Für die Kontrollgruppe 1 waren die Daten normalverteilt ($p=0,134$). Die Schiefe betrug -0,358 und die Kurtosis -1,698.

Die Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation der PLX-Zellen ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,542$). Die Schiefe betrug 0,413 und die Kurtosis 0,847. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung berechnet ($p=0,7$). Die Schiefe wurde mit -0,251 und die Kurtosis -1,147 errechnet.

Für die Zahl der T-Zellen im Muskel in der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung ($p=0,026$). Die Schiefe betrug 1,493 und die Kurtosis 2,096. Die Prüfung für die Kontrollgruppe 1 ergab eine Normalverteilung ($p=0,113$). Die Schiefe wurde mit 1,393 und die Kurtosis mit 2,212 errechnet. Die Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,501$). Die Schiefe betrug 0,105 und die Kurtosis -1,175. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung ermittelt ($p=0,884$). Die Schiefe betrug 0,596 und die Kurtosis 0,232.

Der Shapiro-Wilk-Test für die Anzahl der CD68-positiven Makrophagen der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen zeigte eine Normalverteilung ($p=0,728$). Die Schiefe wurde mit 0,255 und die Kurtosis mit -0,943 berechnet. Für die Kontrollgruppe 1 waren die Daten normalverteilt ($p=0,191$). Die Schiefe betrug -1,243 und die Kurtosis 2,961. Die Anzahl der CD68-positiven Makrophagen ist in der Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation der PLX-Zellen nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p=0,992$). Die Schiefe betrug 0,005 und die Kurtosis -0,405. Für die Kontrollgruppe 2 wurde eine Normalverteilung berechnet ($p=0,573$). Die Schiefe war -0,852 und die Kurtosis 0,197.

In Anbetracht der nur teilweise vorliegenden Approximation zur Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und der Skaleneigenschaften, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben verwendet. Der Wilcoxon-Test prüft abhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben. Ein Testergebnis wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Auswertung der Kraftmessung

5.1.1. Einfluss der PLX-Zellen auf die Regeneration der Kontraktionskraft

Zur Untersuchung des Einflusses der PLX-Zellen auf die Regeneration der Muskelkraft wurde die gemessene Kraft bei Fast-Twitch und Tetanie-Stimulation des traumatisierten M. soleus normalisiert auf die Kontraktionskraft des kontralateralen, untraumatisierten M. soleus betrachtet. Für die Fast-Twitch-Stimulation erreichten die traumatisierten Muskeln der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation der PLX-Zellen eine Wiederherstellung der Kraft von $70,8 \pm 28,6\%$. Somit zeigte sich eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe 1, welche $39,5 \pm 21,9\%$ der Kraft der untraumatisierten Seite erreichen konnte ($p=0,02$, $U=16$). Die Kraft der Interventionsgruppe 2 mit verzögerter Transplantation erreichte $77,2 \pm 29\%$ des gegenseitigen Niveaus und somit ebenso signifikant mehr als die entsprechenden Kontrolltiere mit $44,1 \pm 20\%$ ($p=0,03$, $U=18$). In Abbildung 5 ist die Kontraktionskraft des linken, traumatisierten M. soleus normalisiert auf die Kontraktionskraft des rechten, untraumatisierten M. soleus bei Fast-Twitch-Stimulation dargestellt. Zu erkennen ist, dass die normalisierte Kontraktionskraft beider Interventionsgruppen im Durchschnitt die Kontraktionskraft der zugehörigen Kontrollgruppen übersteigt. Dies wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test als statistisch signifikant bestätigt.

Die Transplantation von PLX-Zellen verbessert die Muskelkraft bei Fast-Twitch-Stimulation unabhängig vom Transplantationszeitpunkt

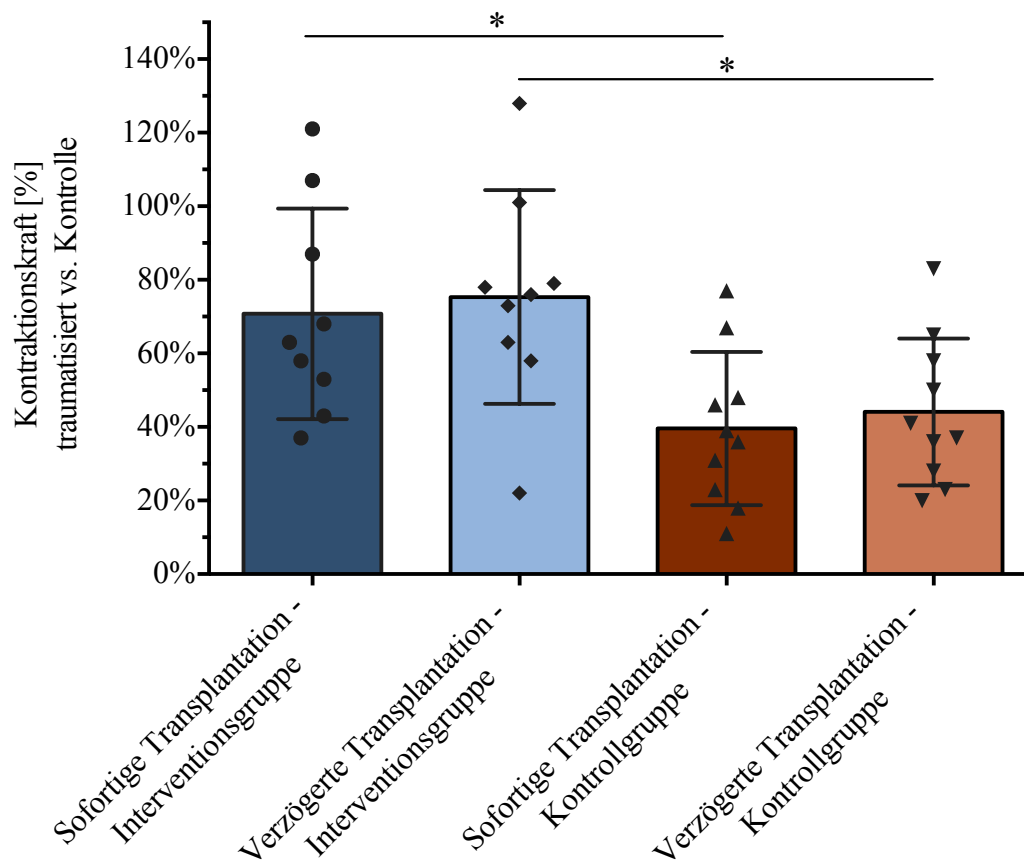


Abbildung 5: Maximale Kraftentwicklung des linken, traumatisierten *M. soleus* normalisiert auf die Kontraktionskraft des rechten, untraumatisierten *M. soleus* bei Fast-Twitch-Stimulation für die sofort transplantierte Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierte Interventionsgruppe 2 sowie die sofort transplantierte Kontrollgruppe 1 und verzögert transplantierte Kontrollgruppe 2. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet

Die maximale Kontraktionskraft des *M. soleus* der sofort transplantierten Interventionsgruppe 1 unter tetanischer Stimulation lag normalisiert auf die untraumatisierte Gegenseite bei $51,4 \pm 22,5\%$. Bei der zugehörigen Kontrollgruppe wurde eine Wiederherstellung der Kraft auf $35,3 \pm 12,5\%$ erreicht ($p=0,17$, $U=28$). Somit ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Bei der Transplantation eine Woche nach Trauma wurde mit $49 \pm 16,5\%$ der Gegenseite ein signifikanter Unterschied gemessen. Die Kontrollgruppe erreichte hier einen Wert von $31,1 \pm 15,6\%$ ($p=0,04$, $U=20$). In Abbildung 6 ist die Kraftentwicklung des linken, traumatisierten *M.*

soleus normalisiert auf die Kontraktionskraft des rechten, untraumatisierten M. soleus bei Tetanie-Stimulation abgebildet. Für beide Transplantationsgruppen ist zu erkennen, dass die normalisierte Kontraktionskraft im Durchschnitt über der Kontraktionskraft der entsprechenden Kontrollgruppe liegt. Dies wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test als statistisch signifikant für die verzögerte Transplantation bestätigt. Für die Interventionsgruppe 1 mit sofortiger Transplantation gilt dies nicht.

Die verzögerte Transplantation von PLX-Zellen verbessert die Kraft bei tetanischer Stimulation vier Wochen nach dem Trauma signifikant

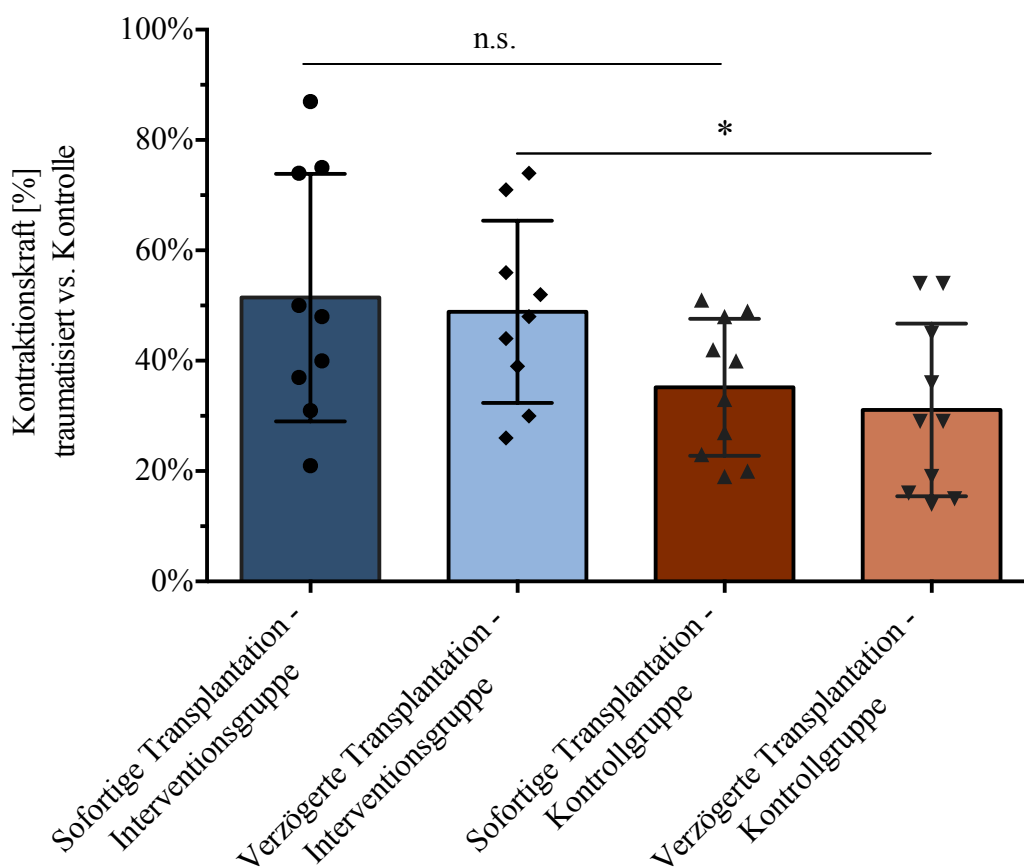


Abbildung 6: Maximale Kraftentwicklung des linken, traumatisierten M. soleus normalisiert auf die Kontraktionskraft des rechten, untraumatisierten M. soleus bei Tetanie-Stimulation für die sofort transplantierte Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierte Interventionsgruppe 2 sowie die sofort transplantierte Kontrollgruppe 1 und verzögert transplantierte Kontrollgruppe 2. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, nicht signifikante mit n.s.

5.1.2. Einfluss des Transplantationszeitpunktes auf die Regeneration der Kontraktionskraft

Im Vergleich der Transplantationszeitpunkte direkt und eine Woche nach dem Trauma ergibt sich für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere bei Fast-Twitch- ($p=0,57$, $U=34$) und tetanischer ($p=0,83$, $U=38$) Stimulation kein signifikanter Unterschied. Dies ist in Abbildung 7 zu erkennen.

In beiden Stimulationsmodi besteht kein signifikanter Kraftunterschied in Abhängigkeit vom Transplantationszeitpunkt

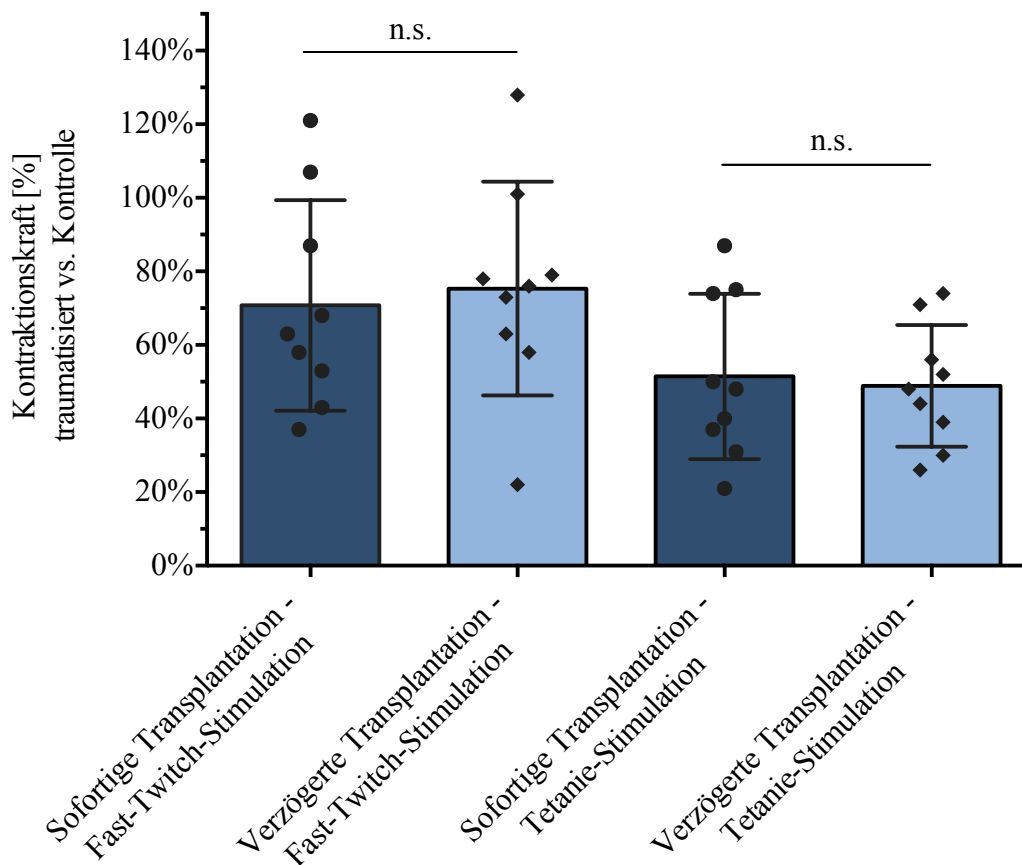


Abbildung 7: Maximale Kraftentwicklung des linken, traumatisierten *M. soleus* normalisiert auf die Kontraktionskraft des rechten, untraumatisierten *M. soleus* im Vergleich der unterschiedlichen Transplantationszeitpunkte für sofort transplantierte Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierte Interventionsgruppe 2. Nicht signifikante Unterschiede sind mit *n.s.* gekennzeichnet.

5.2. Auswertung der Histologie

5.2.1. Deskriptive Histologie

Bei der histologischen Auswertung vier Wochen nach Trauma fanden sich in beiden Therapiegruppen mehr Regeneratfasern im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Besonderen in der Grenzzone zu den fibrotischen Arealen der Muskeln kamen Fasern mit großem zentralen Nukleus und basophilem Zytoplasma zur Darstellung (Regeneratfasern). Die Regenerate fanden sich unabhängig oder ausgehend von ortsständigen Fasern.

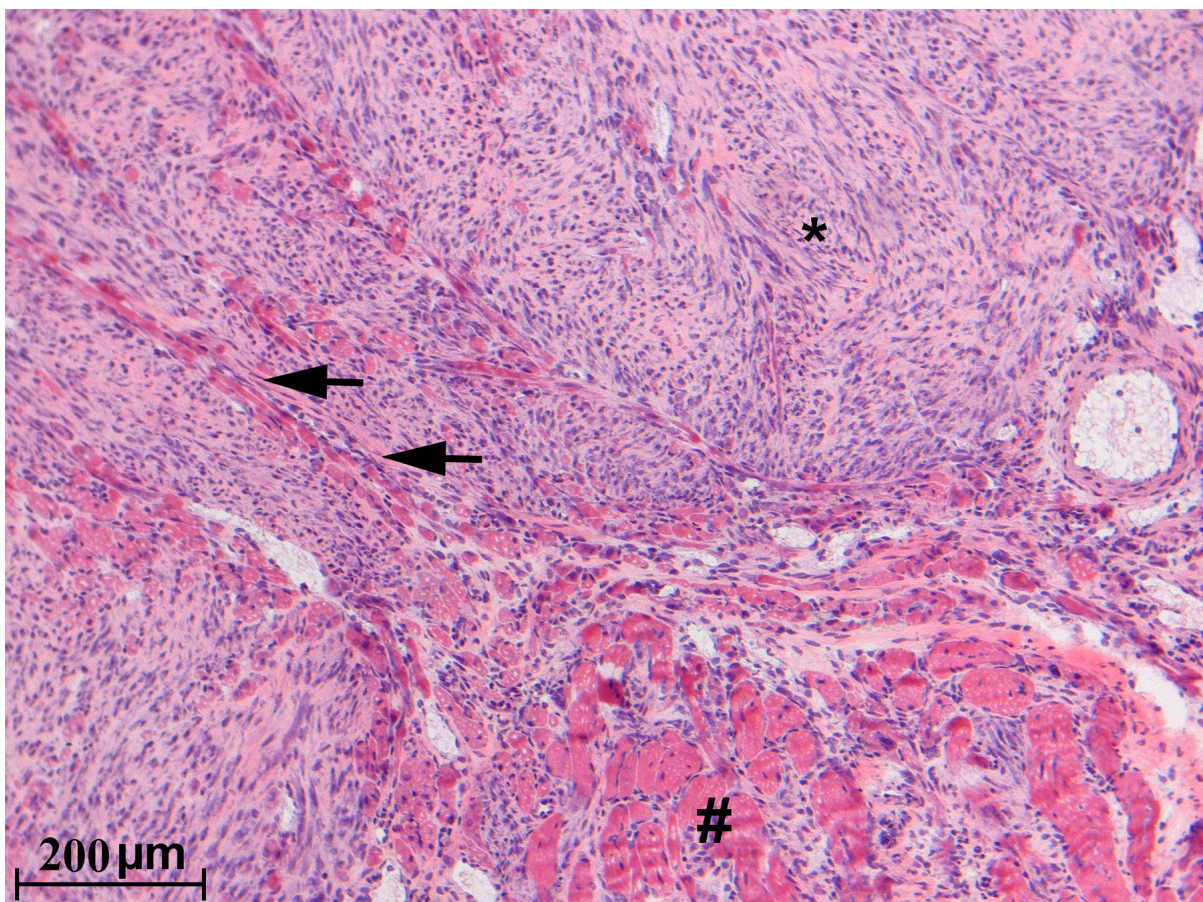


Abbildung 8: Repräsentativer Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt des *M. soleus* eines therapierten Tiers (Tier Nummer 9) vier Wochen nach Transplantation. Zu sehen ist die Grenzzone zwischen Muskelgewebe (#) und dem fibrotischen Areal (*), sowie regenerierendes Muskelgewebe (→).

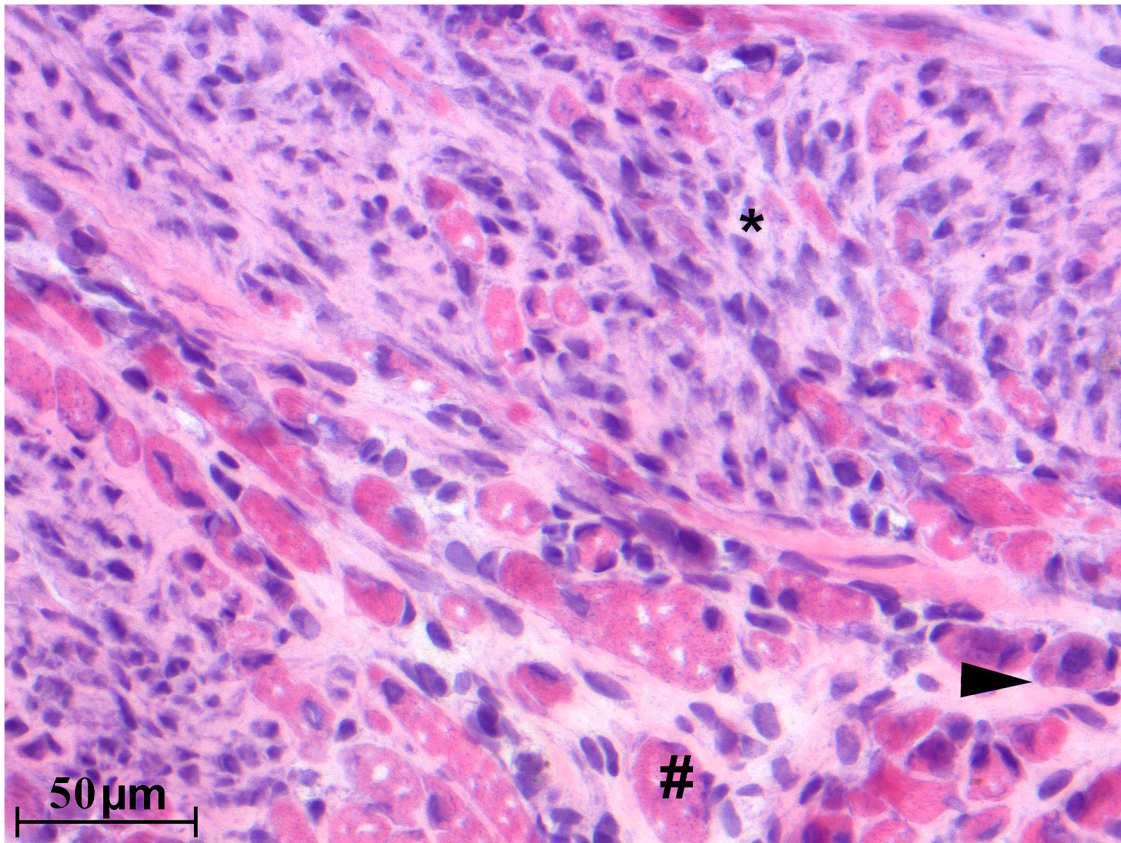


Abbildung 9: Darstellung von regenerierenden Muskelfasern vier Wochen nach Transplantation. Zu sehen ist eine Vergrößerung desselben Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitts des Muskels wie in Abbildung 8 (Tier Nummer 9) im Übergangsbereich zwischen Muskelgewebe (#) und dem fibrotischen Areal (*). Darüber hinaus sind Muskelzellen mit zentralständigem Kern (→) (Regeneratfasern) als Zeichen des sich regenerierenden Muskelgewebes zu erkennen.

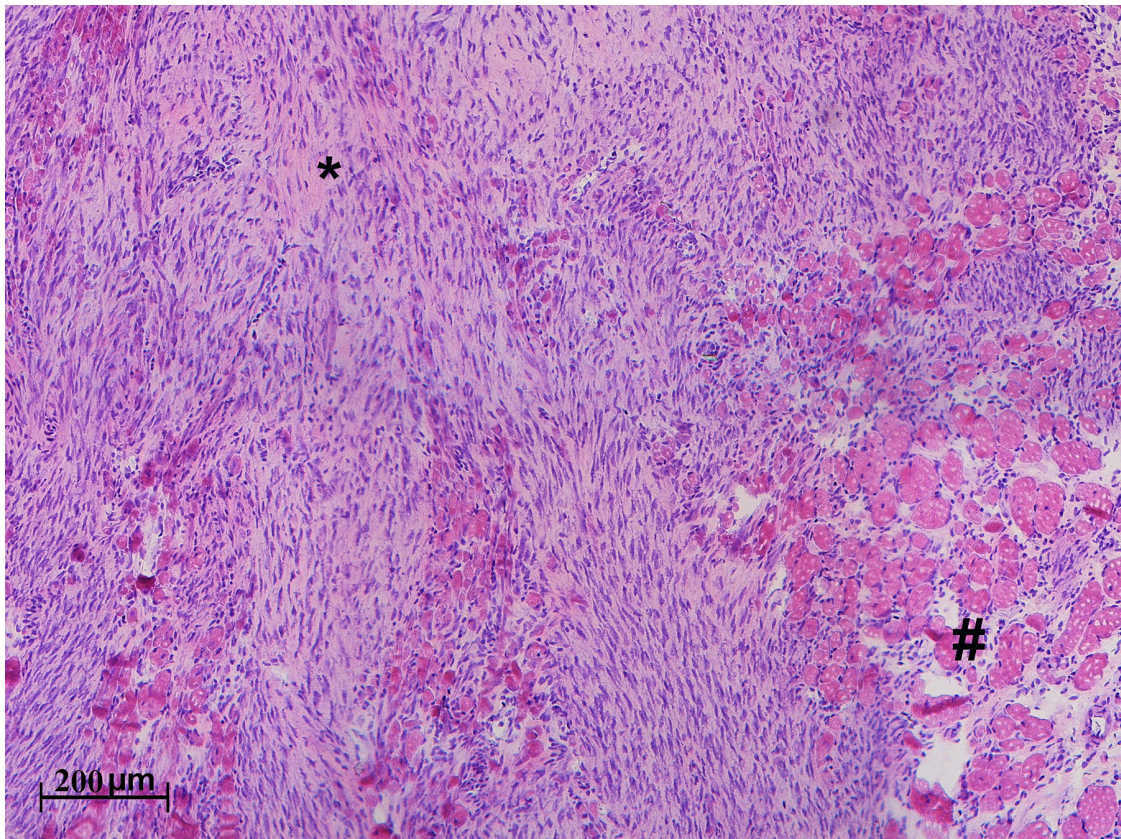


Abbildung 10: Repräsentativer Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitt des *M. soleus* eines Tiers (Tier Nummer 32) einer Kontrollgruppe. Zu sehen ist die Grenzzone zwischen Muskelgewebe (#) und dem fibrotischen Areal (*).

In Abbildung 10 ist die Grenzzone zwischen vitalem Muskelgewebe und Fibrose bei einem Tier aus der Kontrollgruppe mit verzögerter Transplantation zu sehen. Im Gegensatz zu Abbildung 8 und 9 sind hier keine Straßen regenerierenden Muskelgewebes zu erkennen.

Bei den therapierten Tieren konnte eine örtliche Korrelation zwischen in das Narbengewebe einsprossenden Gefäßen und den regenerierenden Muskelfasern festgestellt werden. Die folgende Abbildung 11 zeigt dasselbe Areal am Übergang zwischen Muskulatur und Bindegewebe wie in Abbildung 8 und 9 in der FVIII-Reaktion. Gut zur Darstellung kommt die örtliche Korrelation der dargestellten Gefäße und der regenerierenden Muskulatur.

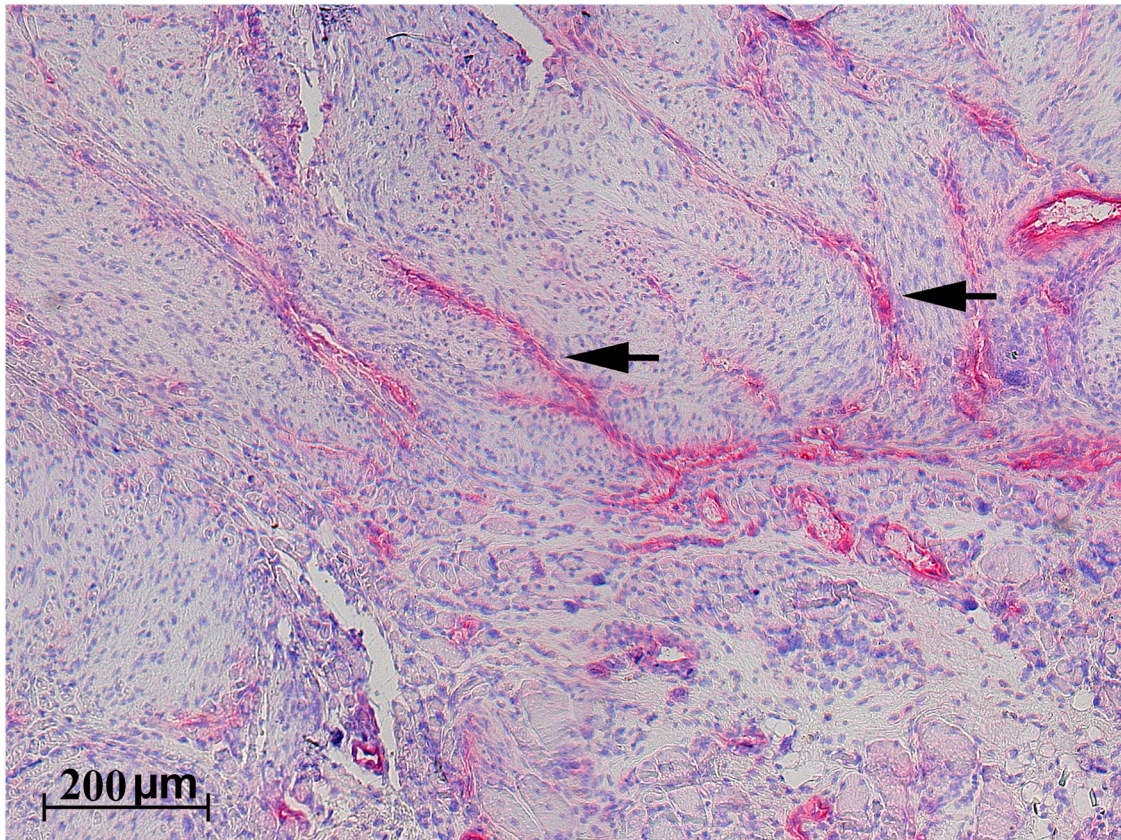


Abbildung 11: Gefäßdarstellung des *M. soleus* durch eine immunhistochemische Reaktion mit FVIII vier Wochen nach Transplantation von PLX-Zellen. Zu sehen ist der *M. soleus* desselben therapierten Tiers (Tier Nummer 9) wie in Abbildung 8 und 9. Zur Darstellung kommen kleine in das fibrotische Areal einsprossende Gefäße (→) in örtlicher Korrelation mit den in Abbildung 8 und 9 dargestellten Regeneratfasern

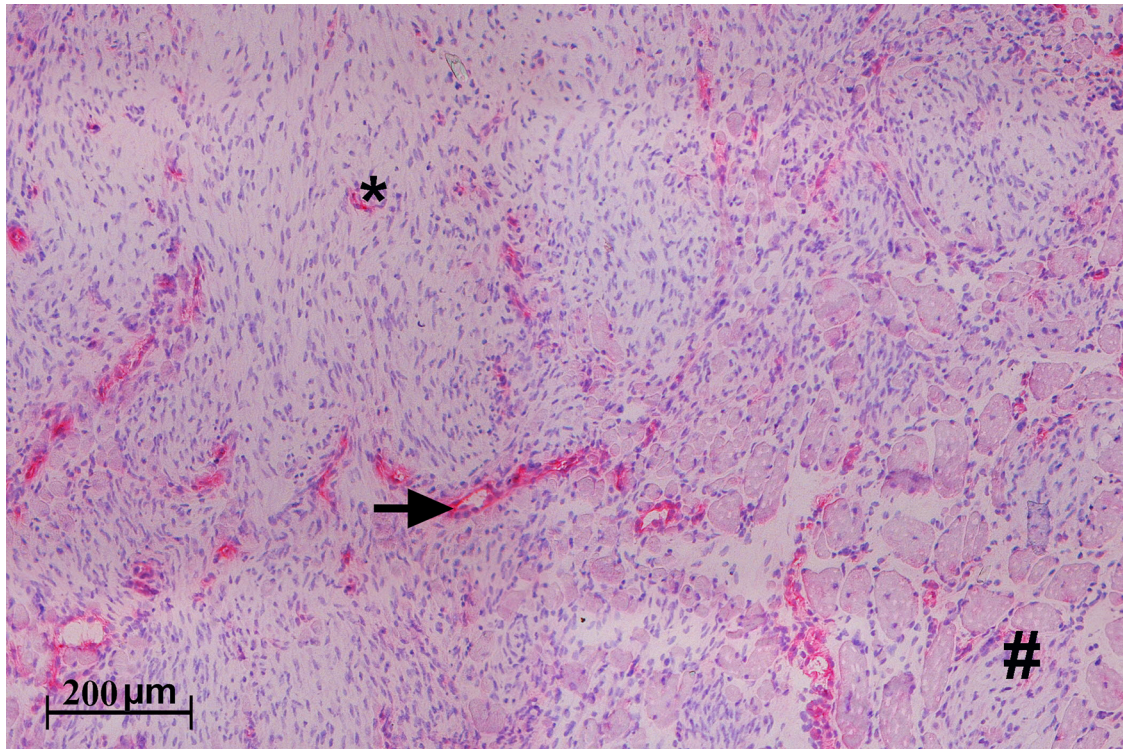


Abbildung 12: Gefäßdarstellung des *M. soleus* eines Kontrolltiers durch eine immunhistochemische Reaktion mit FVIII. Zu sehen ist der *M. soleus* desselben Tiers (Tier Nummer 9) der Kontrollgruppe mit verzögerter Transplantation wie in Abbildung 10. Zur Darstellung kommt der Übergangsbereich zwischen Muskulatur (#), fibrotischem Areal (*) und Gefäßen (→).

In Abbildung 12 ist derselbe Übergang zwischen fibrotischem Gewebe und Muskulatur zu sehen, wie in Abbildung 10. Auch hier sind die Gefäße mittels FVIII-Reaktion dargestellt. Zu sehen sind vereinzelte Gefäße. Eine klare Einsprossung der Gefäße in das Bindegewebe ist nicht zu erkennen.

Des Weiteren konnten in den therapierten Muskeln Granulome, welche exemplarisch in Abbildung 13 und 14a sowie 14b dargestellt sind, gefunden werden. Diese waren in den Kontrolltieren nicht vorzufinden. Die Abbildung 13 zeigt ein Granulom in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hauptsächlich im Zentrum der Granulome war eine positive Reaktion auf CD-68 und somit Gewebsmakrophagen nachzuweisen, was in Abbildung 14b zu erkennen ist. Die T-Zellen wurden mit einer positiven Reaktion auf den T-Zellrezeptor nachgewiesen und umgaben die Granulome wie in Abbildung 14a zu sehen. Dieses Granulom stammt aus einem therapierten Tier (Tier Nummer 16) nach verzögerter Transplantation.

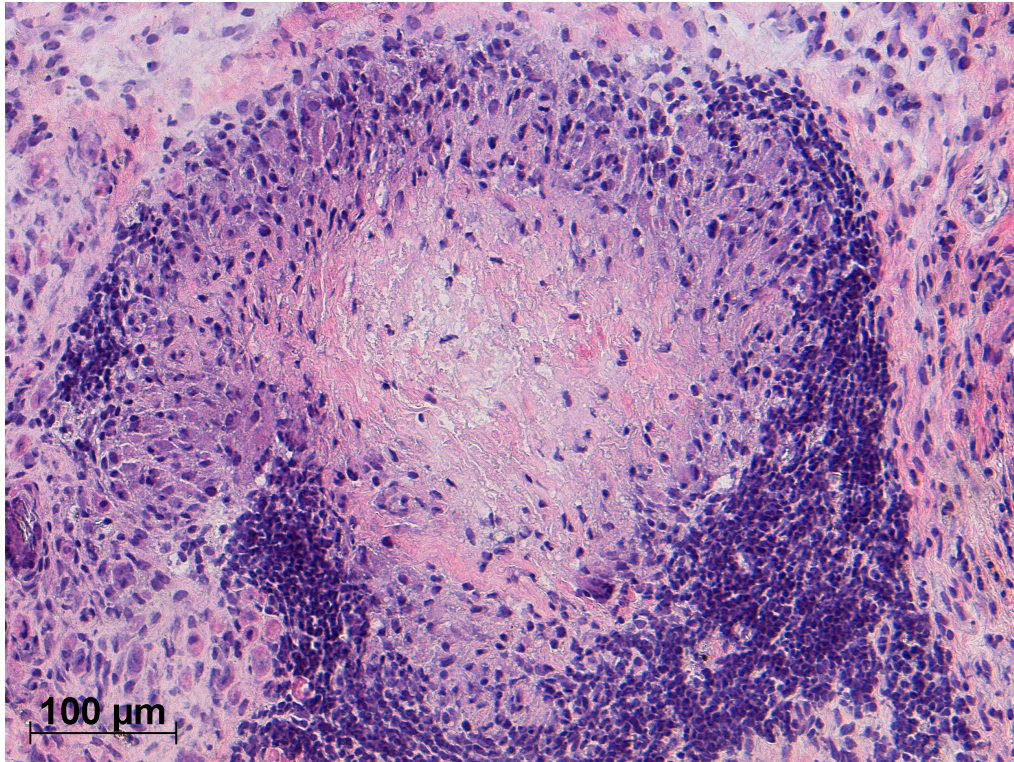


Abbildung 13: Exemplarisches Granulom in einem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt des *M. soleus* eines mit PLX-Zellen therapierten Tiers (Tier Nummer 16)

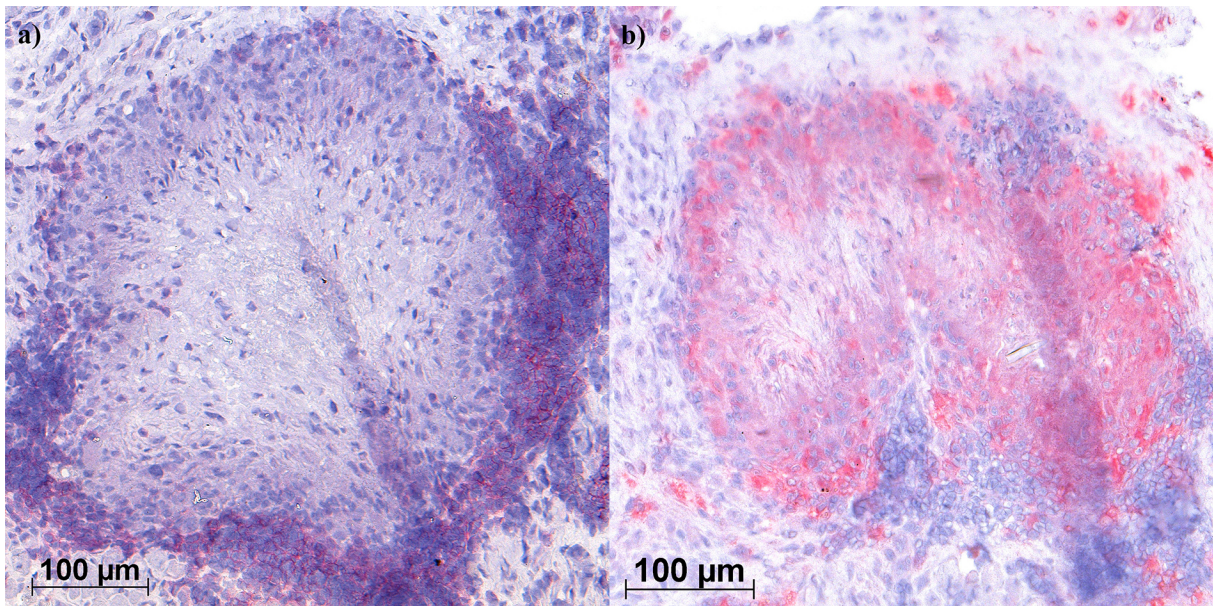


Abbildung 14: Dasselbe Granulom wie in Abbildung 13 (Tier Nummer 16) 10. a) in der T-Zellreaktion und b) in der CD68-positiven Reaktion der Gewebsmakrophagen

5.2.2. Einfluss der PLX-Zellen auf die Faserverteilung

Die Differenzierung der Faserverteilung erfolgte mittels der Unterscheidung von slow Myosin Heavy Chain (slowMHC) und fast Myosin Heavy Chain (fastMHC) und ist im Folgenden als prozentualer Anteil an den gesamten Muskelfasern angegeben.

Die Versuchstiere, welche direkt nach dem Trauma die PLX-Zelltransplantation erhielten, wiesen vier Wochen später einen fastMHC-Anteil von $25,7 \pm 16,6\%$ auf. Bei der entsprechenden Kontrollgruppe waren es $19,4 \pm 8,5\%$. Dies ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,33$, $U=37$) und ist in Abbildung 15 dargestellt. In der Interventionsgruppe 2 mit verzögerter Transplantation lag die Quote der fastMHC-positiven Muskelfasern bei $22,3 \pm 6,9\%$ und war somit signifikant höher als bei der entsprechenden Kontrollgruppe mit einem Anteil von $15,4 \pm 3,6\%$ ($p=0,04$, $U=14$). In der Abbildung 15 wird der Anteil der fastMHC-positiven Muskelfasern dargestellt. Der signifikante Unterschied zwischen der Interventionsgruppe 2 nach verzögerter Transplantation und der dazugehörigen Kontrollgruppe ist an Hand der Verteilung der Messwerte zu erkennen und wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test als statistisch signifikant bestätigt. Der Vergleich der Transplantationszeitpunkte ergibt für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied ($p=0,99$, $U=50$).

Signifikant mehr fastMHC-positive Muskelfasern bei verzögerter Transplantation

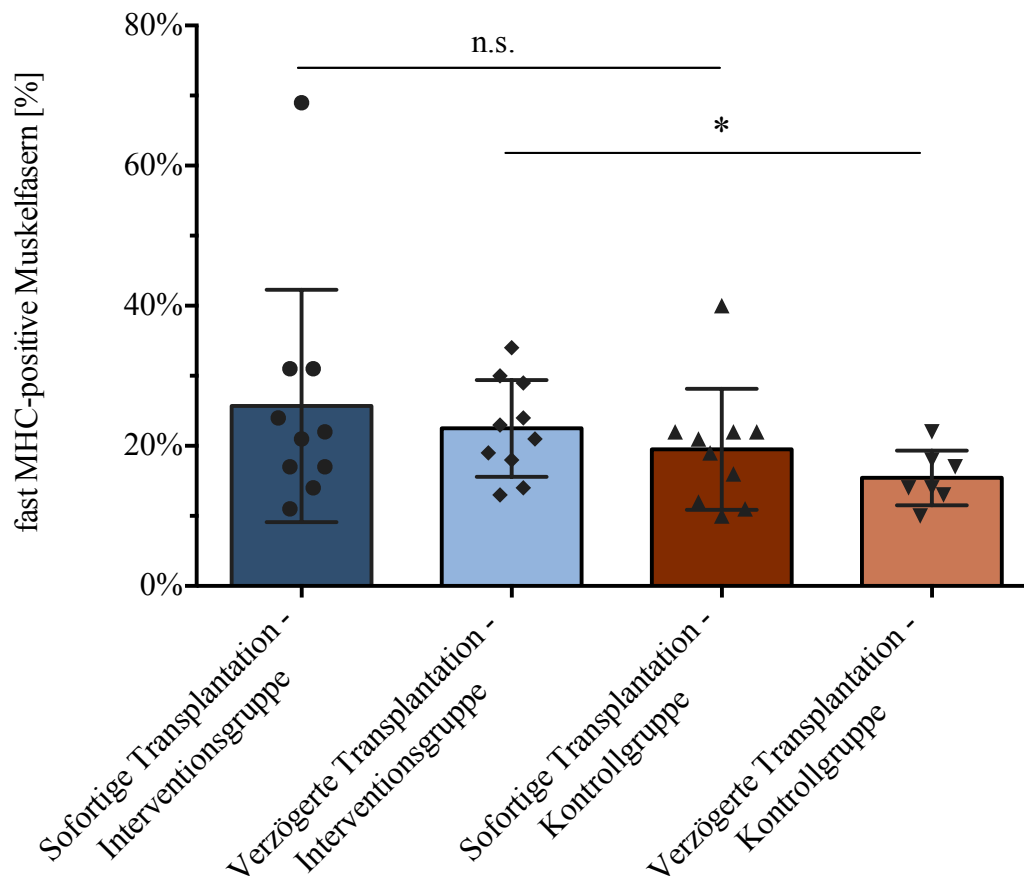


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der fastMHC Fasern bezogen auf die Gesamtzahl der Muskelfasern bei sofortiger (Interventionsgruppe 1) und Transplantation eine Woche nach Trauma (Interventionsgruppe 2). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, nicht signifikante mit n.s.

5.2.3. Einfluss der PLX-Zellen auf das Fibroseareal

Der Einfluss der lokal transplantierten PLX-Zellen auf das posttraumatische Narben- bzw. Bindegewebe wurde mit einer Flächenauswertung untersucht. Dabei ist im Folgenden die Fibrosefläche als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche des Muskels angegeben.

Für die Gruppe der direkt transplantierten Interventionsgruppe 1 zeigt sich eine anteilige Fibrosefläche von $25,1 \pm 7,4\%$. Bei der äquivalenten Kontrollgruppe war dieser Anteil $28,6 \pm 9,5\%$. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen fand sich nicht ($p=0,33$, $U=37$). Bei den Versuchstieren, welche die Transplantation eine Woche nach dem Trauma erhalten haben, ist kein signifikanter Unterschied zu ermitteln ($p=0,49$, $U=28$). Der Flächenanteil der Fibrose

lag für die therapierten Tiere bei $20,6 \pm 1,8\%$ und für die Kontrollgruppe bei $25,7 \pm 13\%$ nach verzögerter Transplantation. In Abbildung 16 ist die Fibrosefläche der Interventions- und Kontrollgruppen dargestellt. Für beide Interventionsgruppen ist an Hand der Messwerte keine Reduktion der Fibrose im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe zu sehen. Der Vergleich der Transplantationszeitpunkte ergibt für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,19, U=33$).

Keine Reduktion der Fibrosefläche nach PLX-Zelltransplantation

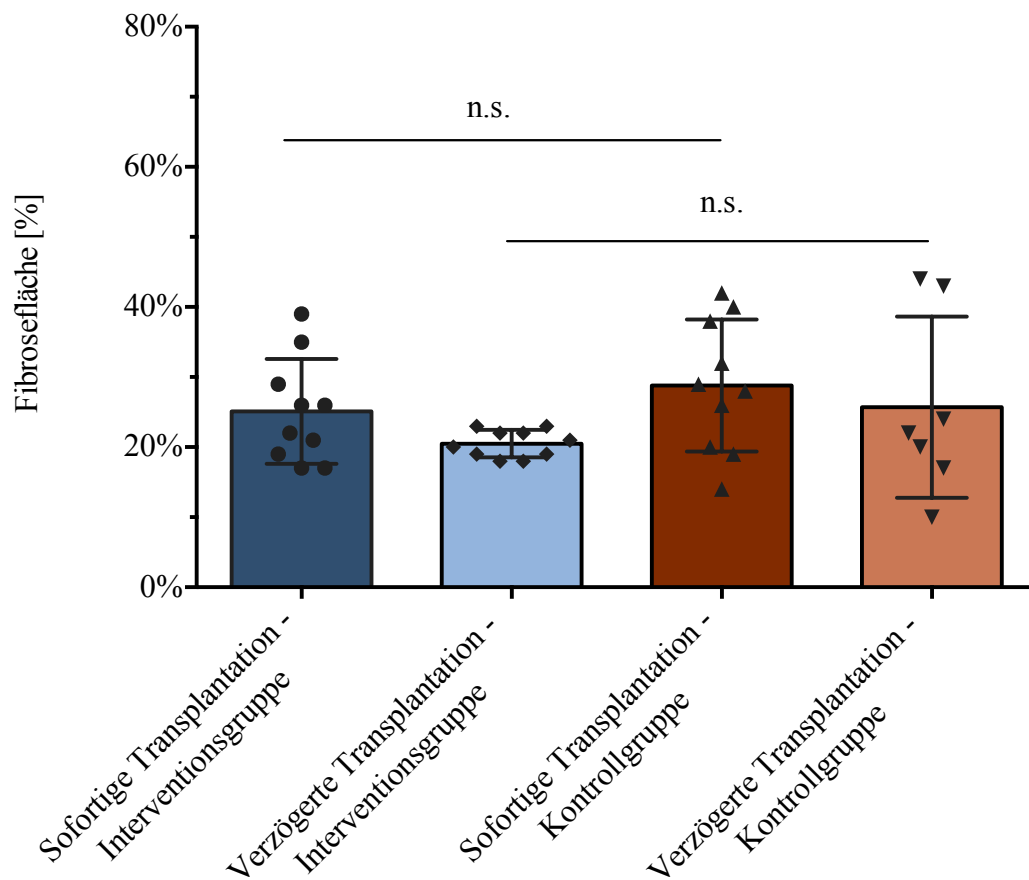


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der Fibrosefläche an der Gesamtmuskelfläche. Vergleich der Mittelwerte der Interventionsgruppen mit den dazugehörigen Kontrollgruppen. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

5.2.4. Einfluss der PLX-Zellen auf die Gefäßdichte

Die quantitative Evaluation der Gefäße erfolgte mittels immunhistochemischer Reaktion mit dem Faktor VIII der Endothelzellen. Die Zahl der Gefäße ist normalisiert auf einen Quadratmillimeter angegeben. Die Auswertung zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl von Gefäßen unabhängig vom Transplantationszeitpunkt der PLX-Zellen. Die sofort transplantierten Tiere der Interventionsgruppe 1 wiesen hier $220,3 \pm 25,2$ Gefäße auf, wohingegen für die Kontrollgruppe nur $161,6 \pm 50,7$ Gefäße gezählt wurden ($p=0,007$, $U=14$). Bei der Interventionsgruppe 2 mit verzögerter Transplantation waren mit $237,1 \pm 22,5$ signifikant mehr Gefäße vorhanden als bei den entsprechenden Kontrolltieren mit $161,1 \pm 44,3$ ($p=0,002$, $U=4$). Der Vergleich der Transplantationszeitpunkte ergibt für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied ($p=0,13$, $U=30$). Abbildung 17 zeigt die Anzahl der Gefäße pro Quadratmillimeter. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Interventions- und dazugehörigen Kontrollgruppen sind markiert und sind für beide Interventionsgruppen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe zu erkennen.

Die Transplantation von PLX-Zellen führt zu einer erhöhten Gefäßdichte

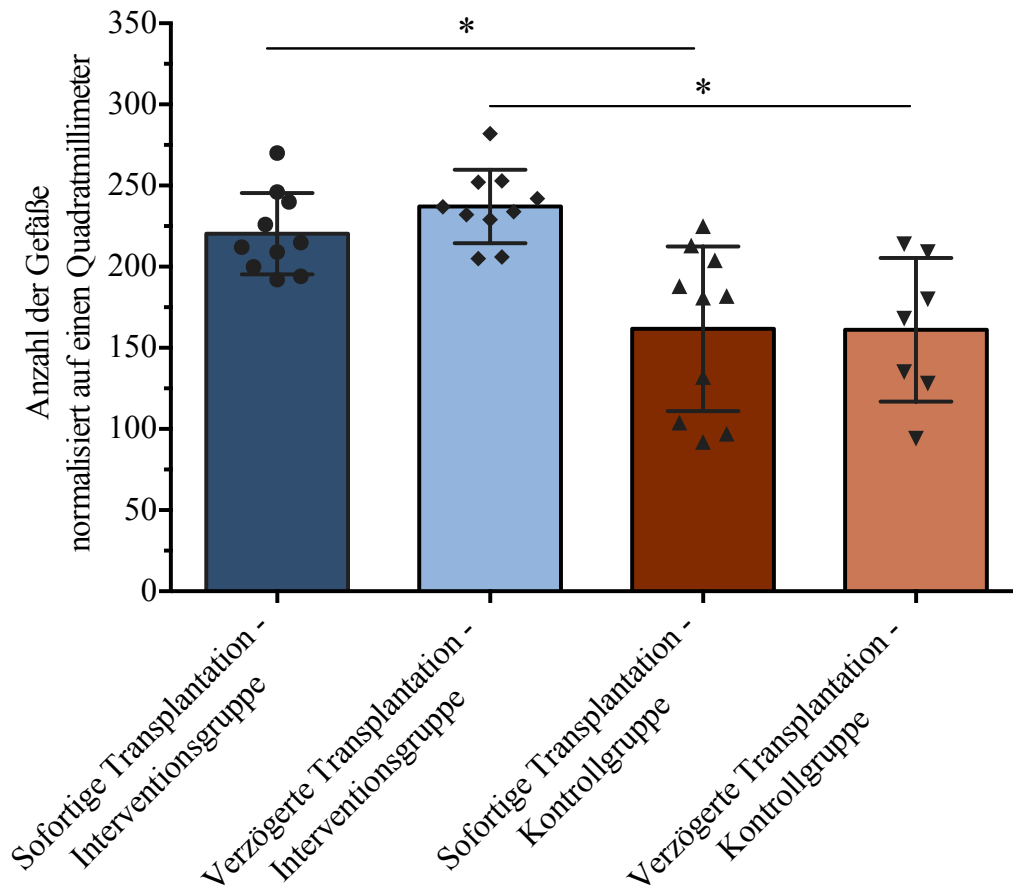


Abbildung 17: Anzahl der Gefäße normalisiert auf einen Quadratmillimeter. Vergleich der Mittelwerte aller Tiere der sofort transplantierten Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierten Interventionsgruppe 2 mit den dazugehörigen Kontrollgruppen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.2.5. Einfluss der PLX-Zellen auf die T-Zell-Infiltration

Zur Beurteilung der Immunreaktion nach der xenogenen Transplantation wurde die Zahl der lokal anwesenden T-Zellen bestimmt. Dabei fand sich in der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation eine durchschnittliche Zellzahl von $2329,9 \pm 2486,9$ und somit signifikant mehr als in der Kontrollgruppe. Für diese wurden $86 \pm 52,6$ T-Zellen gezählt ($p=0,0002$, $U=0$). Auch bei den Versuchstieren, welche die Transplantation der PLX-Zellen eine Woche nach dem Trauma erhalten haben, sind mit $987,4 \pm 572,8$ signifikant mehr T-Zellen vorhanden. Die entsprechende Kontrollgruppe wies nur eine durchschnittliche Zellzahl

von $39,5 \pm 18,9$ auf ($p=0,001$, $U=0$). In Abbildung 18 ist die Anzahl der T-Zellen auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die signifikanten Unterschiede der Interventionsgruppe nach sofortiger und auch verzögerter Transplantation und den dazugehörigen Kontrollgruppen sind markiert. Für beide Interventionsgruppen ist zu erkennen, dass alle erhobenen Werte über denen der entsprechenden Kontrollgruppe liegen. Der Vergleich der Transplantationszeitpunkte ergibt für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied ($p=0,4$, $U=39$).

PLX-Zelltransplantation führt zu einer vermehrten lokalen T-Zell-Antwort

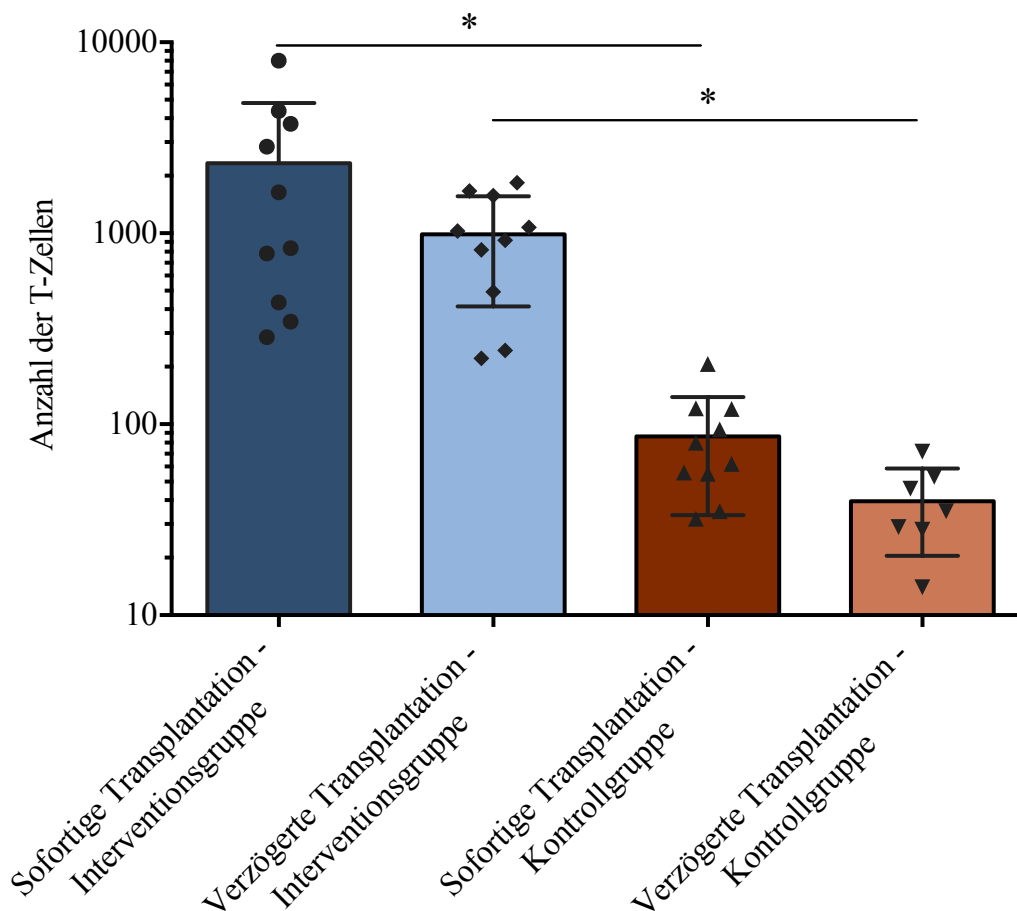


Abbildung 18: Anzahl der T-Zellen auf einer logarithmischen Skala. Dargestellt sind die Mittelwerte der sofort transplantierten Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierten Interventionsgruppe 2 mit den dazugehörigen Kontrollgruppen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.2.6. Einfluss der PLX-Zellen auf die Makrophagen-Infiltration

Die Quantifizierung der Gewebsmakrophagen erfolgte mit Hilfe der CD68-Positivität. Vier Wochen nach Trauma und Transplantation ergab sich bei der Interventionsgruppe 1 eine durchschnittliche Zellzahl von $196,4 \pm 39,5$. In der Kontrollgruppe 1 wurden $158,4 \pm 20,1$ Gewebsmakrophagen gezählt, womit kein signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend ($p=0,054$, $U=24,5$) festzustellen war. Beim Vergleich der Interventionsgruppe 2 mit durchschnittlich $192,3 \pm 32,2$ und der Kontrollgruppe 2 mit $150,6 \pm 31,9$ Gewebsmakrophagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,016$, $U=13$). In Abbildung 19 ist die Anzahl der CD68-positiven Gewebsmakrophagen dargestellt. Der signifikante Unterschied zwischen der Interventionsgruppe mit verzögerter Transplantation und der entsprechenden Kontrollgruppe markiert. Zwischen der Interventionsgruppe 1 nach sofortiger Transplantation und der entsprechenden Kontrollgruppe ist ein Trend zu mehr Gewebsmakrophagen in der Interventionsgruppe zu erkennen. Dieser war nicht signifikant. Der Vergleich der Transplantationszeitpunkte ergab für die mit PLX-Zellen behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied ($p=0,82$, $U=47$).

Signifikant mehr Gewebsmakrophagen bei verzögerter Transplantation

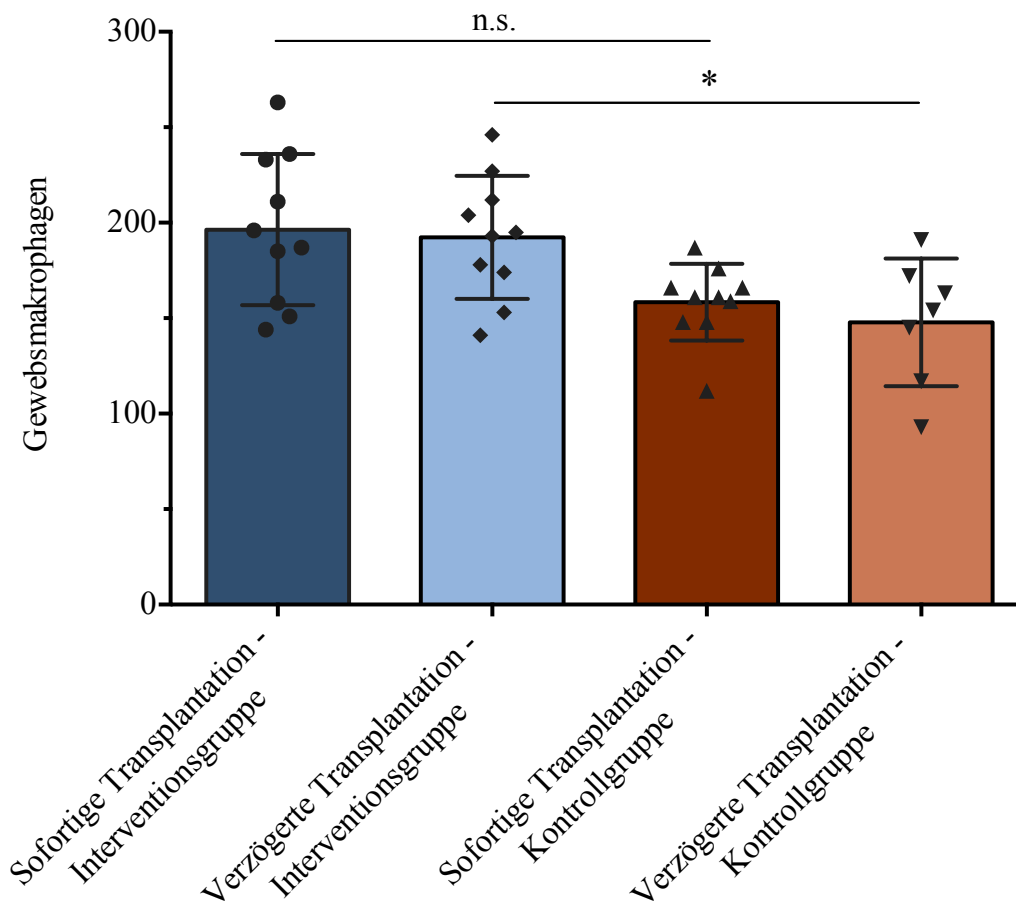


Abbildung 19: Anzahl der CD68-positiven Gewebsmakrophagen. Vergleich der Mittelwerte der sofort transplantierten Interventionsgruppe 1 und verzögert transplantierten Interventionsgruppe 2 mit den dazugehörigen Kontrollgruppen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, nicht signifikante durch n.s.

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In Bezug auf die Regeneration der Kraft konnte sowohl für die sofort, als auch die verzögert transplantierte Gruppe ein signifikanter Kraftzuwachs gegenüber den Kontrollgruppen verzeichnet werden. Für die tetanische Stimulation konnte dies nur für die verzögerte Transplantation gezeigt werden. Nach unmittelbarer Transplantation war zum Auswertungszeitpunkt kein signifikanter Unterschied der Kraft zu messen. Zwischen den Transplantationszeitpunkten bestand kein signifikanter Unterschied.

Für den Anteil der fastMHC- positiven Muskelfasern zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Für die unmittelbare Transplantation war nach vier Wochen kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe zu sehen. Für die verzögerte Transplantation war ein signifikanter Unterschied der Anteile der fMHC-positiven Muskelfasern zu verzeichnen. Es bestand kein signifikanter Unterschied innerhalb der Transplantationszeitpunkte.

Für die Gefäßdichte wurde sowohl für die unmittelbare als auch die verzögerte Transplantation, eine signifikant höhere Dichte bei den behandelten Tieren ermittelt. Zwischen den Transplantationszeitpunkten bestand kein Unterschied.

Dasselbe Muster lag bei der Infiltration durch T-Zellen vor. Sowohl die unmittelbare als auch die verzögerte Transplantation war nach vier Wochen mit einer erhöhten Nachweisbarkeit von T-Zellen verbunden. Unterschiede in den Transplantationszeitpunkten waren nicht zu messen.

Bei der Infiltration durch Makrophagen war nur bei der verzögerten Applikation ein signifikanter Unterschied zu sehen. Für die unmittelbare Transplantation war kein signifikanter Unterschied zwischen der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe zu erkennen. Erneut zeigte sich auch hier kein Unterschied zwischen den Zeitpunkten der Transplantation.

Bei der Betrachtung der Fibrose wurde in allen Vergleichspunkten kein signifikanter Unterschied gesehen.

6. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig präklinisch der Einfluss von menschlichen PLX-Zellen auf die Muskelregeneration untersucht auf Basis eines standardisierten Traumamodells des M. soleus in der Ratte.

6.1. Beurteilung des Traumamodells und des Auswertungszeitpunkts

Das in dieser Arbeit verwendete Traumamodell ist ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes stumpfes Quetschtrauma des M. soleus mit Aussparung der Gefäß- und Nerveninsertion des Muskels [61, 147-149, 195]. Da die Wahl des Traumamodells den Ablauf der Regeneration beeinflusst und somit Implikationen zur möglichen Unterstützung der Regeneration beinhaltet, ist die Anwendung eines möglichst klinisch relevanten Modells von Bedeutung [196]. In der Literatur finden sich verschiedene Verletzungsmodelle, die bei der Untersuchung der Regenerationsfähigkeit der Muskulatur Anwendung finden. Häufig genutzt wird die intramuskuläre Injektion myotoxischer Substanzen um eine Muskelschädigung zu provozieren [196-198]. Scheint diese Art zunächst sehr anwenderfreundlich, da keine offenen Interventionen am Tier vorgenommen werden müssen, ist jedoch die klinische Relevanz und damit die Translationsfähigkeit in Frage zu stellen. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die Schädigung lokal konzentriert bleibt und reversibel ist. Eine vergleichbare klinische Limitation gilt für eine Muskelschädigung durch die Anwendung lokaler Kälte [196]. Die ischämische Schädigung ist eine weitere Option zur Induktion eines Muskeltraumas. Zu unterscheiden sind dabei die dauerhafte und transiente Ischämie. Im Besonderen bei der transienten Ischämie ist die Zeit der Ligatur von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus scheint der Einfluss des Reperfusionsschadens schwer abzuschätzen [199-201]. Eine weitere Möglichkeit ist die mechanische Quetschung des Muskels. Hierbei werden im Wesentlichen zwei Modelle unterschieden - das geschlossene und das offene Trauma. Beim geschlossenen Trauma wird ein Gewicht auf einen Hinterlauf des zu traumatisierenden Tiers fallen gelassen und somit der M. gastrocnemius geschädigt. Dabei kommen verschiedene Fallhöhen und Gewichte zur Anwendung [10, 202, 203] Alternativ wird eine pneumatische Vorrichtung genutzt um ein Trauma zu induzieren [204, 205]. Vorteilhaft hierbei ist, dass keine offene chirurgische Intervention notwendig ist. Somit wird kein weiteres Trauma durch Inzision der darüber liegenden Strukturen gesetzt und auch das Infektionsrisiko ist minimiert. Jedoch ist

bei dieser Art des Quetschtraumas die Steuerung der Verletzung limitiert und eine Schädigung extramuskulärer Strukturen wie Knochen, Nerven oder Gefäße nicht auszuschließen. Frakturierte Knochen werden selten beschrieben, waren aber in einer Studie bei 27% der Tiere zu diagnostizieren [10]. Bei dem in dieser Studie zur Anwendung gekommenen Modell wird eine offene Quetschung mittels Klemme durchgeführt [70, 206, 207]. Der Vorteil dieser Methode ist die gute Steuerbarkeit der Lokalisation sowie die kontrollierte Schädigung des gesamten Muskels. Ausgespart werden kann dabei die Gefäß- und Nerveninsertion und auch knöcherne Strukturen werden nicht in Mitleidenschaft gezogen. Aus diesem Grund ist eine isolierte Quetschung des Muskels möglich, wodurch Störfaktoren minimiert werden. Zu bedenken ist jedoch, dass bei der offen chirurgischen Schädigung nichtsdestotrotz die Gefahr besteht, das umliegende Weichteilgewebe zu verletzen. Hierdurch kann es zu einer zusätzlichen Inflammation und Adhäsion des Muskels an den Weichteilmantel kommen. Dies kann zu Bewegungseinschränkungen führen und die frühzeitige Mobilisation, welche für die Angiogenese von Bedeutung ist, behindern [68]. Eine präzise und vorsichtige Präparation ist daher von enormer Bedeutung. Dies reduziert auch die Gefahr der Schädigung des Gefäß-Nerven-Bündels. Derart geschädigte Tiere können jedoch intraoperativ sicher identifiziert werden und nehmen daher nicht an der Auswertung teil. Zwar wird auch in diesem Modell die Heterogenität des Muskeltraumas im klinischen Alltag nicht gänzlich abgebildet, jedoch ist durch eine präzise Muskelschädigung eine deutliche Reduktion der Störvariablen zu realisieren. Dadurch ist eine isolierte Betrachtung der muskulären Regeneration möglich.

Ebenso von Bedeutung ist die Wahl des Auswertungszeitpunkts. Wie zuvor beschrieben ist die Muskelregeneration ein dynamischer Prozess, der in verschiedenen Phasen abläuft [2, 6, 7]. Bereits nach 14 Tagen konnte nach einem vergleichbaren offenen Quetschtrauma eine deutliche Verbesserung der Muskelkraft erreicht werden und es wird vermutet, dass zu diesem Zeitpunkt auch der Höhepunkt der Muskelregeneration erreicht ist [208]. Als gänzlich abgeschlossen gilt die Regenerationsphase jedoch circa drei bis vier Wochen nach dem Trauma [209]. Daher scheint der hier gewählte Zeitpunkt passend, um valide Ergebnisse zur Muskelregeneration zu erhalten. Für die Translation in die klinische Anwendung ist ein längerer Betrachtungszeitraum zu diskutieren. Zum einen ist hier der Einfluss von Trainingseffekten nach der akuten Regenerationsphase von Interesse. Zum anderen ist eine frühe Mobilisation förderlich für die Angiogenese [68]. Somit ist zu vermuten, dass eine schnelle und effektivere Muskelregeneration durch die Anwendung von PLX-Zellen sich möglicherweise selbst verstärkt und die Basis für ein besseres Ergebnis bei Kraft und

Funktionalität bietet. Darüber hinaus konnten in Studien mit einem längeren Betrachtungszeitraum auch nach zwölf Wochen noch Regeneratfasern nachgewiesen werden [156].

Ebenso wie bei allen genannten Traumamodellen ist auch bei diesem zu bedenken, dass die einseitige Schädigung vorübergehend zu einer verstärkten Belastung der gesunden Gegenseite führen kann. Da die Kraftmessung normalisiert auf das gesunde Bein durchgeführt wurde besteht die Gefahr, dass die Regeneration zu niedrig abgebildet wird. Jedoch sind im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe Bodenkontaktmessungen durchgeführt wurden, die bestätigen, dass die Ratten auch das traumatisierte Bein zügig wieder voll belasten.

Das verwendete Modell ist somit trotz gewisser Einschränkungen geeignet ein klinisch relevantes Trauma abzubilden.

6.2. Einfluss der PLX-Zellen auf die Muskelregeneration

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von menschlichen PLX-Zellen in den geschädigten M. soleus der Ratte die Regeneration des Muskels in Bezug auf die resultierende Kontraktionskraft verbessert. Für die verzögerte Transplantation gilt dies bei beiden Stimulationsarten. Nach der unmittelbaren Transplantation ist eine signifikant bessere Entwicklung der Kraft bei Fast Twitch-Stimulation zu verzeichnen. Bei der tetanischen Stimulation zeigte sich lediglich eine positive Tendenz. Spannenderweise bestätigt dies exakt die Ergebnisse, welche durch die Arbeitsgruppe in einer vorangegangenen Studie mit autologen MSCs der Ratte ermittelt wurden [149].

Der Wirkmechanismus von MSCs und PLX-Zellen, welche auf Grund ihrer vergleichbaren Charakteristika als „mesenchymal-like“ bezeichnet werden, ist viel diskutiert und sicher noch nicht in Gänze verstanden. Es ist erwiesen, dass aus der Plazenta gewonnene Stammzellen das Potential zur unter anderem osteogenen, adipogenen und myogenen Differenzierung besitzen [181, 210-212]. Für markierte und aus dem Knochenmark gewonnene MSCs konnten Ferrari et al. aufzeigen, dass diese mit Muskelfasern fusionieren, jedoch ließ sich daraus keine Aussage über den Nutzen für die Regeneration treffen [54]. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen, die unsere Arbeitsgruppe erhoben hat. Obwohl der Nachweis autologer, aus dem Knochenmark gewonnener MSCs noch sechs Wochen nach Transplantation gelang, wurde keine Migration im geschädigten Areal beobachtet [155]. Zu konstatieren ist hierbei, dass es sich um eine autologe und nicht xenogene Transplantation handelte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die PLX-Zellen vor Transplantation nicht markiert, um ihr biologisches Potential nicht zu kompromittieren. Der Verbleib der Zellen ist somit nicht sicher zu klären, was als Schwäche dieser Arbeit angesehen werden kann. In Vorarbeiten einer anderen Arbeitsgruppe, die PLX-Zellen im Tiermodell zur Behandlung der CLI ebenfalls intramuskulär applizierte, waren diese jedoch nach drei Wochen nicht mehr nachweisbar [183].

Ob eine verstärkte Immunreaktion auf die xenogene Transplantation zu vermuten ist und sich die Hinweise auf den Verbleib daher unterscheiden wird im weiteren Verlauf diskutiert. Festzustellen ist jedoch, dass dies wahrscheinlich keinen negativen Einfluss auf die Muskelregeneration hat.

Aufgrund der indifferenten Ergebnisse wird in Studien postuliert, dass die Wirkung von MSCs und PLX-Zellen nicht durch die Fusion mit vorhandenen Myozyten erfolgt. Unter anderem wird hier die Sekretion von Botenstoffen diskutiert [189, 213]. So konnte von Du et al. *in vitro* gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen, nach Ischämie-Reperfusionstrauma an Epithelzellen des Darms, aus der Plazenta gewonnene MSCs vermehrt IGF-1 sezernieren [213]. Die Sekretion von IGF-1 wurde auch für andere Zelllinien der MSCs, so unter anderem für ADMSCs und BMMSCs, nachgewiesen [214, 215]. Bekannt ist, dass IGF-1 zu einem Anstieg der Muskelmasse führt. Dies lässt sich auf die gesteigerte Proteinsynthese innerhalb des Muskels und die Proliferation von Satellitenzellen und Myoblasten zurückführen. Die gesteigerte Muskelkraft ließ sich sowohl für Muskelfasern des Typs I als auch des Typs II nachweisen [216-220]. Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass die Fibrose und Apoptose der Kardiomyozyten in an Diabetes mellitus erkrankten Ratten durch die Anwendung von IGF-1 reduziert werden konnte [221]. Gnecci et al. konnten darüber hinaus aufzeigen, dass die Präkonditionierung von BMMSCs zu einer erhöhten Expression von IGF-1, VEGF und HGF führte [215].

Im Schlaganfallmodell der Ratte konnte darüber hinaus eine erhöhte Konzentration des HGF nach Transplantation von PMSCs nachgewiesen werden. Chen et al. verabreichten hierzu, nach zweistündiger Okklusion der Arteria cerebri media in der Ratte, intravenös PMSCs. Hier sahen sie eine Reduktion der Apoptose sowie des Infarktareals und eine erhöhte Konzentration von VEGF und HGF im Bereich der Penumbra [175]. HGF befindet sich in seiner inaktiven Form in der Extrazellulärmatrix nahe der Satellitenzellen. Wird HGF durch

ein Trauma in seine aktive Form, überführt, fördert er die Aktivierung der Satellitenzellen [222]. Gal-Levi et al. waren in der Lage, diesen Effekt auch für exogen zugeführten HGF über den c-met-Signalweg im Huhn nachzuweisen [223]. Auch die Anwendung von BMSCs im Schlaganfallmodell führte zu einer verstärkten Sekretion von IGF-1, VEGF und HGF [224]. Spannenderweise wiesen Willoughby et al. einen synergistischen Effekt von HGF und IGF-1 nach. Dazu erfolgte entweder ausschließlich eine Gabe von HGF oder eine sequentielle Applikation von HGF und mit einer Woche Abstand von IGF-1 in den Musculus rectus superior des Hasen. Jeweils eine Woche nach der letzten Anwendung erfolgte die Auswertung. Jene Tiere, die ausschließlich HGF erhalten hatten, zeigten eine erhöhte Anzahl von Satellitenzellen, jedoch konnte keine Verbesserung der Kraft gemessen werden. Nach sequentieller Anwendung von HGF und IGF-1 verzeichneten Willoughby et al. eine erhöhte Anzahl von Satellitenzellen und einen Kraftzuwachs, der auch der einmaligen Injektion von ausschließlich IGF-1 überlegen war. Dies bestätigt zuvor genannte Ergebnisse zum Einfluss von HGF und IGF-1 und verdeutlicht den synergistischen Effekt der beiden von PMSCs sezernierten Faktoren [225].

Als weiterer Wirkmechanismus wird die verstärkte Angiogenese nach Transplantation der PLX-Zellen diskutiert. Im Besonderen in den ersten Wochen der Muskelregeneration ist die Geschwindigkeit der Regeneration in direkter Korrelation mit dem Einsprossen von neuen Gefäßen zu sehen [68]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die unmittelbare, als auch die verzögerte Transplantation der PLX-Zellen, zu einer signifikant erhöhten Gefäßdichte zum Auswertungszeitpunkt führte. Unterschiede zwischen den Transplantationszeitpunkten waren hingegen nicht zu messen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die in anderen Studien erhoben wurden. Prather et al. maßen in einer Studie zum chronischen Ischämiesyndrom der Extremitäten, nach intramuskulärer Transplantation von 1×10^6 PLX-Zellen, eine erhöhte Gefäßdichte sowie einen verbesserten Blutfluss in der geschädigten Extremität [183]. Kinnaird et al. nutzten BMSCs in ihrer Studie zur ischämisch geschädigten Hinterlaufmuskulatur der Maus. Die Transplantation erhöhte die Gefäßdichte und verbesserte die Extremitätenfunktion und verringerte die Muskelatrophie und Fibrosierung. Dies wurde unter anderem auf die Expression von VEGF und FGF durch die MSCs zurückgeführt [226]. Gleichfalls in der Maus wurde eine erhöhte Gefäßdichte im Herzinfarktmodell gesehen. Rajika et al. ligierten den Ramus interventricularis anterior und injizierten im Anschluss PLX-Zellen in das Randgebiet des verursachten Infarkts. Neben der erhöhten Gefäßdichte zeigten sich auch signifikante erhöhte Konzentrationen von Angiopoietin-1 und VEGF [187].

Vergleichbare Ergebnisse erhielten Duran et al., die nach Transplantation von BMSCs im Rahmen eines Myokardinfarkts eine erhöhte Gefäßdichte und verbesserte Regeneration des Myokards beobachteten. Auch ihnen gelang der Nachweis von erhöhten Spiegeln an Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1), VEGF und IGF-1 [227]. Ein ähnliches Sekretionsmuster für SDF-1, VEGF und IGF-1 zeigte sich bei He et al. und ihrem Modell zu Transplantation von ADMSCs nach einem Myokardinfarkt [228]. Bilal et al. applizierten WJMSCs bei Patienten mit einem ST-Hebungsinfarkt direkt in die Koronararterie. Dies verbesserte die linksventrikuläre Pumpfunktion und reduzierte die Infarktgröße. Als grundlegender Mechanismus wird auch hier die Sekretion von VEGF, HGF und Angiopoetin-1 vermutet [229]. Dass PMSCs zur Sekretion von VEGF in der Lage sind, wurde im hier bereits erwähnten Schlaganfallmodell der Ratte nachgewiesen [189]. Der angiogene Effekt von VEGF ist in der Literatur ausführlich beschrieben [230-232]. Interessanterweise sahen Rajika et al. zusätzlich auch eine erhöhte Angiopoetin-1 Konzentration [233]. Dies fördert nicht nur die Angiogenese und die Stabilität der endothelialen Verbindungen, sondern es wurde auch gezeigt, dass VEGF zwar die Angiogenese verstärkt, wenn es isoliert wird, jedoch nicht funktionale Gefäße entstehen. Es wird vermutet, dass Angiopoetin-1 hier einen synergistischen Effekt mit VEGF aufweist [234, 235].

Als weiterer Beitrag zu einer verbesserten Muskelregeneration wird der immunmodulatorische Effekt von MSCs diskutiert. Inflammation und Muskelregeneration sind eng verwobene Vorgänge nach einem Trauma. In der Initialphase direkt nach der Schädigung wird innerhalb von Sekunden das Komplementsystem aktiviert und es werden somit neutrophile Granulozyten angelockt [236]. Zusätzlich infiltrieren Mastzellen das Areal der Schädigung. Durch ihre Degranulation werden Zytokine, unter anderem der TNF- α und Interleukin-1 (IL-1), ausgeschüttet, was ebenso zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt [237]. Diese sezernieren vermehrt proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ , wodurch die erste Phase der Muskelfasernekrose gekennzeichnet ist [238, 239]. Ding et al. konnten in ihrer Studie zum hypoxischen Hirnschaden in der Ratte nach Transplantation von PLX-Zellen signifikant niedrigere Konzentrationen von TNF- α und IFN- γ messen. Die Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 war hingegen erhöht. Dies korrelierte mit einem verbesserten neurologischen Outcome [240]. Ähnliche Ergebnisse zur Suppression der Zytokine TNF- α , IL-6 sowie IL-1 sowie einer verstärkten Expression von IL-10 zeigten Wang et al. in ihrer Arbeit auf. Nach Applikation von menschlichen PMSCs verbesserte sich die Wundheilung einer chirurgisch zugeführten Wunde am Rücken von

Ratten. Dies führten sie wesentlich auf die immunmodulatorischen Effekte der PMSCs zurück [178]. Die Ergebnisse erscheinen vergleichbar mit den Beobachtungen, die zu den Effekten andere MSCs gemacht wurden. Aggarwal et al. beobachteten in einer Kultivierung von BMMSCs mit T-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen, dass diese weniger TNF- α und IFN- γ jedoch mehr IL-10 und IL-4 sezernierten, als die entsprechenden Kontrollen [241]. Auch in vivo wurde im Herzinfarktmodell eine Reduktion von TNF- α , IL-6 und NF- κ B sowie eine Erhöhung der Spiegel an IL-10 durch Transplantation von MSCs nachgewiesen [242].

Neutrophile Granulozyten sind in der initialen Phase nach Trauma eine wesentliche Quelle für Stickstoffmonoxid (NO), welches zu einer weiteren Schädigung der Muskelfasern und Gefäße beitragen kann [243, 244]. Es besteht der Verdacht, dass auch zuvor gesundes Gewebe dadurch geschädigt wird [245]. Raffaghello et al. konnten nachweisen, dass MSCs zur Reduktion des oxidativen Stresses durch neutrophile Granulozyten beitragen, ohne die Phagozytose durch diese negativ zu beeinflussen [246]. In der zweiten Phase der Inflammation sinkt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten deutlich, wohingegen vermehrt Makrophagen nachgewiesen werden können [247, 248]. Während der Muskelregeneration durchlaufen die Makrophagen zwei Phasen, in denen jeweils verschiedene Subtypen nachzuweisen sind. Zunächst werden vermehrt proinflammatorische M1-Makrophagen und im weiteren Verlauf antiinflammatorische M2-Makrophagen gesehen [249, 250]. Die M1-Makrophagen, die für den Abbau des Debris zuständig sind, sezernieren neben NO und TNF- α auch IL-6 und unterhalten somit die Inflammationsreaktion [251, 252]. Bei Zhang et al. führte die intramuskuläre Transplantation von allogenen PMSCs in der Hinterlaufischämie der Maus zu einer signifikanten Reduktion von Makrophagen und Neutrophilen 72 Stunden nach Gefäßligatur. Konsekutiv war auch der Spiegel von TNF- α und IL-6 erniedrigt [169]. Die Anwesenheit von TNF- α und IFN- γ fördert wiederum die Fähigkeit von PMSCs, die Differenzierung von CD4 und CD8-positiven T-Zellen zu induzieren [253]. Während CD8-positiv T-Zellen die Migration der Makrophagen unterstützen, initiieren CD4-positiv T-Zellen den Wechsel von proinflammatorischen M1 zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen. Erhöhte Konzentrationen von IL-4, IL-13 und IL-10 sind die Folge [254, 255]. Roy et al. konnten nachweisen, dass ein verstärktes Vorkommen antiinflammatorischer Zytokine in einer Ko-Kultur von PLX-Zellen und mononukleären Zellen in vitro besteht [187]. Die M2-Makrophagen fördern die Differenzierung von Vorläuferzellen in Myotuben und somit den Eintritt in die nächste Phase der Muskelregeneration [256].

Trotz des oben beschriebenen negativen Einflusses der Inflammation für die Muskelregeneration sind die beteiligten Mediatoren essentiell für eben diese Regeneration. Warren et al. wiesen nach, dass das Fehlen von TNF- α nach Schädigung eines Muskels in der Maus zu einer verschlechterten Muskelregeneration führt. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass dies nicht für IL-6 gilt [257]. Dies steht im Widerspruch zur Arbeit von von Hoene et al., in welcher beschrieben wurde, dass die Abwesenheit von IL-6 in Knockout-Mäusen die myogene Differenzierung negativ beeinflusst [258]. Dies wird unterstützt durch Erkenntnisse von Serrano et al.. IL-6, welches unter anderem von Satellitenzellen und Myozyten beim Muskeltraining freigesetzt wird, scheint an der Proliferation von Satellitenzellen sowie Myoblasten und deren Differenzierung beteiligt [259]. Insgesamt ergibt dies ein indifferentes Bild über die Wirkung von IL-6 auf die Muskelregeneration. Wie bereits erwähnt, kann NO nach einem Trauma zur Schädigung von gesundem Gewebe beitragen. Filippin et al. jedoch fanden Hinweise, dass die Blockierung der Produktion von Stickoxiden in der frühen Phase nach einem Quetschtrauma des M. gastrocnemius der Ratte möglicherweise die Produktion von Fibrose begünstigt [202].

Ähnlich den Makrophagen nehmen bei den T-Zellen verschiedene Subtypen unterschiedliche Funktionen ein. Wie bereits erwähnt, vermitteln CD8-positive T-Zellen die Migration der Makrophagen, wohingegen CD4-positive T-Zellen den Wechsel von M1 zu M2-Makrophagen initiieren. Darüberhinaus führt eine Reduktion von CD8⁺ T-Zellen zu einer verlangsamten Proliferation muskulärer Vorläuferzellen und zu einer verstärkten Myoblastendifferenzierung. Dies geht einher mit dem Auftreten in der frühen Phase der Muskelregeneration, in der eine Proliferation von Vorläuferzellen wesentlich ist [26]. Deutlich länger nach einer Verletzung sind regulatorische T-Zellen (Tregs) nachzuweisen. Burzyn et al. wiesen nach, dass Foxp3⁺CD4⁺-Tregs die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten fördern und wie bereits beschrieben den Typenwechsel von Makrophagen beeinflussen [260].

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die inflammatorische Reaktion nach einem Muskeltrauma die Schädigung auf gesundes Gewebe ausbreiten kann und im Besonderen eine überschießende Reaktion zu einer verschlechterten Restitutio führen würde. Nichtsdestotrotz fördern eben jene Mediatoren der Inflammation auch die Muskelregeneration, sodass diese als unverzichtbar angesehen werden kann.

Die Effekte und Wirkmechanismen der PLX-Zellen und PMSCs in Bezug auf die Angiogenese, Muskelregeneration und Immunmodulation scheinen mit denen anderer MSC-Subpopulationen vergleichbar zu sein, auch wenn Studien zum direkten Vergleich fehlen. Sowohl die Sekretion von Mediatoren wie VEGF, IGF-1 und HGF als auch die immunmodulatorischen Effekte sind in Studien gleichermaßen beschrieben. Ein direkter Vergleich sollte jedoch Gegenstand weiterer Forschung werden, um optimale therapeutische Optionen ausfindig zu machen.

In der vorliegenden Studie maßen wir zum Auswertungszeitpunkt eine signifikant erhöhte Konzentration an Makrophagen nach der verzögerten Transplantation. Nach unmittelbarer Transplantation war ein Trend gegenüber Placebo zu beobachten. Zwischen sofortiger und verzögerter Transplantation bestand kein signifikanter Unterschied. Zu erwähnen ist, dass als Marker CD68⁺ verwendet wurde, sodass keine Aussage über den Subtypen der Makrophagen getroffen werden kann. Eine weitere Untersuchung zu den Subtypen und ihres zeitlichen Verlaufs ist daher sicher von Interesse und das Fehlen hier als Limitation der Arbeit zu sehen. Für die T-Zellen war in beiden Therapiegruppen eine erhöhte lokale Anzahl nachzuweisen. Auch hier ist eine Unterscheidung der Subtypen mit der verwendeten Nachweismethode nicht möglich. Darüber hinaus ist die große Streuung der Daten bei der Erhebung der T-Zellzahl kritisch zu betrachten. In der vorliegenden Arbeit erklären sich diese durch das ausgeprägte Vorkommen in Clustern mit einer hohen Zellzahl. Dies führt möglicherweise zu der großen Streuung der Daten und sollte in weiteren Arbeiten und auch mit einer größeren Stichprobe untersucht und validiert werden. Trotz dessen sind die signifikante Unterschiede zwischen den Interventions- und Kontrollgruppen klar zu erkennen.

Diese Hinweise auf eine weiterhin stattfindende Entzündungsreaktion stehen möglicherweise im Gegensatz zu einigen oben erwähnten Arbeiten, die eine Reduktion der Inflammation beschrieben. Daher bleibt weiter zu untersuchen, inwieweit der beschriebene immunmodulatorische Effekt der PLX-Zellen sich auf die Muskelregeneration auswirkt.

Weiterhin bleibt zu klären, ob die xenogene Transplantation der PLX-Zellen die Immunreaktion verändert und verlängert. Gerade die in der Histologie zu beobachtenden Granulome könnten Abräumbereiche von PLX-Zellen sein. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist aber auch zu vermuten, dass eine mögliche verstärkte Immunantwort von positiven Effekten für die Muskelregeneration begleitet wird. Aussagekräftige Studien zur Immunantwort nach xenogener Transplantation von PLX-Zellen sind limitiert. Consentius et

al. konnten jedoch zeigen, dass die Transplantation von PLX-Zellen mit HLA-Mismatch zu keiner verstärkten T-Zell-Stimulation führte [261]. Fazekasova et al. fanden jedoch Hinweise darauf, dass PMSCs etwas stärker immunogen und weniger immunmodulatorisch waren als aus dem Knochenmark gewonnene MSCs. Hierzu wurden menschliche PMSCs und BMSCs mit allogenen CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurde demselben Versuchsaufbau noch IFN- γ hinzugegeben. Nur die PMSCs, welche zusätzlich mit IFN- γ inkubiert wurden, zeigten eine Aktivierung der T-Zellen. Ebenso zeigte sich eine erhöhte Expression von HLA-DR an den mit IFN- γ behandelten PMSCs. Für BMSCs galt dies nicht. Insgesamt war die immunogene Reaktion aber als schwach einzustufen. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass verschiedene immunologische Expressionsmuster in unterschiedlichen Isolaten der PMSCs gesehen wurden. Die Autoren vermuten, dass dies den differierenden Anteilen von maternalen und fetalen Zellen zuzuschreiben ist [262]. Ob dies die Anwendungsmöglichkeit von PMSCs und PLX-Zellen einschränkt, ist weiter zu untersuchen.

Als weiterer limitierender Faktor für die Muskelregeneration wird die Ausbildung von Fibrose diskutiert. Eine effiziente Muskelregeneration fordert die Infiltration von Fibroblasten, die eine Extrazellulärmatrix (ECM) produzieren. Diese funktioniert als Gerüst für die Entwicklung der neuen Muskelfasern und Gefäße. Wenn jedoch die inflammatorische Reaktion und Fibroblastenaktivierung persistiert, wird vermehrt fibrotisches Gewebe produziert [263-265]. Ein wichtiges Zytokin bei der Formierung von Narbengewebe ist TGF- β . Fukushima et al. behandelten traumatisierte Versuchstiere mit Decorin, welches TGF- β inaktiviert. Dies führte zu einer signifikant verringerten Bildung von Narbengewebe und einer verbesserten Regeneration der Muskelkraft [266].

Die Wirkung von PLX-Zellen auf das Myokard in an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen untersuchten van Linthout et al. in ihrer Studie. Hier konnte eine signifikant niedrigere Konzentration an TGF- β und IFN- γ gemessen werden. Zwar war am Myokard der Mäuse in dieser frühen Phase der Schädigung noch keine Fibrose nachzuweisen, jedoch waren die Splenozyten bereits mit einer höheren Kapazität zur Induktion von Narbenbildung ausgestattet. In der Gruppe, welche PLX-Zellen erhalten hatten, war dies signifikant reduziert, sodass von einer antifibrotischen Wirkung ausgegangen werden kann. Unterstützend zu den zuvor erwähnten Studien wurde auch hier vermehrt VEGF nachgewiesen [188]. Peng et al. wiesen im Herzinfarktmodell auch für BMSCs einen anti-fibrotischen Effekt sowie eine

vermehrte Expression von VEGF nach. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse von Mias et al., die zeigten, dass die Transplantation der MSCs die Produktion von Matrix-Metalloproteasen durch die Fibroblasten günstig beeinflusst und die Ausbildung von fibrotischem Gewebe reduziert [267, 268].

Für ein unter Hypoxie induziertes Medium von PMSCs zeigten Du et al., dass in vivo weniger Kollagen gebildet wurde und die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verringert wurde. Vermutet wird, dass die erhöhten Spiegel von IL-10 die TGF- β induzierte Produktion von ECM verhindert [269]. In dieser Studie wurde kein signifikanter Unterschied in der Fibrosefläche zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gesehen, lediglich eine Tendenz zu weniger Narbengewebe nach Transplantation zeichnete sich ab. Auch zwischen den Transplantationsgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Jedoch ist auch hier zu bedenken, dass keine Unterscheidung bezüglich der Subgruppen von Kollagen getroffen werden kann. Dies könnte interessant sein, da verschiedene Subtypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Regeneration gebildet werden und differierende Charakteristika besitzen [6, 64]. Auch ist in dieser Studie keine Aussage darüber möglich, in welchem Stadium der Narbenbildung wir uns befinden und ob gegebenenfalls eine weitere Organisation und damit Regeneration eintritt.

Gezeigt werden konnte in der vorliegenden Arbeit, dass eine unterschiedliche Verteilung von Typ I und Typ II-Muskelfasern nach Transplantation vorliegt. Während nach unmittelbarer Transplantation der PLX-Zellen kein Unterschied in der Faserverteilung gemessen wurde, waren in den Muskeln der nach einer Woche transplantierten Tiere ein signifikant erhöhter Anteil an schnellen Typ II-Fasern zu messen. Zwischen den Transplantationsgruppen war wiederum kein Unterschied auszumachen. Bereits in einer vorausgegangenen Studie dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Verbesserung der Muskelkraft nach einem Trauma mit einer Typenverschiebung der Muskelfasern von Typ I zu Typ II einhergeht [270].

Regenerierende Muskelfasern exprimieren initial fetales MHC (fetalMHC). Im Anschluss erfolgt ein von nervaler Innervation unabhängiger Wechsel zum adulten fastMHC. Für die weitere Entwicklung zu slowMHC ist die nervale Steuerung jedoch unabdingbar [271]. Jerkovic et al. konnten nachweisen, dass fastMHC als erstes adultes MHC circa drei Tage nach dem Trauma sowohl in innervierten als auch in denervierten Muskeln nachzuweisen ist. Bis dahin war nur fetalMHC gefunden worden. In denervierten Muskeln blieb das fastMHCs

auch weiterhin der dominierende MHC-Typ, wohingegen bei innervierten Muskeln eine Transition zum slowMHC stattfand [272].

Mendler et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss einer Denervation und zusätzlichen Traumas auf die Verteilung der Muskelfasertypen. Drei Monate nach chirurgischer Teilentfernung und Rekonstruktion des N. ischiadicus setzten sie ein chemisches Trauma mit Noxetin. Sowohl drei Monate nach Reinnervation als auch vier Wochen nach dem chemischen Trauma im M. soleus war ein erhöhter Anteil von Typ II-Fasern zu erkennen [273]. Konträr zu diesen Ergebnissen sahen Matsuura et al. einen entgegengesetzten Typenwechsel in der initialen Regenerationsphase nach Schädigung des M. soleus in der Maus durch Cardiotoxin [274]. Bei beiden genannten Studien ist zu beachten, dass es sich um ein chemisches, nicht um ein mechanisches Trauma handelte und die klinische Relevanz somit begrenzt ist.

In Konklusion lässt sich konstatieren, dass in dem genutzten Traumamodell eine verstärkte Muskelregeneration auch mit einem Typenwechsel hin zu schnellen Typ II-Fasern einhergeht. Es ist weiterhin zu vermuten, dass die Anteile sich im weiteren Verlauf wieder angleichen. Dies könnte den Unterschied zwischen der unmittelbar und der verzögert transplantierten Gruppe in Bezug auf den Anteil der schnellen Muskelfasern erklären. Nichtsdestotrotz sind weitere Forschungsbestrebungen in dieser Richtung sinnvoll, da nicht zu klären ist, ob die PLX-Zellen generell einen verstärkten Effekt auf die Muskelregeneration haben oder gegebenenfalls auch einen besonderen Einfluss auf die Expression von fastMHC und somit die Entwicklung von Typ II-Muskelfasern haben. Ebenso von Interesse scheint die Betrachtung der Hybridfasern, die in dieser Studie nicht ausreichend untersucht wurden. Dies ist klar als Limitation der Arbeit zu sehen.

6.3. Beurteilung des Transplantationszeitpunktes

In dieser Arbeit sind in Bezug auf die Kontrollgruppen nur wenige Unterschiede zwischen den Transplantationgruppen auszumachen. Im Gegensatz zur sofortigen Transplantation ist in der Gruppe der verzögerten Gabe ein signifikanter Kraftzuwachs bei tetanischer Stimulation zu sehen. Zusätzlich sind weiterhin vermehrt CD68⁺-Zellen nachzuweisen, wobei hier ein Trend auch nach sofortiger Transplantation zu sehen war. In den weiteren untersuchten Charakteristika waren keine Unterschiede zu sehen. Gleiches gilt, wenn man die Transplantationsgruppen miteinander vergleicht. Kritisch ist hier der Abstand der beiden

Messzeitpunkte in Relation zum Trauma und der Transplantation zu hinterfragen. Diesbezüglich sollten weitere Versuche unternommen werden, ob sich signifikante Unterschiede ergeben, wenn die Transplantationszeitpunkte weiter auseinander liegen oder der Betrachtungszeitraum verändert wird. Darüberhinaus sollte ins Besondere die Langzeitbeobachtung in den Fokus rücken, um evaluieren zu können, ob die Transplantationszeitpunkte einen Effekt auf die langfristigen Ergebnisse der Muskelregeneration hat, da gerade dies für die Klinik als besonders relevant anzusehen ist.

Im Herzinfarktmodell der Ratte führten Jiang et al. einen direkten Vergleich der Transplantationszeitpunkte zwei Stunden, eine Woche und zwei Wochen nach Infarkt durch. Zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte die Applikation von BMMSCs. In allen Gruppen war ein positiver Effekt auf die myokardiale Funktion, die Apoptose und die Gefäßdichte zu sehen. Am stärksten ausgeprägt war der Effekt für die Gruppe, welche die Zellen eine Woche nach dem Infarkt erhalten hatten [275]. Dasselbe Ergebnis erreichten Hu et al., welche ebenso BMMSCs eine Stunde, eine Woche und zwei Wochen nach Trauma transplantierten. Auch hier wurde die größte Verbesserung der myokardialen Funktion und der Gefäßdichte bei der Gruppe gesehen, die ihre Transplantation eine Woche nach dem Trauma erhalten hatte [276]. Inwieweit dies gegebenenfalls auf eine verstärkte Apoptose der transplantierten Zellen durch die initiale Inflammationsreaktion zurückzuführen ist, sollte Gegenstand weiterer Forschungsbestrebungen sein. Nichtsdestotrotz nehmen die MSCs an der Regulation der Immunantwort teil und können hier vermutlich eine überschießende Antwort reduzieren und positive Effekte vermitteln. Dies führt zu der Annahme, dass eine mehrfache Transplantation von MSCs additive Effekte haben kann. Dies ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien.

6.4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Therapie des Skelettmuskeltraumas ist derzeit ein noch ungelöstes Problem in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Sowohl die intrinsische Muskelregeneration als auch die vorhandenen Therapieoptionen sind insuffizient, gerade bei größeren Verletzungen. Erste Ansätze zur Verwendung von autolog oder allogenen transplantierten und aus dem Knochenmark gewonnenen MSCs zeigten positive Effekte. Jedoch löst auch dies das Problem der Verfügbarkeit und invasiven Gewinnung nicht.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die xenogene Transplantation von menschlichen PLX-Zellen einen eindrucksvollen Vorteil bei der Muskelregeneration bietet. Sowohl auf makroskopischer als auch auf mikroskopischer Ebene waren diese Effekte nachzuweisen und bieten Ansatzmöglichkeiten zur Erklärung der regenerativen Kapazität. Insbesondere die parakrinen und immunmodulatorischen Wirkungen scheinen für die verbesserte Muskelregeneration verantwortlich. Auch konnte gezeigt werden, dass diese positiven Effekte sowohl nach sofortiger, als auch nach verzögerter Transplantation, auftraten. Zusätzlich bieten PLX-Zellen den Vorteil, dass sie ohne zusätzliche invasive Maßnahmen gewonnen und gelagert werden können. Eine sofortige und allzeitige Verfügbarkeit ist daher gegeben.

Gegenstand weiterer Forschung sollte die weiterführende Erklärung der Wirkungsweise der PLX-Zellen sein. Darüber hinaus ist von Interesse, ob eine mehrfache Transplantation der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Wirkung noch verstärken kann. Dies wird durch die unterschiedlichen Wirkansätze zu differierenden Zeitpunkten nahe gelegt.

Insgesamt liefert diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Therapie des Muskeltraumas. Die xenogene Transplantation der PLX-Zellen hat einen beeindruckend positiven Effekt auf die Muskelregeneration. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass keine negativen immunologischen Effekte auftraten. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse stellen die hier untersuchten PLX Zellen somit einen erfolgversprechenden Kandidaten für den klinischen Einsatz bei Muskelverletzungen dar. Eine klinische Anwendung erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe bei Patienten zur Regeneration der verletzten Glutealmuskulatur bei Implantation einer Hüft-Totalendoprothese über einen transglutealen Zugang. In dieser Phase I/IIa Studie konnte nach 26 Wochen eine signifikante Verbesserung der isometrischen Kontraktionskraft des ipsilateralen und kontralateralen Musculus gluteus medius in Abhängigkeit der applizierten PLX-Dosis gemessen werden [144]. Die Regeneration traumatisierter Muskulatur durch PLX-Zellen ist auf Basis unserer Vorarbeiten aktuell in Erprobung in Phase III.

Literaturverzeichnis

1. Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, *Muscle injuries and repair: current trends in research*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2002. **84-A(5)**: p. 822-32.
2. Jarvinen, T.A., T.L. Jarvinen, M. Kaariainen, H. Kalimo, and M. Jarvinen, *Muscle injuries: biology and treatment*. Am J Sports Med, 2005. **33(5)**: p. 745-64.
3. Celichowski, J. and K. Grottel, *Twitch/tetanus ratio and its relation to other properties of motor units*. Neuroreport, 1993. **5(3)**: p. 201-4.
4. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Phys Ther, 2001. **81(11)**: p. 1810-6.
5. Junqueira LC, C.J., *Histologie*. Vol. 6. 2004: Springer.
6. Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, *Muscle injuries and repair: current trends in research*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A(5)**: p. 822-32.
7. Jarvinen, T.A., T.L. Jarvinen, M. Kaariainen, V. Aarimaa, S. Vaitinen, H. Kalimo, and M. Jarvinen, *Muscle injuries: optimising recovery*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007. **21(2)**: p. 317-31.
8. Stevenson, M.R., P. Hamer, C.F. Finch, B. Elliot, and M. Kresnow, *Sport, age, and sex specific incidence of sports injuries in Western Australia*. Br J Sports Med, 2000. **34(3)**: p. 188-94.
9. Garrett, W.E., Jr., *Muscle strain injuries*. Am J Sports Med, 1996. **24(6 Suppl)**: p. S2-8.
10. Crisco, J.J., P. Jokl, G.T. Heinen, M.D. Connell, and M.M. Panjabi, *A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology*. Am J Sports Med, 1994. **22(5)**: p. 702-10.
11. Merritt, E.K., 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, and R.P. Farrar, *Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix*. Tissue engineering. Part A, 2010. **16(9)**: p. 2871-81.
12. von Keudell, A.G., M.J. Weaver, P.T. Appleton, D.S. Bae, G.S. Dyer, M. Heng, J.B. Jupiter, and M.S. Vrahas, *Diagnosis and treatment of acute extremity compartment syndrome*. Lancet, 2015. **386(10000)**: p. 1299-310.
13. Berend, K.R., A.V. Lombardi, Jr., B.E. Seng, and J.B. Adams, *Enhanced early outcomes with the anterior supine intermuscular approach in primary total hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 2009. **91 Suppl 6**: p. 107-20.
14. Perka, C., M. Heller, K. Wilke, W.R. Taylor, N.P. Haas, H. Zippel, and G.N. Duda, *Surgical approach influences periprosthetic femoral bone density*. Clin Orthop Relat Res, 2005(432): p. 153-9.
15. Bach, A.D., J.P. Beier, J. Stern-Staeter, and R.E. Horch, *Skeletal muscle tissue engineering*. J Cell Mol Med, 2004. **8(4)**: p. 413-22.
16. Heemskerk, A.M., G.J. Strijkers, M.R. Drost, G.S. van Bochove, and K. Nicolay, *Skeletal muscle degeneration and regeneration after femoral artery ligation in mice: monitoring with diffusion MR imaging*. Radiology, 2007. **243(2)**: p. 413-21.
17. Markert, C.D., M.A. Merrick, T.E. Kirby, and S.T. Devor, *Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration*. Archives of physical medicine and rehabilitation, 2005. **86(7)**: p. 1304-10.
18. Von Rueden, K.T. and J.R. Harris, *Pulmonary dysfunction related to immobility in the trauma patient*. AACN Clin Issues, 1995. **6(2)**: p. 212-28.
19. Mueller-Wohlfahrt, H.W., L. Haensel, K. Mithoefer, J. Ekstrand, B. English, S. McNally, J. Orchard, C.N. van Dijk, G.M. Kerkhoffs, P. Schamasch, D. Blottner, L. Swaerd, E. Goedhart, and P. Ueblacker, *Terminology and classification of muscle*

- injuries in sport: the Munich consensus statement*. Br J Sports Med, 2013. **47**(6): p. 342-50.
20. Hurme, T., H. Kalimo, M. Lehto, and M. Jarvinen, *Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study*. Med Sci Sports Exerc, 1991. **23**(7): p. 801-10.
 21. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. Med Sci Sports Exerc, 1995. **27**(7): p. 1022-32.
 22. St Pierre, B.A. and J.G. Tidball, *Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension*. J Appl Physiol (1985), 1994. **77**(1): p. 290-7.
 23. Toumi, H. and T.M. Best, *The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury?* Br J Sports Med, 2003. **37**(4): p. 284-6.
 24. Saclier, M., S. Cuvellier, M. Magnan, R. Mounier, and B. Chazaud, *Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration*. FEBS J, 2013. **280**(17): p. 4118-30.
 25. Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud, *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
 26. Castiglioni, A., G. Corna, E. Rigamonti, V. Basso, M. Vezzoli, A. Monno, A.E. Almada, A. Mondino, A.J. Wagers, A.A. Manfredi, and 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, 2015. **10**(6): p. e0128094.
 27. Zhang, J., Z. Xiao, C. Qu, W. Cui, X. Wang, and J. Du, *CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1(high) macrophage infiltration*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 5149-60.
 28. Rigamonti, E., T. Touvier, E. Clementi, A.A. Manfredi, S. Brunelli, and P. Rovere-Querini, *Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1767-77.
 29. Ceafalan, L.C., B.O. Popescu, and M.E. Hinescu, *Cellular players in skeletal muscle regeneration*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 957014.
 30. Wernig, A., [*Regeneration capacity of skeletal muscle*]. Ther Umsch, 2003. **60**(7): p. 383-9.
 31. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
 32. Anderson, J.E., C.M. Mitchell, J.K. McGeachie, and M.D. Grounds, *The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice*. Exp Cell Res, 1995. **216**(2): p. 325-34.
 33. Coleman, M.E., F. DeMayo, K.C. Yin, H.M. Lee, R. Geske, C. Montgomery, and R.J. Schwartz, *Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12109-16.
 34. Doumit, M.E., D.R. Cook, and R.A. Merkel, *Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells*. J Cell Physiol, 1993. **157**(2): p. 326-32.
 35. Hayashi, S., H. Aso, K. Watanabe, H. Nara, M.T. Rose, S. Ohwada, and T. Yamaguchi, *Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(5): p. 427-34.

36. Zammit, P.S., J.P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T.A. Partridge, and J.R. Beauchamp, *Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?* J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 347-57.
37. Bischoff, R. and C. Heintz, *Enhancement of skeletal muscle regeneration.* Dev Dyn, 1994. **201**(1): p. 41-54.
38. Hurme, T. and H. Kalimo, *Activation of myogenic precursor cells after muscle injury.* Med Sci Sports Exerc, 1992. **24**(2): p. 197-205.
39. Rantanen, J., T. Hurme, R. Lukka, J. Heino, and H. Kalimo, *Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells.* Lab Invest, 1995. **72**(3): p. 341-7.
40. Srikuea, R., C. Pholpramool, Y. Kitiyanant, and T. Yimlamai, *Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(11): p. 1078-86.
41. Rouger, K., M. Brault, N. Daval, I. Leroux, L. Guigand, J. Lesoeur, B. Fernandez, and Y. Cherel, *Muscle satellite cell heterogeneity: in vitro and in vivo evidences for populations that fuse differently.* Cell Tissue Res, 2004. **317**(3): p. 319-26.
42. Ono, Y., S. Masuda, H.S. Nam, R. Benezra, Y. Miyagoe-Suzuki, and S. Takeda, *Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 5): p. 1309-17.
43. Schultz, E., *Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles.* Dev Biol, 1996. **175**(1): p. 84-94.
44. Peng, H. and J. Huard, *Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair.* Transpl Immunol, 2004. **12**(3-4): p. 311-9.
45. Ceafalan, L.C., B.O. Popescu, and M.E. Hinescu, *Cellular Players in Skeletal Muscle Regeneration.* Biomed Res Int, 2014. **2014**.
46. Asakura, A., P. Seale, A. Girgis-Gabardo, and M.A. Rudnicki, *Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle.* J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 123-34.
47. Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan, *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.* Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
48. Moresi, V., A. Pristera, B.M. Scicchitano, M. Molinaro, L. Teodori, D. Sassoon, S. Adamo, and D. Coletti, *Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response.* Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 997-1008.
49. Mitchell, K.J., A. Pannerec, B. Cadot, A. Parlakian, V. Besson, E.R. Gomes, G. Marazzi, and D.A. Sassoon, *Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 257-66.
50. Tamaki, T., A. Akatsuka, K. Ando, Y. Nakamura, H. Matsuzawa, T. Hotta, R.R. Roy, and V.R. Edgerton, *Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle.* J Cell Biol, 2002. **157**(4): p. 571-7.
51. Tamaki, T., Y. Uchiyama, Y. Okada, T. Ishikawa, M. Sato, A. Akatsuka, and T. Asahara, *Functional recovery of damaged skeletal muscle through synchronized vasculogenesis, myogenesis, and neurogenesis by muscle-derived stem cells.* Circulation, 2005. **112**(18): p. 2857-66.
52. Mu, X., G. Xiang, C.R. Rathbone, H. Pan, I.H. Bellayr, T.J. Walters, and Y. Li, *Slow-adhering stem cells derived from injured skeletal muscle have improved regenerative capacity.* Am J Pathol, 2011. **179**(2): p. 931-41.
53. Galvez, B.G., M. Sampaolesi, S. Brunelli, D. Covarello, M. Gavina, B. Rossi, G. Constantin, Y. Torrente, and G. Cossu, *Complete repair of dystrophic skeletal muscle*

- by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*, 2006. **174**(2): p. 231-43.
54. Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio, *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. *Science*, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.
 55. Bittner, R.E., C. Schofer, K. Weipoltshammer, S. Ivanova, B. Streubel, E. Hauser, M. Freilinger, H. Hoger, A. Elbe-Burger, and F. Wachtler, *Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice*. *Anat Embryol (Berl)*, 1999. **199**(5): p. 391-6.
 56. Brazelton, T.R., M. Nystrom, and H.M. Blau, *Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells*. *Dev Biol*, 2003. **262**(1): p. 64-74.
 57. Palermo, A.T., M.A. Labarge, R. Doyonnas, J. Pomerantz, and H.M. Blau, *Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress*. *Dev Biol*, 2005. **279**(2): p. 336-44.
 58. Aarimaa, V., M. Kaariainen, S. Vaittinen, J. Tanner, T. Jarvinen, T. Best, and H. Kalimo, *Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus*. *Neuromuscul Disord*, 2004. **14**(7): p. 421-8.
 59. Vaittinen, S., T. Hurme, J. Rantanen, and H. Kalimo, *Transected myofibres may remain permanently divided in two parts*. *Neuromuscul Disord*, 2002. **12**(6): p. 584-7.
 60. Jarvinen, M.J. and M.U. Lehto, *The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries*. *Sports Med*, 1993. **15**(2): p. 78-89.
 61. Winkler, T., P. von Roth, G. Matziolis, M.R. Schumann, S. Hahn, P. Strube, G. Stoltenburg-Didinger, C. Perka, G.N. Duda, and S.V. Tohtz, *Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma*. *Acta Orthop*, 2011. **82**(1): p. 102-11.
 62. Ceafalan, L.C., E. Manole, C.P. Tanase, E. Codrici, S. Mihai, A. Gonzalez, and B.O. Popescu, *Interstitial Outburst of Angiogenic Factors During Skeletal Muscle Regeneration After Acute Mechanical Trauma*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2015. **298**(11): p. 1864-79.
 63. Hoier, B., N. Nordsborg, S. Andersen, L. Jensen, L. Nybo, J. Bangsbo, and Y. Hellsten, *Pro- and anti-angiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training*. *J Physiol*, 2012. **590**(3): p. 595-606.
 64. Garg, K., B.T. Corona, and T.J. Walters, *Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 87.
 65. Shefer, G., D.P. Van de Mark, J.B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni, *Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle*. *Dev Biol*, 2006. **294**(1): p. 50-66.
 66. Luz, M.A., M.J. Marques, and H. Santo Neto, *Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells*. *Braz J Med Biol Res*, 2002. **35**(6): p. 691-5.
 67. Dymment, P.G., *Management of minor soft tissue trauma in adolescent athletes*. *J Adolesc Health Care*, 1986. **7**(6 Suppl): p. 133s-135s.
 68. Jarvinen, M., *Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A microangiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth*. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 1976. **84**(1): p. 85-94.
 69. Schaser, K.D., A.C. Disch, J.F. Stover, A. Lauffer, H.J. Bail, and T. Mittlmeier, *Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats*. *Am J Sports Med*, 2007. **35**(1): p. 93-102.

70. Takagi, R., N. Fujita, T. Arakawa, S. Kawada, N. Ishii, and A. Miki, *Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(2): p. 382-8.
71. Thorsson, O., B. Hemdal, B. Lilja, and N. Westlin, *The effect of external pressure on intramuscular blood flow at rest and after running*. Med Sci Sports Exerc, 1987. **19**(5): p. 469-73.
72. Almekinders, L.C. and J.A. Gilbert, *Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication*. Am J Sports Med, 1986. **14**(4): p. 303-8.
73. Almekinders, L.C., *Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies*. Sports Med, 1999. **28**(6): p. 383-8.
74. Thorsson, O., J. Rantanen, T. Hurme, and H. Kalimo, *Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration*. Am J Sports Med, 1998. **26**(2): p. 172-6.
75. Obremsky, W.T., A.V. Seaber, B.M. Ribbeck, and W.E. Garrett, Jr., *Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam*. Am J Sports Med, 1994. **22**(4): p. 558-61.
76. Bily, W. and H. Kern, *[Diagnosis, first aid and classification of muscle injuries in sports medicine]*. Sportverletz Sportschaden, 1998. **12**(3): p. 87-93.
77. Beiner, J.M., P. Jokl, J. Cholewicki, and M.M. Panjabi, *The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury*. Am J Sports Med, 1999. **27**(1): p. 2-9.
78. Best, T.M., B. Loitz-Ramage, D.T. Corr, and R. Vanderby, *Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries. Results in an animal model*. Am J Sports Med, 1998. **26**(3): p. 367-72.
79. Gregorevic, P., G.S. Lynch, and D.A. Williams, *Hyperbaric oxygen improves contractile function of regenerating rat skeletal muscle after myotoxic injury*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(4): p. 1477-82.
80. Rantanen, J., O. Thorsson, P. Wollmer, T. Hurme, and H. Kalimo, *Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury*. Am J Sports Med, 1999. **27**(1): p. 54-9.
81. Jarvinen, T.A., T.L. Jarvinen, M. Kaariainen, V. Aarimaa, S. Vaittinen, H. Kalimo, and M. Jarvinen, *Muscle injuries: optimising recovery*. Best practice & research. Clinical rheumatology, 2007. **21**(2): p. 317-31.
82. Almekinders, L.C., *Results of surgical repair versus splinting of experimentally transected muscle*. J Orthop Trauma, 1991. **5**(2): p. 173-6.
83. Menetrey, J., C. Kasemkijwattana, F.H. Fu, M.S. Moreland, and J. Huard, *Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model*. Am J Sports Med, 1999. **27**(2): p. 222-9.
84. Nozaki, M., S. Ota, S. Terada, Y. Li, K. Uehara, B. Gharaibeh, F.H. Fu, and J. Huard, *Timing of the administration of suramin treatment after muscle injury*. Muscle Nerve, 2012. **46**(1): p. 70-9.
85. Chan, Y.S., Y. Li, W. Foster, T. Horaguchi, G. Somogyi, F.H. Fu, and J. Huard, *Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(2): p. 771-80.
86. Chan, Y.S., Y. Li, W. Foster, F.H. Fu, and J. Huard, *The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury*. Am J Sports Med, 2005. **33**(1): p. 43-51.
87. Foster, W., Y. Li, A. Usas, G. Somogyi, and J. Huard, *Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle*. J Orthop Res, 2003. **21**(5): p. 798-804.

88. Jarvinen, T.A. and E. Ruoslahti, *Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21671-6.
89. Gharaibeh, B., Y. Chun-Lansinger, T. Hagen, S.J. Ingham, V. Wright, F. Fu, and J. Huard, *Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2012. **96**(1): p. 82-94.
90. Sacco, A., R. Doyonnas, P. Kraft, S. Vitorovic, and H.M. Blau, *Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 502-6.
91. Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, and M. Buckingham, *Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration*. Science, 2005. **309**(5743): p. 2064-7.
92. Biressi, S. and T.A. Rando, *Heterogeneity in the muscle satellite cell population*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(8): p. 845-54.
93. Fan, Y., M. Maley, M. Beilharz, and M. Grounds, *Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy*. Muscle Nerve, 1996. **19**(7): p. 853-60.
94. Friedenstein, A.J., K.V. Petrakova, A.I. Kurolesova, and G.P. Frolova, *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
95. Battula, V.L., S. Treml, P.M. Bareiss, F. Gieseke, H. Roelofs, P. de Zwart, I. Muller, B. Schewe, T. Skutella, W.E. Fibbe, L. Kanz, and H.J. Bühring, *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. Haematologica, 2009. **94**(2): p. 173-84.
96. Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
97. Katz, A.J., A. Tholpady, S.S. Tholpady, H. Shang, and R.C. Ogle, *Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 412-23.
98. Kassis, I., L. Zangi, R. Rivkin, L. Levdansky, S. Samuel, G. Marx, and R. Gorodetsky, *Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(10): p. 967-76.
99. Chen, Y.T., J.D. Wei, J.P. Wang, H.H. Lee, E.R. Chiang, H.C. Lai, L.L. Chen, Y.T. Lee, C.C. Tsai, C.L. Liu, and S.C. Hung, *Isolation of mesenchymal stem cells from human ligamentum flavum: implicating etiology of ligamentum flavum hypertrophy*. Spine (Phila Pa 1976), 2011. **36**(18): p. E1193-200.
100. Marongiu, F., R. Gramignoli, Q. Sun, V. Tahan, T. Miki, K. Dorko, E. Ellis, and S.C. Strom, *Isolation of amniotic mesenchymal stem cells*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2010. **Chapter 1**: p. Unit 1E.5.
101. Poloni, A., V. Rosini, E. Mondini, G. Maurizi, S. Mancini, G. Discepoli, S. Biasio, G. Battaglini, E. Berardinelli, F. Serrani, and P. Leoni, *Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta*. Cytotherapy, 2008. **10**(7): p. 690-7.
102. Miao, Z., J. Jin, L. Chen, J. Zhu, W. Huang, J. Zhao, H. Qian, and X. Zhang, *Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell Biol Int, 2006. **30**(9): p. 681-7.
103. Girdlestone, J., V.A. Limbani, A.J. Cutler, and C.V. Navarrete, *Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions*. Cytotherapy, 2009. **11**(6): p. 738-48.

104. Zeddou, M., A. Briquet, B. Relic, C. Josse, M.G. Malaise, A. Gothot, C. Lechanteur, and Y. Beguin, *The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood*. Cell Biol Int, 2010. **34**(7): p. 693-701.
105. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 235-42.
106. Hass, R., C. Kasper, S. Böhm, and R. Jacobs, *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
107. Heo, J.S., Y. Choi, H.S. Kim, and H.O. Kim, *Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue*. Int J Mol Med, 2016. **37**(1): p. 115-25.
108. Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
109. Zhou, S., J.S. Greenberger, M.W. Epperly, J.P. Goff, C. Adler, M.S. Leboff, and J. Glowacki, *Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts*. Aging Cell, 2008. **7**(3): p. 335-43.
110. Pittenger, M., P. Vanguri, D. Simonetti, and R. Young, *Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**(4): p. 309-20.
111. Horwitz, E.M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, R.J. Deans, D.S. Krause, and A. Keating, *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
112. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
113. Mafi, R., S. Hindocha, P. Mafi, M. Griffin, and W.S. Khan, *Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature*. Open Orthop J, 2011. **5 Suppl 2**: p. 242-8.
114. Caplan, A.I., *The mesengenic process*. Clin Plast Surg, 1994. **21**(3): p. 429-35.
115. Sekiya, I., B.L. Larson, J.R. Smith, R. Pochampally, J.G. Cui, and D.J. Prockop, *Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality*. Stem Cells, 2002. **20**(6): p. 530-41.
116. Spitkovsky, D. and J. Hescheler, *Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2008. **17**(2): p. 79-90.
117. Psaltis, P.J., A.C. Zannettino, S.G. Worthley, and S. Gronthos, *Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2201-10.
118. Berebichez-Fridman, R. and P.R. Montero-Olvera, *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2018. **18**(3): p. e264-e277.
119. Vassilopoulos, G., P.R. Wang, and D.W. Russell, *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 901-4.
120. Sato, Y., H. Araki, J. Kato, K. Nakamura, Y. Kawano, M. Kobune, T. Sato, K. Miyanishi, T. Takayama, M. Takahashi, R. Takimoto, S. Iyama, T. Matsunaga, S. Ohtani, A. Matsuura, H. Hamada, and Y. Niitsu, *Human mesenchymal stem cells*

- xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion.* Blood, 2005. **106**(2): p. 756-63.
121. Nahar, S., Y. Nakashima, C. Miyagi-Shiohira, T. Kinjo, Z. Toyoda, N. Kobayashi, I. Saitoh, M. Watanabe, H. Noguchi, and J. Fujita, *Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease.* World J Stem Cells, 2018. **10**(11): p. 146-159.
 122. Okada, M., N. Ishkitiev, K. Yaegaki, T. Imai, T. Tanaka, M. Fukuda, S. Ono, and M. Haapasalo, *Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells.* Int Endod J, 2014. **47**(12): p. 1142-50.
 123. Ishkitiev, N., K. Yaegaki, B. Calenic, T. Nakahara, H. Ishikawa, V. Mitiev, and M. Haapasalo, *Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro.* J Endod, 2010. **36**(3): p. 469-74.
 124. Abdallah, B.M. and M. Kassem, *The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives.* J Cell Physiol, 2009. **218**(1): p. 9-12.
 125. Bang, O.Y., J.S. Lee, P.H. Lee, and G. Lee, *Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients.* Ann Neurol, 2005. **57**(6): p. 874-82.
 126. Mantovani, C., D. Mahay, M. Kingham, G. Terenghi, S.G. Shawcross, and M. Wiberg, *Bone marrow- and adipose-derived stem cells show expression of myelin mRNAs and proteins.* Regen Med, 2010. **5**(3): p. 403-10.
 127. Kingham, P.J., D.F. Kalbermatten, D. Mahay, S.J. Armstrong, M. Wiberg, and G. Terenghi, *Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro.* Exp Neurol, 2007. **207**(2): p. 267-74.
 128. Lopatina, T., N. Kalinina, M. Karagyaur, D. Stambolsky, K. Rubina, A. Revischin, G. Pavlova, Y. Parfyonova, and V. Tkachuk, *Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17899.
 129. Mohammadi, R., S. Azizi, N. Delirezh, R. Hobbenaghi, and K. Amini, *Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration.* Muscle Nerve, 2011. **43**(2): p. 157-63.
 130. Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M.E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R.M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, and O. Ringdén, *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study.* Lancet, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
 131. Wang, D., H. Zhang, J. Liang, X. Li, X. Feng, H. Wang, B. Hua, B. Liu, L. Lu, G.S. Gilkeson, R.M. Silver, W. Chen, S. Shi, and L. Sun, *Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience.* Cell Transplant, 2013. **22**(12): p. 2267-77.
 132. Zhang, Y., J. Ding, S. Ren, W. Wang, Y. Yang, S. Li, M. Meng, T. Wu, D. Liu, S. Tian, H. Tian, S. Chen, and C. Zhou, *Intravenous infusion of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for patients with COVID-19 pneumonia.* Stem Cell Res Ther, 2020. **11**(1): p. 207.
 133. Shu, L., C. Niu, R. Li, T. Huang, Y. Wang, M. Huang, N. Ji, Y. Zheng, X. Chen, L. Shi, M. Wu, K. Deng, J. Wei, X. Wang, Y. Cao, J. Yan, and G. Feng, *Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells.* Stem Cell Res Ther, 2020. **11**(1): p. 361.

134. Gussoni, E., G.K. Pavlath, A.M. Lanctot, K.R. Sharma, R.G. Miller, L. Steinman, and H.M. Blau, *Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation*. *Nature*, 1992. **356**(6368): p. 435-8.
135. Partridge, T.A., J.E. Morgan, G.R. Coulton, E.P. Hoffman, and L.M. Kunkel, *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts*. *Nature*, 1989. **337**(6203): p. 176-9.
136. Amado, L.C., A.P. Saliaris, K.H. Schuleri, M. St John, J.S. Xie, S. Cattaneo, D.J. Durand, T. Fitton, J.Q. Kuang, G. Stewart, S. Lehrke, W.W. Baumgartner, B.J. Martin, A.W. Heldman, and J.M. Hare, *Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11474-9.
137. Amado, L.C., K.H. Schuleri, A.P. Saliaris, A.J. Boyle, R. Helm, B. Oskouei, M. Centola, V. Eneboe, R. Young, J.A. Lima, A.C. Lardo, A.W. Heldman, and J.M. Hare, *Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(10): p. 2116-24.
138. Zhang, J., Y. Wu, A. Chen, and Q. Zhao, *Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization*. *Cell Physiol Biochem*, 2015. **35**(3): p. 1219-29.
139. Wollert, K.C., G.P. Meyer, J. Lotz, S. Ringes-Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, D. Messinger, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser, and H. Drexler, *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9429): p. 141-8.
140. Sürder, D., R. Manka, T. Moccetti, V. Lo Cicero, M.Y. Emmert, C. Klersy, S. Soncin, L. Turchetto, M. Radrizzani, M. Zuber, S. Windecker, A. Moschovitis, I. Bühler, S. Kozerke, P. Erne, T.F. Lüscher, and R. Corti, *Effect of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Treatment, Early or Late After Acute Myocardial Infarction: Twelve Months CMR and Long-Term Clinical Results*. *Circ Res*, 2016. **119**(3): p. 481-90.
141. Traverse, J.H., T.D. Henry, C.J. Pepine, J.T. Willerson, A. Chugh, P.C. Yang, D.X.M. Zhao, S.G. Ellis, J.R. Forder, E.C. Perin, M.S. Penn, A.K. Hatzopoulos, J.C. Chambers, K.W. Baran, G. Raveendran, A.P. Gee, D.A. Taylor, L. Moyé, R.F. Ebert, and R.D. Simari, *TIME Trial: Effect of Timing of Stem Cell Delivery Following ST-Elevation Myocardial Infarction on the Recovery of Global and Regional Left Ventricular Function: Final 2-Year Analysis*. *Circ Res*, 2018. **122**(3): p. 479-488.
142. Perin, E.C., R. Sanz-Ruiz, P.L. Sánchez, J. Lasso, R. Pérez-Cano, J.C. Alonso-Farto, E. Pérez-David, M.E. Fernández-Santos, P.W. Serruys, H.J. Duckers, J. Kastrup, S. Chamuleau, Y. Zheng, G.V. Silva, J.T. Willerson, and F. Fernández-Avilés, *Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial*. *Am Heart J*, 2014. **168**(1): p. 88-95.e2.
143. Gao, L.R., Y. Chen, N.K. Zhang, X.L. Yang, H.L. Liu, Z.G. Wang, X.Y. Yan, Y. Wang, Z.M. Zhu, T.C. Li, L.H. Wang, H.Y. Chen, Y.D. Chen, C.L. Huang, P. Qu, C. Yao, B. Wang, G.H. Chen, Z.M. Wang, Z.Y. Xu, J. Bai, D. Lu, Y.H. Shen, F. Guo, M.Y. Liu, Y. Yang, Y.C. Ding, Y. Yang, H.T. Tian, Q.A. Ding, L.N. Li, X.C. Yang, and X. Hu, *Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial*. *BMC Med*, 2015. **13**: p. 162.
144. Rodriguez, A.M., D. Pisani, C.A. Dechesne, C. Turc-Carel, J.Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J.P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, and C. Dani, *Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue*

- induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse.* J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1397-405.
145. Vieira, N.M., M. Valadares, E. Zucconi, M. Secco, C.R. Bueno, Jr., V. Brandalise, A. Assoni, J. Gomes, V. Landini, T. Andrade, H.V. Caetano, M. Vainzof, and M. Zatz, *Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin.* Cell Transplant, 2012. **21**(7): p. 1407-17.
 146. Klimczak, A., A. Zimna, A. Malcher, U. Kozłowska, K. Futoma, J. Czarnota, P. Kemnitz, A. Bryl, and M. Kurpisz, *Co-Transplantation of Bone Marrow-MSCs and Myogenic Stem/Progenitor Cells from Adult Donors Improves Muscle Function of Patients with Duchenne Muscular Dystrophy.* Cells, 2020. **9**(5).
 147. Matziolis, G., T. Winkler, K. Schaser, M. Wiemann, D. Krocker, J. Tuischer, C. Perka, and G.N. Duda, *Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats.* Tissue Eng, 2006. **12**(2): p. 361-7.
 148. Winkler, T., P. von Roth, G. Matziolis, M. Mehta, C. Perka, and 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, 2009. **15**(3): p. 487-92.
 149. Winkler, T., P. von Roth, P. Radojewski, A. Urbanski, S. Hahn, B. Preininger, G.N. Duda, and C. Perka, *Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats.* J Tissue Eng Regen Med, 2012. **6 Suppl 3**: p. s60-7.
 150. Andrade, B.M., M.R. Baldanza, K.C. Ribeiro, A. Porto, R. Pecanha, F.S. Fortes, G. Zapata-Sudo, A.C. Campos-de-Carvalho, R.C. Goldenberg, and J.P. Werneck-de-Castro, *Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model.* PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127561.
 151. Oh, J.H., S.W. Chung, S.H. Kim, J.Y. Chung, and J.Y. Kim, *2013 Neer Award: Effect of the adipose-derived stem cell for the improvement of fatty degeneration and rotator cuff healing in rabbit model.* J Shoulder Elbow Surg, 2014. **23**(4): p. 445-55.
 152. Gumucio, J.P., M.D. Flood, S.M. Roche, K.B. Sugg, A.O. Momoh, P.E. Kosnik, A. Bedi, and C.L. Mendias, *Stromal vascular stem cell treatment decreases muscle fibrosis following chronic rotator cuff tear.* Int Orthop, 2016. **40**(4): p. 759-64.
 153. Peçanha, R., L.L. Bagno, 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, and J.P. Saer Werneck-de-Castro, *Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury.* J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(7): p. 609-17.
 154. Moussa, M.H., G.G. Hamam, A.E. Abd Elaziz, M.A. Rahoma, A.A. Abd El Samad, D.A.A. El-Waseef, and M.A. Hegazy, *Comparative Study on Bone Marrow-Versus Adipose-Derived Stem Cells on Regeneration and Re-Innervation of Skeletal Muscle Injury in Wistar Rats.* Tissue Eng Regen Med, 2020. **17**(6): p. 887-900.
 155. Winkler, T., P. von Roth, M.R. Schuman, K. Sieland, G. Stoltenburg-Didinger, M. Taupitz, C. Perka, G.N. Duda, and G. Matziolis, *In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats.* Tissue Eng Part A, 2008. **14**(7): p. 1149-60.
 156. Natsu, K., M. Ochi, Y. Mochizuki, H. Hachisuka, S. Yanada, and Y. Yasunaga, *Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers.* Tissue Eng, 2004. **10**(7-8): p. 1093-112.
 157. Gneccchi, M., Z. Zhang, A. Ni, and V.J. Dzau, *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.* Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1204-19.

158. Sassoli, C., S. Zecchi-Orlandini, and L. Formigli, *Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration*. *Cells*, 2012. **1**(4): p. 832-50.
159. Murphy, M.B., K. Moncivais, and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine*. *Exp Mol Med*, 2013. **45**: p. e54.
160. Le Blanc, K. and L.C. Davies, *Mesenchymal stromal cells and the innate immune response*. *Immunol Lett*, 2015. **168**(2): p. 140-6.
161. Fang, B., Y.P. Song, L.M. Liao, Q. Han, and R.C. Zhao, *Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *Bone Marrow Transplant*, 2006. **38**(5): p. 389-90.
162. Qu-Petersen, Z., B. Deasy, R. Jankowski, M. Ikezawa, J. Cummins, R. Pruchnic, J. Mytinger, B. Cao, C. Gates, A. Wernig, and J. Huard, *Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(5): p. 851-64.
163. Zvaifler, N.J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C.J. Edwards, J. Moss, J.A. Burger, and R.N. Maini, *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. *Arthritis Res*, 2000. **2**(6): p. 477-88.
164. In 't Anker, P.S., S.A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, G.M. de Groot-Swings, F.H. Claas, W.E. Fibbe, and H.H. Kanhai, *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
165. Bailo, M., M. Soncini, E. Vertua, P.B. Signoroni, S. Sanzone, G. Lombardi, D. Arienti, F. Calamani, D. Zatti, P. Paul, A. Albertini, F. Zorzi, A. Cavagnini, F. Candotti, G.S. Wengler, and O. Parolini, *Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta*. *Transplantation*, 2004. **78**(10): p. 1439-48.
166. Troyer, D.L. and M.L. Weiss, *Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population*. *Stem Cells*, 2008. **26**(3): p. 591-9.
167. Papait, A., E. Vertua, M. Magatti, S. Ceccariglia, S. De Munari, A.R. Silini, M. Sheleg, R. Ofir, and O. Parolini, *Mesenchymal Stromal Cells from Fetal and Maternal Placenta Possess Key Similarities and Differences: Potential Implications for Their Applications in Regenerative Medicine*. *Cells*, 2020. **9**(1).
168. Chen, H.J., C.H. Chen, M.Y. Chang, D.C. Tsai, E.Z. Baum, R. Hariri, U. Herzberg, and P.C. Hsieh, *Human placenta-derived adherent cells improve cardiac performance in mice with chronic heart failure*. *Stem Cells Transl Med*, 2015. **4**(3): p. 269-75.
169. Zhang, B., T.M. Adesanya, L. Zhang, N. Xie, Z. Chen, M. Fu, J. Zhang, J. Zhang, T. Tan, A. Kilic, Z. Li, H. Zhu, and X. Xie, *Delivery of placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorates ischemia induced limb injury by immunomodulation*. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **34**(6): p. 1998-2006.
170. Arakawa, R., R. Aoki, M. Arakawa, and K. Saito, *Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential*. *Cell Tissue Res*, 2012. **348**(1): p. 189-97.
171. Xie, N., Z. Li, T.M. Adesanya, W. Guo, Y. Liu, M. Fu, A. Kilic, T. Tan, H. Zhu, and X. Xie, *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells enhances angiogenesis after ischemic limb injury in mice*. *J Cell Mol Med*, 2016. **20**(1): p. 29-37.
172. Yin, T., S. He, C. Su, X. Chen, D. Zhang, Y. Wan, T. Ye, G. Shen, Y. Wang, H. Shi, L. Yang, and Y. Wei, *Genetically modified human placenta-derived mesenchymal stem cells with FGF2 and PDGFBB enhance neovascularization in a model of hindlimb ischemia*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(4): p. 5093-9.
173. Komaki, M., Y. Numata, C. Morioka, I. Honda, M. Tooi, N. Yokoyama, H. Ayame, K. Iwasaki, A. Taki, N. Oshima, and I. Morita, *Exosomes of human placenta-derived*

- mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 219.
174. Kranz, A., D.C. Wagner, M. Kamprad, M. Scholz, U.R. Schmidt, F. Nitzsche, Z. Aberman, F. Emmrich, U.M. Riegelsberger, and J. Boltze, *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats*. Brain Res, 2010. **1315**: p. 128-36.
 175. Chen, J., A. Shehadah, A. Pal, A. Zacharek, X. Cui, Y. Cui, C. Roberts, M. Lu, A. Zeitlin, R. Hariri, and M. Chopp, *Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats*. Cell Transplant, 2013. **22**(5): p. 871-9.
 176. Barzegar, M., Y. Wang, R.S. Eshaq, J.W. Yun, C.J. Boyer, S.G. Cananzi, L.A. White, O. Chernyshev, R.E. Kelley, A. Minagar, K.Y. Stokes, X.H. Lu, and J.S. Alexander, *Human placental mesenchymal stem cells improve stroke outcomes via extracellular vesicles-mediated preservation of cerebral blood flow*. EBioMedicine, 2021. **63**: p. 103161.
 177. Choi, B.Y., O.J. Kim, S.H. Min, J.H. Jeong, S.W. Suh, and T.N. Chung, *Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Mortality and Hematoma Size in a Rat Intracerebral Hemorrhage Model in an Acute Phase*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 1658195.
 178. Wang, H., L. Chen, Y. Liu, B. Luo, N. Xie, T. Tan, L. Song, P. Erli, and M. Luo, *Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure through immunomodulation*. Am J Transl Res, 2016. **8**(11): p. 4912-4921.
 179. Lin, S.C., Y.M. Liou, T.Y. Ling, Y.H. Chuang, and B.L. Chiang, *Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce the Interleukin-5 Level Experimentally in Children with Asthma*. Int J Med Sci, 2019. **16**(11): p. 1430-1438.
 180. Liu, J., X. Lu, Y. Lou, Y. Cai, W. Cui, J. Wang, P. Nie, L. Chen, B. Li, and P. Luo, *Xenogeneic Transplantation of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviates Renal Injury and Reduces Inflammation in a Mouse Model of Lupus Nephritis*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 9370919.
 181. Li, X., J. Bai, X. Ji, R. Li, Y. Xuan, and Y. Wang, *Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation*. Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 695-704.
 182. Winkler, T., 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, and H.D. Volk, *Immunomodulatory placental-expanded, mesenchymal stromal cells improve muscle function following hip arthroplasty*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2018. **9**(5): p. 880-897.
 183. Prather, W.R., A. Toren, M. Meiron, R. Ofir, C. Tschope, and E.M. Horwitz, *The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia*. Cytotherapy, 2009. **11**(4): p. 427-34.
 184. Ramot, Y., M. Meiron, A. Toren, M. Steiner, and A. Nyska, *Safety and biodistribution profile of placental-derived mesenchymal stromal cells (PLX-PAD) following intramuscular delivery*. Toxicol Pathol, 2009. **37**(5): p. 606-16.
 185. Zahavi-Goldstein, E., M. Blumenfeld, D. Fuchs-Telem, L. Pinzur, S. Rubin, Z. Aberman, N. Sher, and R. Ofir, *Placenta-derived PLX-PAD mesenchymal-like stromal cells are efficacious in rescuing blood flow in hind limb ischemia mouse model by a dose- and site-dependent mechanism of action*. Cytotherapy, 2017. **19**(12): p. 1438-1446.

186. Norgren, L., N. Weiss, S. Nikol, R.J. Hinchliffe, J.C. Lantis, M.R. Patel, H. Reinecke, R. Ofir, Y. Rosen, D. Peres, and Z. Aberman, *PLX-PAD Cell Treatment of Critical Limb Ischaemia: Rationale and Design of the PACE Trial*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2019. **57**(4): p. 538-545.
187. Roy, R., A. Brodarac, M. Kukucka, A. Kurtz, P.M. Becher, K. Julke, Y.H. Choi, L. Pinzur, A. Chajut, C. Tschope, and C. Stamm, *Cardioprotection by placenta-derived stromal cells in a murine myocardial infarction model*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 70-83.
188. Van Linthout, S., N. Hamdani, K. Miteva, A. Koschel, I. Muller, L. Pinzur, Z. Aberman, K. Pappritz, W.A. Linke, and C. Tschope, *Placenta-Derived Adherent Stromal Cells Improve Diabetes Mellitus-Associated Left Ventricular Diastolic Performance*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(12): p. 2135-2145.
189. Lahiani, A., E. Zahavi, N. Netzer, R. Ofir, L. Pinzur, S. Raveh, H. Arien-Zakay, E. Yavin, and P. Lazarovici, *Human placental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(2): p. 422-30.
190. Ma, R., M. Schär, T. Chen, H. Wang, S. Wada, X. Ju, X.H. Deng, and S.A. Rodeo, *Use of Human Placenta-Derived Cells in a Preclinical Model of Tendon Injury*. J Bone Joint Surg Am, 2019. **101**(13): p. e61.
191. Barkama, R., A. Mayo, A. Paz, A. Solopov, T. Mann, Z. Vadasz, T. Appel, R. Ofir, L. Shani, M. Sheleg, H. Allen, R. Shaked Nitzan, N. Tsarfaty, H. Gilad, T. Birch, E. Kachel, P. Reinke, H.D. Volk, R. Zalts, and A. Raz Pasteur, *Placenta-Derived Cell Therapy to Treat Patients With Respiratory Failure Due to Coronavirus Disease 2019*. Crit Care Explor, 2020. **2**(9): p. e0207.
192. Winkler, T., P. von Roth, G. Matziolis, M.R. Schumann, S. Hahn, P. Strube, G. Stoltenburg-Didinger, C. Perka, G.N. Duda, and S.V. Tohtz, *Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma*. Acta orthopaedica, 2011. **82**(1): p. 102-11.
193. Winkler, T., P. von Roth, G. Matziolis, M. Mehta, C. Perka, and G.N. Duda, *Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats*. Tissue engineering. Part A, 2009. **15**(3): p. 487-92.
194. Razali, N.M. and Y.B. Wah, *Power comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling tests*. Journal of Statistical Modeling and Analytics, 2011. **2**(1): p. 21-33.
195. von Roth, P., G.N. Duda, P. Radojewski, B. Preininger, C. Perka, and T. Winkler, *Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats*. Gend Med, 2012. **9**(2): p. 129-36.
196. Hardy, D., A. Besnard, M. Latil, G. Jouvion, D. Briand, C. Thepenier, Q. Pascal, A. Guguin, B. Gayraud-Morel, J.M. Cavaillon, S. Tajbakhsh, P. Rocheteau, and F. Chretien, *Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147198.
197. Drapeau, C., D. Antarr, H. Ma, Z. Yang, L. Tang, R.M. Hoffman, and D.J. Schaeffer, *Mobilization of bone marrow stem cells with StemEnhance improves muscle regeneration in cardiotoxin-induced muscle injury*. Cell Cycle, 2010. **9**(9): p. 1819-23.
198. White, J.P., K.A. Baltgalvis, S. Sato, L.B. Wilson, and J.A. Carson, *Effect of nandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced muscle injury*. J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(5): p. 1420-30.
199. Borselli, C., H. Storrie, F. Benesch-Lee, D. Shvartsman, C. Cezar, J.W. Lichtman, H.H. Vandenburgh, and D.J. Mooney, *Functional muscle regeneration with combined*

- delivery of angiogenesis and myogenesis factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3287-92.
200. Corona, B.T. and C.R. Rathbone, *Accelerated functional recovery after skeletal muscle ischemia-reperfusion injury using freshly isolated bone marrow cells*. J Surg Res, 2014. **188**(1): p. 100-9.
 201. Blaisdell, F.W., *The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review*. Cardiovasc Surg, 2002. **10**(6): p. 620-30.
 202. Filippin, L.I., M.J. Cuevas, E. Lima, N.P. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, and R.M. Xavier, *Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle*. Nitric Oxide, 2011. **24**(1): p. 43-9.
 203. McBrier, N.M., T. Neuberger, C.R. Denegar, N.A. Sharkey, and A.G. Webb, *Magnetic resonance imaging of acute injury in rats and the effects of buprenorphine on limb volume*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. **48**(2): p. 147-51.
 204. Dobek, G.L., N.D. Fulkerson, J. Nicholas, and B.S. Schneider, *Mouse model of muscle crush injury of the legs*. Comp Med, 2013. **63**(3): p. 227-32.
 205. Gierer, P., J. Rother, T. Mittlmeier, G. Gradl, and B. Vollmar, *Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat*. J Trauma, 2010. **68**(4): p. 853-8.
 206. Speck, K., B.S. Schneider, and N. Deashinta, *A rodent model to advance the field treatment of crush muscle injury during earthquakes and other natural disasters*. Biol Res Nurs, 2013. **15**(1): p. 17-25.
 207. Stratos, I., J. Graff, R. Rotter, T. Mittlmeier, and B. Vollmar, *Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair*. J Orthop Res, 2010. **28**(7): p. 950-7.
 208. Stratos, I., R. Rotter, C. Eipel, T. Mittlmeier, and B. Vollmar, *Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(5): p. 1857-63.
 209. Karalaki, M., S. Fili, A. Philippou, and M. Koutsilieris, *Muscle regeneration: cellular and molecular events*. In Vivo, 2009. **23**(5): p. 779-96.
 210. Ulrich, C., B. Rolauffs, H. Abele, M. Bonin, K. Nieselt, M.L. Hart, and W.K. Aicher, *Low osteogenic differentiation potential of placenta-derived mesenchymal stromal cells correlates with low expression of the transcription factors Runx2 and Twist2*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(21): p. 2859-72.
 211. Ulrich, C., T. Abruzzese, J.K. Maerz, M. Ruh, B. Amend, K. Benz, B. Rolauffs, H. Abele, M.L. Hart, and W.K. Aicher, *Human Placenta-Derived CD146-Positive Mesenchymal Stromal Cells Display a Distinct Osteogenic Differentiation Potential*. Stem Cells Dev, 2015. **24**(13): p. 1558-69.
 212. Li, K., S.Z. Li, Y.L. Zhang, and X.Z. Wang, *The effects of dan-shen root on cardiomyogenic differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(1): p. 147-51.
 213. Du, L., Y. Yu, H. Ma, X. Lu, L. Ma, Y. Jin, and H. Zhang, *Hypoxia enhances protective effect of placental-derived mesenchymal stem cells on damaged intestinal epithelial cells by promoting secretion of insulin-like growth factor-1*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 1983-2002.
 214. Yang, J., Y. Zhang, G. Zang, T. Wang, Z. Yu, S. Wang, Z. Tang, and J. Liu, *Adipose-derived stem cells improve erectile function partially through the secretion of IGF-1, bFGF, and VEGF in aged rats*. Andrology, 2018. **6**(3): p. 498-509.
 215. Gneccchi, M., H. He, N. Noiseux, O.D. Liang, L. Zhang, F. Morello, H. Mu, L.G. Melo, R.E. Pratt, J.S. Ingwall, and V.J. Dzau, *Evidence supporting paracrine hypothesis for*

- Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement.* *Faseb j*, 2006. **20**(6): p. 661-9.
216. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.* *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 209-38.
 217. Adams, G.R. and S.A. McCue, *Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats.* *J Appl Physiol* (1985), 1998. **84**(5): p. 1716-22.
 218. Lynch, G.S., S.A. Cuffe, D.R. Plant, and P. Gregorevic, *IGF-I treatment improves the functional properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles from dystrophic mice.* *Neuromuscul Disord*, 2001. **11**(3): p. 260-8.
 219. Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, A. Musaro, N. Rosenthal, and H.L. Sweeney, *Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15603-7.
 220. Yu, M., H. Wang, Y. Xu, D. Yu, D. Li, X. Liu, and W. Du, *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signalling pathway.* *Cell Biol Int*, 2015. **39**(8): p. 910-22.
 221. Li, J., J. Lin, Y. Song, L. Xiang, and Z. Wu, *[Effects of insulin-like growth factor-1 on the myocardium in diabetic rats].* *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2014. **94**(42): p. 3329-33.
 222. Dhawan, J. and T.A. Rando, *Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment.* *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(12): p. 666-73.
 223. Gal-Levi, R., Y. Leshem, S. Aoki, T. Nakamura, and O. Halevy, *Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation.* *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1402**(1): p. 39-51.
 224. Wang, F., H. Tang, J. Zhu, and J.H. Zhang, *Transplanting Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Ischemic Stroke.* *Cell Transplant*, 2018. **27**(12): p. 1825-1834.
 225. Willoughby, C.L., S. Ralles, S.P. Christiansen, and L.K. McLoon, *Effects of sequential injections of hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-I on adult rabbit extraocular muscle.* *J aapos*, 2012. **16**(4): p. 354-60.
 226. Kinnaird, T., E. Stabile, M.S. Burnett, M. Shou, C.W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S.E. Epstein, *Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.* *Circulation*, 2004. **109**(12): p. 1543-9.
 227. Duran, J.M., C.A. Makarewich, T.E. Sharp, T. Starosta, F. Zhu, N.E. Hoffman, Y. Chiba, M. Madesh, R.M. Berretta, H. Kubo, and S.R. Houser, *Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms.* *Circ Res*, 2013. **113**(5): p. 539-52.
 228. He, J., Y. Cai, L.M. Luo, and H.B. Liu, *Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat.* *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015. **19**(22): p. 4397-406.
 229. Bilal, M., A. Haseeb, and M.A. Sher Khan, *Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a novel treatment in patients of acute myocardial infarction.* *J Pak Med Assoc*, 2015. **65**(12): p. 1369.
 230. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(6): p. 789-91.
 231. Hoeben, A., B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, and E.A. De Bruijn, *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.* *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(4): p. 549-80.
 232. Hellsten, Y. and B. Hoier, *Capillary growth in human skeletal muscle: physiological factors and the balance between pro-angiogenic and angiostatic factors.* *Biochem Soc Trans*, 2014. **42**(6): p. 1616-22.

233. Roy, R., A. Brodarac, M. Kukucka, A. Kurtz, P.M. Becher, K. Jülke, Y.H. Choi, L. Pinzur, A. Chajut, C. Tschöpe, and C. Stamm, *Cardioprotection by placenta-derived stromal cells in a murine myocardial infarction model*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 70-83.
234. Novotny, N.M., T. Lahm, T.A. Markel, P.R. Crisostomo, M. Wang, Y. Wang, J. Tan, and D.R. Meldrum, *Angiopoietin-1 in the treatment of ischemia and sepsis*. Shock, 2009. **31**(4): p. 335-41.
235. Koh, G.Y., *Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration*. Trends Mol Med, 2013. **19**(1): p. 31-9.
236. Zipfel, P. and M. Reuter, *Complement Activation Products C3a and C4a as Endogenous Antimicrobial Peptides*. 2009. **15**: p. 87-95.
237. Frenette, J., B. Cai, and J.G. Tidball, *Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use*. Am J Pathol, 2000. **156**(6): p. 2103-10.
238. Fielding, R.A., T.J. Manfredi, W. Ding, M.A. Fiatarone, W.J. Evans, and J.G. Cannon, *Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. R166-72.
239. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 534-51.
240. Ding, H., H. Zhang, H. Ding, D. Li, X. Yi, X. Ma, R. Li, M. Huang, and X. Ju, *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells reduces hypoxic-ischemic brain damage in rats by ameliorating the inflammatory response*. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(8): p. 693-701.
241. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
242. Du, Y.Y., S.H. Zhou, T. Zhou, H. Su, H.W. Pan, W.H. Du, B. Liu, and Q.M. Liu, *Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction*. Cytotherapy, 2008. **10**(5): p. 469-78.
243. Semple, J.W., *Intravenous Immunoglobulin Prevents Murine Antibody-Mediated Acute Lung Injury at the Level of Neutrophil Reactive Oxygen Species (ROS) Production*. 2012. **7**(2).
244. Korthuis, R.J., M.B. Grisham, and D.N. Granger, *Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle*. Am J Physiol, 1988. **254**(5 Pt 2): p. H823-7.
245. Pizza, F.X., T.J. Koh, S.J. McGregor, and S.V. Brooks, *Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(5): p. 1873-8.
246. Raffaghello, L., G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, L. Ottonello, and V. Pistoia, *Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 151-62.
247. Chazaud, B., M. Brigitte, H. Yacoub-Youssef, L. Arnold, R. Gherardi, C. Sonnet, P. Lafuste, and F. Chretien, *Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration*. Exerc Sport Sci Rev, 2009. **37**(1): p. 18-22.
248. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(2): p. R345-53.
249. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
250. Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.

251. Yang, W. and P. Hu, *Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation*. J Orthop Translat, 2018. **13**: p. 25-32.
252. Villalta, S.A., H.X. Nguyen, B. Deng, T. Gotoh, and J.G. Tidball, *Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(3): p. 482-96.
253. Li, H., W. Wang, G. Wang, Y. Hou, F. Xu, R. Liu, F. Wang, J. Xue, T. Hu, and X. Luan, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha promote the ability of human placenta-derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4(+)interleukin-10(+) and CD8(+)interleukin-10(+)Treg subsets*. Cytotherapy, 2015. **17**(11): p. 1560-71.
254. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
255. Biswas, S.K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Sacconi, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica, *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2112-22.
256. Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud, *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
257. Warren, G.L., T. Hulderman, N. Jensen, M. McKinstry, M. Mishra, M.I. Luster, and P.P. Simeonova, *Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury*. Faseb j, 2002. **16**(12): p. 1630-2.
258. Hoene, M., H. Runge, H.U. Haring, E.D. Schleicher, and C. Weigert, *Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **304**(2): p. C128-36.
259. Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardi, and P. Munoz-Canoves, *Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 33-44.
260. Burzyn, D., W. Kuswanto, D. Kolodin, J.L. Shadrach, M. Cerletti, Y. Jang, E. Sefik, T.G. Tan, A.J. Wagers, C. Benoist, and D. Mathis, *A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair*. Cell, 2013. **155**(6): p. 1282-95.
261. Consentius, C., L. Akyuz, J.A. Schmidt-Lucke, C. Tschöpe, L. Pinzur, R. Ofir, P. Reinke, H.D. Volk, and K. Juelke, *Mesenchymal Stromal Cells Prevent Allostimulation In Vivo and Control Checkpoints of Th1 Priming: Migration of Human DC to Lymph Nodes and NK Cell Activation*. Stem Cells, 2015. **33**(10): p. 3087-99.
262. Fazekasova, H., R. Lechler, K. Langford, and G. Lombardi, *Placenta-derived MSCs are partially immunogenic and less immunomodulatory than bone marrow-derived MSCs*. J Tissue Eng Regen Med, 2011. **5**(9): p. 684-94.
263. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
264. Serrano, A.L. and P. Munoz-Canoves, *Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle*. Exp Cell Res, 2010. **316**(18): p. 3050-8.
265. Mann, C.J., E. Perdiguero, Y. Kharraz, S. Aguilar, P. Pessina, A.L. Serrano, and P. Munoz-Canoves, *Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle*. Skelet Muscle, 2011. **1**(1): p. 21.

266. Fukushima, K., N. Badlani, A. Usas, F. Riano, F. Fu, and J. Huard, *The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration*. Am J Sports Med, 2001. **29**(4): p. 394-402.
267. Mias, C., O. Lairez, E. Trouche, J. Roncalli, D. Calise, M.H. Seguelas, C. Ordener, M.D. Piercecchi-Marti, N. Auge, A.N. Salvayre, P. Bourin, A. Parini, and D. Cussac, *Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2734-43.
268. Peng, C., H. Pei, F. Wei, X. Tian, J. Deng, C. Yan, Y. Li, M. Sun, J. Zhang, D. Liu, J. Rong, J. Wang, E. Gao, S. Li, and Y. Han, *Cellular repressor of E1A-stimulated gene overexpression in bone mesenchymal stem cells protects against rat myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2015. **183**: p. 232-41.
269. Du, L., R. Lv, X. Yang, S. Cheng, T. Ma, and J. Xu, *Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation*. Life Sci, 2016. **149**: p. 51-7.
270. von Roth, P., T. Winkler, K. Rechenbach, P. Radojewski, C. Perka, and G.N. Duda, *Improvement of contraction force in injured skeletal muscle after autologous mesenchymal stroma cell transplantation is accompanied by slow to fast fiber type shift*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(6): p. 425-30.
271. Ciciliot, S. and S. Schiaffino, *Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(8): p. 906-14.
272. Jerkovic, R., C. Argentini, A. Serrano-Sanchez, C. Cordonnier, and S. Schiaffino, *Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle*. Cell Struct Funct, 1997. **22**(1): p. 147-53.
273. Mendler, L., S. Pinter, M. Kiricsi, Z. Baka, and L. Dux, *Regeneration of reinnervated rat soleus muscle is accompanied by fiber transition toward a faster phenotype*. J Histochem Cytochem, 2008. **56**(2): p. 111-23.
274. Matsuura, T., Y. Li, J.P. Giacobino, F.H. Fu, and J. Huard, *Skeletal muscle fiber type conversion during the repair of mouse soleus: potential implications for muscle healing after injury*. J Orthop Res, 2007. **25**(11): p. 1534-40.
275. Jiang, C.Y., C. Gui, A.N. He, X.Y. Hu, J. Chen, Y. Jiang, and J.A. Wang, *Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction*. J Zhejiang Univ Sci B, 2008. **9**(8): p. 630-7.
276. Hu, X., J. Wang, J. Chen, R. Luo, A. He, X. Xie, and J. Li, *Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **31**(3): p. 438-43.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christoph Paul, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Einfluss von placental-derived adherent mesenchymal stromal cells auf die Muskelregeneration der Ratte

The influence of placental-derived adherent mesenchymal stromal cells on the regeneration of skeletal muscle in rats

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/innen 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 Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Berlin, den 15.01.2022

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Tobias Winkler und PD Dr. med. Philipp von Roth für die Überlassung des Themas und unermüdliche Betreuung dieser Dissertation. Darüber hinaus möchte ich Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda als Leiter des Julius-Wolff-Instituts danken.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. med. Gisela Stoltenburg-Didinger für ihre Unterstützung mit Expertise im Bereich der Histologie danken, sowie Frau Gabriele Korus für die exzellente Betreuung der histologischen Aufarbeitung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Großeltern, Vera und Lothar Paul, die mich nicht nur bei dieser Dissertation, sondern während der gesamten Schul- und Studienzeit unterstützt und gefördert haben.