

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

DISSERTATION

Einfluss lokal transplanteder mesenchymaler Stammzellen auf
die Regeneration nach Skelettmuskeltrauma: Morphologie und
Histomorphometrie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria-Rose Schumann

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. C. Perka
 2. Prof. Dr. med. T. Mittlmeier
 3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Kirschner

Datum der Promotion: 30.11.2012

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PECH	Pause-Eis-Compression-Hochlagern
RICE	rest-ice-compression-elevation
NSAIDS	non steroidal anti inflammatory drugs
MSC	mesenchymal stem cells
MDSC	muscle-derived stem cells
DNA	deoxyribonucleic acide
RNA	ribonucleic acide
mRNA	messenger ribonucleic acide
Mdx-Maus	Maus mit Gendefekt der Muskeldystrophie Typ Duchenne
VSOP	very small superparamagnetic iron oxide particles
MRT	Magnetresonanztomographie
FGF	fibroblast growth factor
IGF	insulin-like growth factor
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IGF-II	insulin-like growth factor-II
EGF	epidermal growth factor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
PDGF	platelet-derived growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TGF- β	transforming growth factor beta
MIP	macrophage inflammatory protein
EPO	Erythropoetin
GFP	green fluorescent protein
Mm.	Musculi
SO	Musculus soleus
GM	Musculus gastrocnemius
PE	Musculus peroneus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetales Kälber Serum

Pen/ Strep	Penicillin-Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
NaCl	Natriumchlorid
Aqua dest.	Aqua destillatum
HCl	Salzsäure
RT	Raumtemperatur
HE	Hämatoxylin-Eosin
PAK	Primärantikörper
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Fc-region	fragment crystallizable region
AP	alkaline phosphatase
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
ED-1	Anti-CD86-Antikörper
ROI	region of interest
MMP	metalloproteinases

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ZUSAMMENFASSUNG.....	5
ABSTRACT	7
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Muskulatur	9
1.1.1 Skelettmuskulatur	10
1.1.2 Schädigung der Skelettmuskulatur.....	15
1.1.3 Therapie.....	16
1.2 Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit in unserer Arbeitsgruppe	21
1.2.1 Ziele.....	21
1.2.2 Hypothesen.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 IN VIVO UND IN VITRO	23
2.1.1 Traumacharakterisierung.....	23
2.1.2 MSC-Transplantation	27
2.2 EX VIVO	29
2.2.1 Versuchsgruppen	29
2.2.2 Aufbereitung der Präparate.....	30
2.2.3 Anfertigung der Schnitte	31
2.2.4 Vorbereitung zur Färbung	31
2.2.5 Färbungen.....	32
2.2.6 Auswertung der histologischen Präparate	40
2.2.7 Statistische Auswertung	41
3 ERGEBNISSE.....	42
3.1 Traumacharakterisierung	42
3.1.1 Deskription	42
3.1.2 Fibrose	50
3.1.3 Angiogenese	50
3.2 MSC-Transplantation	51
3.2.1 Deskription	51
3.2.2 Einfluss der MSC auf die Fibrose	57
3.2.3 Einfluss der MSC auf die Angiogenese	58

4 DISKUSSION	59
4.1 Traumacharakterisierung	59
4.2 Korrelation der mikro- und makroskopisch visualisierten MSC	62
4.3 Einfluss der MSC auf die Ausbildung der Fibrose	65
4.4 Einfluss der MSC auf die Angiogenese	65
LITERATURVERZEICHNIS	67
DANKSAGUNG	76
LEBENS LAUF	77
PUBLIKATIONEN	78
ERKLÄRUNG	79

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Bis heute gelten schwerwiegende Weichteilverletzungen in der Traumatologie als nur unzureichend therapierbar. Durch Operationen oder Unfälle verursachte Funktionsdefizite der Muskulatur lassen sich in den meisten Fällen nicht wieder gänzlich herstellen. Das gewünschte Niveau des Zustandes einer Wiederherstellung der gesunden Ausgangssituation, im Sinne einer restitutio ad integrum, wird weder durch das aktuell vorherrschende Therapieregime, noch durch experimentelle Ansätze wie zum Beispiel den Einsatz von Wachstumsfaktoren erreicht.

Um die Ausgangssituation eines schweren muskulären Quetschtraumas zu verstehen, bedarf es eines gut verstandenen Tiermodells zur Analyse der Regenerationsvorgänge.

Hierfür analysierten wir ein standardisiertes Quetschtrauma im Rattenmodell in Bezug auf die Regenerationsvorgänge im achtwöchigen posttraumatischen Verlauf aus histologischer Sicht. Dabei lag der Schwerpunkt der histologischen Analyse neben der eigentlichen Charakterisierung des Traumaverlaufes in der Betrachtung der Fibrosebildung und der Angiogenese.

Es wurde bereits mehrfach bewiesen, dass die lokale Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSC) die muskuläre Regeneration, insbesondere bezogen auf die Kontraktionskraft, fördert. Wir entwickelten eine Methode die transplantierten mesenchymalen Stammzellen sowohl makro- als auch mikroskopisch zu verfolgen.

Um die Ursachen der verbesserten muskulären Kontraktionskraft nach Stammzelltransplantation zu verstehen, analysierten wir die Fibrosebildung und die Angiogenese nach Transplantation.

Methoden

Für die histologische Analyse des posttraumatischen Zeitverlaufes wurde der Musculus soleus von Sprague-Dawley-Ratten in standardisierter Weise gequetscht. Danach wurde am 1., 2. und 4. posttraumatischen Tag sowie eine, vier und acht Wochen nach dem Trauma der Muskel histologisch untersucht. Um den allgemeinen posttraumatischen Verlauf zu analysieren wurde die Hämatoxylin & Eosin Färbung angewandt, für die Analyse der Fibrose wurde die Siriusrot Färbung und zur Auswertung der Angiogenese wurde ein immunhistochemische Färbeverfahren für α -smooth muscle actin (α -SMA) verwandt.

Um die, vor der Transplantation mit very small ironoxid particles (VSOP) markierten, mesenchymalen Stammzellen zu visualisieren, wurde die Berliner Blau Färbung eingesetzt. Die Berliner Blau/Preussisch Blau Färbung ist dabei selektiv für Eisen und färbt somit die VSOP selektiv an.

Um den Einfluss der MSC auf die posttraumatische Fibrosebildung und die Angiogenese zu untersuchen, erfolgte eine Woche nach dem Trauma die Analyse der Präparate im Vergleich mit

der Kontrollgruppe mittels der Siriusrot Färbung und der Immunhistochemie für α -SMA. Hierbei wurde den Tieren der Kontrollgruppe Kochsalzlösung (NaCl) lokal injiziert.

Ergebnisse

Eine Woche nach dem Trauma fanden sich 40% lockeres Bindegewebe im traumatisierten Muskelgewebe. Nach vier Wochen reduzierte sich der Gehalt an Bindegewebe auf 25% und stagnierte an diesem Punkt bis zum letzten Messzeitpunkt, acht Wochen nach dem Trauma.

Die Gefäßdichte zeigte in der ersten posttraumatischen Woche einen Anstieg, im weiteren Verlauf jedoch einen langsamen Abfall, als Zeichen einer langen Remodellingphase.

Die Lokalisation der mittels VSOP markierten MSC durch die Berliner Blau Färbung korrelierte mit den makroskopischen Ergebnissen der MRT.

Einzelne Fusionsereignisse zwischen regenerierenden Muskelfasern und MSC konnten mittels der Berliner Blau Färbung beobachtet werden. Die lokale Transplantation von MSC zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Fibrosebildung oder die Angiogenese.

Interpretation

Die posttraumatische Regeneration der Skelettmuskulatur folgt einem klaren histologischen Zeitablauf.

Das Ausmaß der posttraumatischen Fibrose spielt eine wesentliche Rolle in der Regeneration und kann nicht durch die lokale Transplantation von mesenchymalen Stammzellen beeinflusst/reduziert werden.

Die Angiogenese weist eine lange Remodellingphase auf. Eine Beeinflussung durch die transplantierten MSC findet nicht statt.

Die vereinzelt beobachteten Fusionsereignisse repräsentieren einen Teil des positiven Effektes der transplantierten mesenchymalen Stammzellen auf die Regeneration, können aber auf Grund ihrer Seltenheit nicht die Hauptursache sein. Um die Mechanismen der verbesserten Regeneration nach Stammzelltransplantation zu verstehen, bedarf es weiterer Studien. Ein Augenmerk sollte hierbei unter anderem der molekularen Ebene gelten, um unter anderem den parakrinen Effekten der Zellen nachzugehen.

ABSTRACT

Background and purpose

To investigate the situation after a severe muscle trauma a well understood animal model is needed. To better understand the regenerative processes after a trauma, we completely analysed the timecourse of the posttraumatic situation histologically for the time of eight weeks. Two special targets were the amount of fibrosis and the angiogenesis.

It is already proven that the local transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) improves muscle regeneration, especially the contraction force. A method of tracking the transplanted mesenchymal stem cells histologically was established and a correlation with the macroscopic findings with MRI was performed.

To understand the reason of improved force after local stem cell transplantation a histological analysis in reference to fibrosis and angiogenesis after transplantation was made.

Methods

For the histological analysis of the time course of skeletal muscle injury soleus muscles of Sprague-Dawley rats were traumatised in a standardized manner. Muscles were analysed at day 1, 2 and 4 and week 1, 4 and 8 after trauma. Haematoxylin & Eosin (H & E) staining was used for a descriptive analysis, sirius-red staining was used for the analysis of fibrosis and an immunohistological stain against α -SMA was used for the evaluation of vessel density.

For the visualisation of the transplanted VSOP-labeled MSC we used prussian-blue-staining. For the visualisation of MSC, the cells were labeled with VSOP before transplantation. For the ex vivo detection of the cells the prussian-blue-stain was used, which is selective for iron.

The amount of collagenous connective tissue and the vessel density were evaluated for animals transplanted with MSC one week after trauma and control animals.

Results

One week after trauma loose connective tissue occupied 40 % of the traumatised muscle. The connective tissue decreased to about 25 % in the fourth week, stagnating at this point up to the eighth week.

Vessel density showed an increase of the angiogenesis in the first week, slowly decreasing in the following weeks as a sign of a long remodelling phase.

The localisation of VSOP-labeled MSC via prussian-blue correlated with the macroscopic findings in the MRI. Sporadic events of fusion between regenerating muscle fibers and mesenchymal stem cells could be observed.

The local transplantation of mesenchymal stem cells did not have a significant influence on the amount of fibrotic tissue or angiogenesis.

Interpretation

The posttraumatic regeneration of skeletal muscle follows a clear histologic timecourse. The substantial amount of fibrosis plays a main role in the regeneration and is not influenced/reduced by the local transplantation of mesenchymal stem cells.

The observed fusion events may represent a part of the mechanism of action of MSC-therapy in muscle injury. Nevertheless due to their rarity, further possible mechanisms have to be analysed.

1 EINLEITUNG

1.1 Muskulatur

Die Muskulatur repräsentiert im menschlichen Körper mit bis zu 45 % die größte Gewebemasse und kann funktionell und morphologisch in quergestreifte und glatte Muskulatur unterteilt werden. Dabei wird die quergestreifte Muskulatur in Skelett- und Herzmuskulatur untergliedert. Die Haupteigenschaft des Muskelgewebes ist die aktive Kontraktion des Aktin- und Myosin-Gleitfilamentmechanismus auf molekularer Basis nach Huxley. Dabei führen die glatte und die Herzmuskulatur autonome Bewegungen wie Darmperistaltik und Pumpfunktion des Herzens aus, die Skelettmuskulatur hingegen führt willkürliche Bewegungen aus.

Das Muskelgewebe entwickelt sich in der Embryonalphase aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, wobei die glatte Muskulatur der Iris des Auges (Mm. dilatator und Mm. sphincter pupillae) sowie die Myoepithelzellen einen ektodermalen Ursprung haben.

Die Skelettmuskulatur besteht aus länglichen Muskelfasern, welche aus Synzytien von Muskelzellen bestehen und sich durch eine randständige Anordnung der Zellkerne auszeichnen. Das Sarkoplasma besteht neben den zellulären Grundelementen wie zum Beispiel den Golgi-Apparaten und den Mitochondrien wiederum aus Myofibrillen, welche die kontraktilen Elemente der Muskelfaser bilden. Die kontraktilen Untereinheiten der Myofibrille bilden dabei kettenartig aneinander gereihete Sarkomere, welche die typische Querstreifung hervorrufen. Die willkürliche Innervation erfolgt direkt über motorische Endplatten.

Die Herzmuskulatur gilt auf Grund ihres Myofibrillenaufbaus zusammen mit der Skelettmuskulatur als quergestreift. Gegenüber der Skelettmuskulatur wird die Herzmuskulatur jedoch vegetativ innerviert. Des Weiteren besteht eine Herzmuskelfaser aus Einzelzellen, den Kardiomyozyten, welche wiederum einen zentralständigen, meist singulären Zellkern besitzen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zur Skelettmuskulatur liegt in der Reizweiterleitung, welche in den Herzmuskelfasern über in den Glanzstreifen liegende gap junctions funktioniert.

Die glatte Muskulatur hingegen weist überwiegend spindelartig geformte Zellen mit zentral gelegenem Zellkern auf. Sie wird in single-unit- und multi-unit-Typen unterteilt, wobei der single-unit-Typ über eine Spontanaktivität verfügt. Die für die Kontraktion notwendigen Aktin- und Myosinfilamente sind im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur nicht regulär angeordnet, weshalb sich glattes Muskelgewebe unter dem Polarisationsmikroskop anisotrop darstellt. Das Hauptvorkommen der glatten Muskelzellen liegt in der Wandung innerer

Hohlorgane und den Blutgefäßen. Gegenüber der Skelettmuskulatur ist die glatte Muskulatur durch ihren speziellen Aufbau fähig eine tonische Dauerkontraktion ohne hohen Energieaufwand oder eine schnelle Ermüdung aufzubauen, wobei die Reizleitung über gap junctions vermittelt wird [1].

1.1.1 Skelettmuskulatur

1.1.1.1 Aufbau

Ein quergestreifter Muskel wird durch mehrere Bindegewebshüllen in Skelettmuskelfaserbündel unterteilt. Dabei umschließt das Epimysium den gesamten Muskel und strahlt mit seinen oberflächlichen Schichten in die Faszie ein. Zwischen Faszie und dem eigentlichen Epimysium besteht in den meisten Fällen ein Verschiebeschichtspalt aus weniger straffem Bindegewebe. Das Epimysium und die Faszie bestehen überwiegend aus Kollagen Typ I, welches scherengitterartig angeordnet ist und damit eine ausreichende Stabilität gewährt.

Vom Epimysium ausgehend strahlen Blätter in die Tiefe ein und bilden das Perimysium externum und internum, hauptsächlich aus Kollagen Typ III und V bestehend. Die charakteristische Faserung der Muskeln kommt durch das Perimysium externum zustande, welches die Muskelfasern in Sekundärbündel aufteilt. Feine Aufzweigungen desselben gliedern die Sekundärbündel wiederum in Primärbündel und werden somit als Perimysium internum bezeichnet.

Die in den Primärbündeln liegenden einzelnen Muskelfasern werden wiederum vom Endomysium, hauptsächlich aus Kollagen Typ III bestehend, umhüllt. Der kontinuierliche Basalmembranschlauch, der jede Muskelfaser umhüllt, setzt sich wiederum aus den retikulären Fasern des Endomysiums und der eigentlichen Basalmembran zusammen.

Die Hauptaufgabe des oben ausführlich erläuterten Bindegewebsgerüsts liegt im Überdehnungsschutz des Muskels. Zusätzlich bildet das Bindegewebeegerüst eine Leitstruktur für Nerven und Gefäße. Des Weiteren bietet das Kollagengerüst die Grundlage für den für die Muskelkontraktion benötigten Druckaufbau.

Im Bereich des myotendinösen Überganges weist der Muskel multiple fingerförmige Einstülpungen der Zytoplasmamembran auf, an welchen die Basalmembran zusätzlich mit Mikrofibrillen durchsetzt ist. Die Kollagenfibrillen der Sehne verflechten sich dort mit den Mikrofibrillen der Basalmembran und gewährleisten so eine feste Verankerung mit entsprechender Stabilität.

Nahezu jeder Muskel, insbesondere der Musculus soleus, weist eine Area nervovascularia auf, über die Gefäße, Nerven und Lymphgefäße hilusartig eintreten, um sich dann als dichtes, geschlossenes Kapillarnetz und motorische Endplatten an die Muskelfasern anzugliedern.

Das Synzytium Muskelfaser weist lichtmikroskopisch in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine typische Querstreifung aus abwechselnd auftretenden hellen (I-Streifen inklusive Z-Streifen) und dunklen Banden (A-Streifen inklusive H- und M-Streifen) auf. Die Querstreifung kommt durch den inhomogenen Aufbau der Myofibrillen zu Stande. In einer quergestreiften Myofibrille wiederholt sich regelmäßig die kleinste Untereinheit, das Sarkomer. Elektronenmikroskopisch lassen sich innerhalb der Myofibrille dicke Myosin- und dünne Aktinfilamente unterscheiden, welche miteinander verzahnt sind. Die dicken Filamente befinden sich im A-Streifen, welcher den mittleren Anteil des Sarkomers bestimmt und anisotrop/dunkel zur Abbildung kommt. Die dünnen, isotropen/hellen Filamente, welche den I-Streifen bilden, haben die gleiche Verlaufsrichtung wie die dicken Filamente. Sie sind mit einem Ende im Z-Streifen verankert und ragen mit dem anderen Ende in die dicken Filamente des A-Streifens. Der Z-Streifen kann somit als Verknüpfungsstelle der Sarkomere untereinander angesehen werden. Der Abschnitt des A-Streifens, in dem keine Überlappung von dicken und dünnen Filamenten besteht, also nur dicke Filamente sichtbar sind, nennt sich H-Streifen. Der H-Streifen weist wiederum in der Mitte einen feinen dunklen M-Streifen auf, der durch die Quervernetzung der Myosinfilamente zustande kommt. Zusammengefasst kann die Streifenfolge in der kleinsten Untereinheit der Muskelfaser, dem Sarkomer, wie folgt bezeichnet werden: Z-I-A-H-M-H-A-I-Z.

Zusätzlich zu den eben bereits erwähnten Filamenten gibt es supradünne, aus Nebulin und Titin bestehende, parallel zu den Myofibrillen verlaufende Filamente, welche der Längsstabilisierung der Sarkomere dienen.

Muskelfasern werden in extrafusale und intrafusale Typen unterschieden. Die intrafusalen Muskelfasern, Fasertyp der Muskelspindeln, sind sehr dünn und fungieren als Dehnungsrezeptoren und stellen die Empfindlichkeit der Muskelspindeln durch Spannungs- und Längenänderung ein.

Die extrafusalen Muskelfasern, Fasertyp der Arbeitsmuskulatur, werden als Zuckungsfasern bezeichnet und können sich innerhalb von Sekundenbruchteilen kontrahieren und wieder erschlaffen.

Die Zuckungsfasern können wiederum in langsame (Typ-1) und schnelle (Typ-2) Fasern unterteilt werden. Abgesehen von den Zuckungsfasern gibt es weiterhin noch Tonusfasern,

welche jedoch nur in den Muskelspindeln und gering auch in den äußeren Augenmuskeln vorkommen.

Typ-1-Fasern sind durch ihren hohen Anteil an Myoglobin dunkel, insgesamt schmal und weisen eine reiche Blutversorgung, einen hohen Anteil an Neutralfetten und viele Mitochondrien auf. Die Energiegewinnung der langsamen Muskelfasern erfolgt hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung.

Typ-2-Fasern sind dicker, weisen weniger Mitochondrien auf und sind zur schnellen, kraftvollen Kontraktion befähigt, wobei die Hauptenergiegewinnung in der anaeroben Glykolyse liegt. Die Typ-2-Fasern können wiederum in Typ-2-A, -B und -C unterteilt werden. Dabei bezieht sich die Subklassifizierung auf die unterschiedliche Aktivität der myofibrillären Aktomyosin-ATPase [1,2].

Der in dieser Arbeit untersuchte Muskel ist der Musculus soleus, ein schollenartiger Muskel der vom oberen Drittel der Tibia und der Fibula entspringt, unter dem Musculus gastrocnemius verläuft und mit dessen Sehne zusammen die Achillessehne bildet.

Der Musculus soleus zeichnet sich durch ein zentrales Einstrahlen der Gefäße und eine zentrale Anordnung der Nervenendplatten aus, womit eine komplette Traumatisierung des Muskelgewebes unter Erhalt der Innervation und der Blutversorgung realisierbar war.

1.1.1.2 Regeneration

Durch thermische, mechanische oder chemische Noxen geschädigtes Muskelgewebe besitzt die Fähigkeit zur Regeneration auf Grund gewebespezifischer, mononukleärer Satellitenzellen, von denen der Großteil der Regeneration ausgeht. Im menschlichen Körper befinden sich circa 800 Satellitenzellen pro mm³ Muskelgewebe, welche auch als organotypische Stammzellen bezeichnet werden können [1,3]. Neben den Satellitenzellen existieren zusätzliche muscle-derived stem cells (MDSC), welche im Falle eines Traumas aktiviert werden und durch Proliferation und Differenzierung die Regeneration des Muskelgewebes unterstützen [4,5].

Mauro et. al. beschrieben 1961 erstmals die Existenz der Satellitenzellen und brachten sie mit der muskulären Regeneration als „schlafende Myoblasten“ in Zusammenhang, welche unter der Basalmembran liegen und nach einem Trauma aktiviert werden [7].

Die Aktivierung der Satellitenzellen erfolgt durch Wachstumsfaktoren wie fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), hepatocyte growth factor (HGF) und Interleukin (IL)1 und -6, welche im Rahmen der Inflammation während des Traumas freigesetzt werden. [7-

11]. Die Aktivität der Satellitenzellen an sich kann wiederum durch den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) inhibiert werden [6].

Nach der Teilung der Satellitenzelle bleibt eine der Zellen ortständig, um den Pool aufrecht zu erhalten, die andere Zelle wandert in das verletzte Areal ein, um sich dort weiter zu einem Myoblasten zu differenzieren, mit weiteren Myoblasten ein Synzytium und letzten Endes eine Myofibrille zu bilden [3,7,12-14].

Srikuea et. al. stellten 2010 die These auf, dass es zwei verschieden weit differenzierte Satellitenzellen im Pool geben muss. Sie wiesen anhand der mRNA von Myogenin nach, dass es nach einem Trauma zwei Peaks gibt, einen nach 6 Stunden und einen nach 7 Tagen [15]. Diese Angaben lassen vermuten, dass es bereits „wartende“ Satellitenzellen gibt, die sich direkt differenzieren können und dass es die bereits bekannte Population gibt, welche sich erst teilt um dann eine Satellitenzelle ortständig zu lassen und die andere Zelle zur Differenzierung freigegeben wird.

Hawke et. al. konnten im Mausmodell nachweisen, dass die Zellpopulation der Satellitenzellen im Alter abnimmt [3,16-18]. Des Weiteren ist bewiesen, dass chronische Regenerationsprozesse auf Grund ständig vorherrschender De- und Regenerationszyklen, wie sie bei Muskeldystrophien, zum Beispiel der Muskeldystrophie Typ Duchenne, vorkommen, den Zellpool erschöpfen [18]. Dabei ist der Zellpool eines 8-Jährigen mit Muskeldystrophie Typ Duchenne bereits auf die Größe des Zellpools eines gesunden 80-Jährigen reduziert [3].

Die Aktivität der Satellitenzellen lässt sich durch aktives Training erhöhen [19,20], wohingegen die Einnahme von NSAIDS ihre Aktivität vermindert [21]. Des weiteren beeinflusst die Intensität eines Traumas die Aktivität der Satellitenzellen [22].

Neben den Satellitenzellen gibt es noch weitere Stammzellpopulationen, die an der Muskelregeneration beteiligt sind. Im Muskel selbst gibt es die sogenannte Side Population, deren Zellen im Interstitium nahe der Blutgefäße liegen [23]. Ob die Side Population eine Subpopulation der Satellitenzellen, Satelliten-Progenitorzellen oder eine eigenständige Progenitorzellpopulation darstellt, ist noch nicht geklärt [17,24]. Eine Interaktion dieser Zellen in der Regeneration konnte jedoch nachgewiesen werden. Die Zellen der Side Population nehmen wie auch die Satellitenzellen an der Regeneration teil und formieren neue Myotuben [23], eine Interaktion zwischen der Side Population und den Satellitenzellen zur Auffüllung von deren Pool erscheint denkbar [25].

Zusätzlich werden im Falle eines ausreichend schweren Traumas mesenchymale Stammzellen, hauptsächlich aus dem Knochenmark, aktiviert und über die Blutbahn in das verletzte Muskelareal gelockt und differenzieren dort zu Muskelzellen [26-31], wobei gemäß Ferrari et. al.

die angelockten myogenen Precursorzellen gegenüber den Satellitenzellen die Hauptanzahl der Zellen vor Ort ausmachen [18,32].

Umgekehrt können die MDSC unter Einbezug der Satellitenzellen in andere Gewebe ihrer Zelllinie als auch in die ektodermale Linie übergehen [13,33,34], oder bei entsprechend schweren Traumata anderer Gewebe eben dorthin auswandern [35].

Zusammengefasst fungieren die muskeleigenen Stammzellen inklusive der Satellitenzellen sowie die angelockten mesenchymalen Stammzellen als Hauptakteure der muskulären Regeneration.

Der Heilungsprozess setzt wenige Stunden nach dem Trauma ein und kann grob in drei Phasen unterteilt werden [1,7,16,36]:

1.) Degeneration/Inflammation

Nach dem initialen, durch das Trauma bedingte, Zerreißen der Muskelfasern und damit der Zerstörung der Integrität beginnt die Phase der Degeneration. Es kommt zu einem erhöhten Einstrom von extrazellulärem Kalzium nach intrazellulär, woraufhin die Zellen sich selbst verdauen und die Nekrose eingeleitet wird. Die eigentliche Entzündungsreaktion beginnt in den ersten sechs Stunden, wobei die Aktivierung der Satellitenzellen circa drei Stunden nach dem Trauma einsetzt und ihren Höhepunkt nach zwölf Stunden aufweist. Neben einer ausgeprägten Leukozyteninfiltration wandert eine hohe Anzahl an Makrophagen ein, welche den Debris beseitigt. Zusätzlich setzen die Makrophagen dabei die bereits oben erwähnten Faktoren frei, welche die Satellitenzellen zusätzlich aktivieren [9]. Die eigentlichen regenerativen Prozesse werden jedoch durch die Ausbildung eines lokalen Hämatoms begrenzt, welches im Verlauf zusätzlich die Bildung von Narbengewebe fördert.

2.) Regeneration

Bereits ab Tag 3 sammeln sich die angelockten und aktivierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes in den zerstörten Muskelfasern und initiieren somit die eigentliche Regenerationsphase. Durch die Fusion einzelner Myoblasten durch Verschmelzung der Plasmamembranen und den überständigen Membranen der zerstörten Myofibrillen, formen sich zarte Myotuben aus, welche sich dann mit den intakten Abschnitten der verbliebenen Myofibrillen vereinigen. Der Fusionshöhepunkt liegt ungefähr am 10. Tag nach dem Trauma wobei die Satellitenzellen eine frühere Fusion als die angelockten mesenchymalen Stammzellen aufweisen [18]. Neben der Neubildung von Myotuben kommt es zu einer

vermehrten Einsprossung von Kapillaren. Die Regenerationsphase erfährt ihren Höhepunkt circa 2 Wochen nach dem initialen Trauma.

3.) Heilungsabschluss/Fibrose

Zwischen der zweiten und dritten posttraumatischen Woche beginnt überlappend mit den Reparaturprozessen der Muskelfasern die Formation des lockeren Bindegewebes zu Narbengewebe, welches den Endzustand des Heilungsprozesses darstellt. Die dünnen Anteile der Muskelfasern vereinigen sich und es lässt sich nun wieder das Bild einheitlicher, dicker Muskelfasern nachweisen.

Abschließend lässt sich noch erwähnen, dass das Ausmaß des Traumas erheblich das Ausmaß des reparativen Prozesses beeinflusst. Je intensiver und ausgeprägter das Trauma, desto langwieriger und ausgeprägter gestaltet sich die Regeneration [22].

1.1.2 Schädigung der Skelettmuskulatur

Die häufigsten Schädigungen liegen im Bereich der Sportverletzungen, wobei die Verletzungen der Skelettmuskulatur 10-55 % ausmachen und es sich in den häufigsten Fällen um Muskelüberdehnungen, -zerrungen und Muskelrisse sowie Prellungen handelt [37-39].

Häufigste Ursache der Verletzungen ist ein bestehendes Missverhältnis aus Belastbarkeit der Muskulatur und der ihr zugemuteten Belastung, wobei die Belastung entweder eine akute oder eine chronische Überbelastung darstellt [37,40]. Bereits kleine, jedoch im Alltag ungewohnte Belastungen führen durch Dehnung der sich im Kontraktionszustand befindlichen Muskulatur zu Mikrotraumen, welche jedoch reversibel sind [3]. Von den indirekten Traumata der Muskelüberdehnungen und -zerrungen lassen sich direkte Verletzungen wie Kontusionen, Schnitte oder Drucknekrosen unterscheiden, wobei es dabei häufig zu einer Kontinuitätsunterbrechung der Muskelfasern kommt [41]. Die mit Kontusionsverletzungen häufig einhergehende Gefahr des Kompartmentsyndroms, bei welchem der Gewebedruck durch das posttraumatische Ödem über den Kapillardruck steigt und somit eine Minderperfusion des Muskelgewebes und folglich ein muskuläres Funktionsdefizit hervorruft, stellt ein großes Problem in der Versorgung von Weichteiltraumata dar [42,43]. Eine Mindervaskularisierung des Muskels muss nicht unbedingt nur durch ein traumatisch bedingtes Kompartementsyndrom hervorgerufen werden. Akute Gefäßverschlüsse im Rahmen angiologischer Erkrankungen oder die intraoperative, gewollte Blutsperre erweisen sich ebenso als problematisch in Bezug auf den

ischämiebedingten Funktionsverlust der Muskulatur. Die Länge der Ischämie beeinflusst das Ausmaß sowie die Dauer des muskulären Regenerationsprozesses, im schlimmsten Falle kann sie zu einer Amputation führen [44-46]. Nach Beseitigung der Ursache der Ischämie muss an das Postrevaskularisationssyndrom gedacht werden, welches durch schwerwiegende Elektrolytentgleisungen bis zum Multiorganversagen mit Todesfolge führen kann [47]. Insgesamt lässt sich feststellen, je größer das Trauma, desto größer das Regenerationsdefizit [48,49].

Abschließend stellt das muskuläre Funktionsdefizit, bedingt durch die oben genannten Traumata/Erkrankungen, ein großes Problem in der Wiedererlangung der eigentlichen körperlichen Integrität dar.

1.1.3 Therapie

1.1.3.1 State of the Art

Führendes Therapieregime bei Muskelverletzungen ist derzeit weiterhin die konventionelle Behandlung mittels des PECH/RICE-Schemas (Pause, Eis, Compression, Hochlagern). Studien über die Wirksamkeit des Schemas existieren nicht, es gibt lediglich für die einzelnen Komponenten bestehende Studien. Hauptziel des PECH-Schemas ist die Begrenzung des lokalen Schadens, durch zum Beispiel Reduktion der lokalen Einblutung und Vermeidung einer Retraktion der verbliebenen Muskelstümpfe [37,50-52].

1.) Pause/Rest

Bei Faser-/Muskelrissen sollte nach vorerst erfolgter Kryotherapie eine Schonung des Muskelgewebes zur Vermeidung von Kontraktionen und somit Retraktionen der Muskelstümpfe erfolgen. Die Phase der Immobilisation liegt nach derzeitigem Wissenstand und dem Ausmaß der Verletzung zwischen 5-10 Tagen. In diesem Zeitraum bildet sich ein stabiles Narbengewebe, welches die Muskelstümpfe miteinander verbindet. Das einst von Jarvinen et. al. postulierte Taping/Bandagieren zur Ruhigstellung wurde je nach Ausmaß des Traumas durch die Anwendung von Casts ergänzt [51,53].

2.) Eis/Ice

Der von Dymant et. al. sofortig geforderte Einsatz von kryotherapeutischen Maßnahmen zur Schadensausmaßbegrenzung konnte in der Literaturrecherche von Burgess et.al. als

akuttherapeutisches Mittel zur Symptomlinderung und Heilungsbeschleunigung bestätigt werden [50,54]. Die Arbeit von Schaser et. al. belegte ebenso den positiven Einfluss der Kryotherapie im Rattenmodell, wobei die Reduktion der mikrovaskulären Dysfunktion, der Inflammation und der Nekrosenbildung nachgewiesen werden konnten [55].

Takagi et. al. wiesen hingegen im Rattenmodell eine verzögerte Heilung mit vermehrter Bildung von Bindegewebe durch die verspätete Inflammation mit folglich verzögerter Aktivierung der Satellitenzellen nach und postulierten auf Grund dieser Ergebnisse den Verzicht der Kühlung [56].

3.) Kompression/Compression

Die Anwendung komprimierender Maßnahmen hat bisher keinen evident bewiesenen Effekt auf die Heilung. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Kompression die Ausbreitung des Hämatoms im Rahmen der traumatischen Einblutung verhindert wird. Thorsson et. al. wiesen 1987 an jungen gesunden Athleten mit einer muskulären Verletzung durch die Anwendung moderater, lokaler Kompression eine Reduktion des intramuskulären Blutflusses um 50% nach [57]. Bezüglich der Möglichkeit der Entstehung eines Kompartementsyndroms gilt diesem Punkt des PECH-Schemas jedoch eine kontroverse Diskussion.

4.) Hochlagern/Elevate

Durch die Hochlagerung des verletzten Areals wird der arterielle Druck vermindert und der venöse Rückfluss forciert, womit ebenfalls die Ausbildung eines Ödems und somit die Minderung des Gewebedruckes erreicht wird. Ausführliche Studien zu diesem Therapiepunkt existieren nicht.

Im Anschluss an das PECH-Schema wird eine baldige und zügige Mobilisation nach Schmerzmaßgabe gefordert, um die Regeneration der Muskelfasern durch zeitige und intensive Kapillareinsprossung und Wiederherstellung der biomechanischen Eigenschaften zu beschleunigen und zu fördern [37,51]. Neben den eben erwähnten physikalischen Maßnahmen erweist sich die kurzzeitige Einnahme von NSAIDs in der Akutphase zur Analgesie als nützlich, wirkt jedoch auf die Regeneration kontraproduktiv [58].

Als weitere Therapiemaßnahmen stehen die Anwendung hyperbarer Sauerstofftherapie, der therapeutische Ultraschall oder die operative Versorgung zur Option.

Die operativen Maßnahmen kommen insbesondere bei Muskelrissen >50%, kompletten Rupturen, der Myositis ossificans und bei großen intramuskulären Hämatomen zum Einsatz, wobei sie insbesondere bei Nahtversorgung von Rissen eindeutig bessere Regenerationsergebnisse als die Immobilisation erzielen [37,59,60].

Zur hyperbaren Sauerstofftherapie gibt es nur wenige Studien. Best et. al. konnten 1998 im Hasenmodell die Verbesserung der muskulären Funktionalität nach 5-tägiger Anwendung einer 60-minütigen hyperbaren Sauerstofftherapie, begonnen 24 h nach dem Trauma, nachweisen [61]. Ein positiver Effekt auf die Heilung von Wunden konnte ebenfalls aufgezeigt werden [62,63]. Genauere Studien liegen derzeit jedoch nicht vor.

Die häufige Anwendung des therapeutischen Ultraschalls bei Sportverletzungen entbehrt ebenfalls eines begründeten positiven Einflusses auf die Muskelregeneration. Rantanen et. al. wiesen eine deutlich erhöhte Aktivierung der Satellitenzellen in der frühen Regenerationsphase durch die Anwendung von hochfrequenten Ultraschallwellen nach, eine vermehrte Bildung von Muskelfasern konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [64]. Objektivierbare Unterschiede ließen sich auch 2004 durch Wilkin et. al. nicht nachweisen, womit ein durch Patienten als positiv empfundener Effekt des therapeutischen Ultraschalls am ehesten auf die Schmerzreduktion durch die Mikromassage zurückzuführen ist [65].

1.1.3.2 Experimentelle Ansätze

Die bisherigen experimentellen Ansätze in der Behandlung von Muskeltraumata lassen sich grob in drei Kategorien unterteilen.

Antifibrotische Agenzien

Die Reduktion von Narbengewebe in der Heilungsphase führt zu einer deutlich verbesserten Muskelfunktion. In der Literatur ließen sich insbesondere zwei Agenzien, Suramin und Decorin finden, welche über die Inhibierung des transforming growth factor β (TGF- β) der Bildung von Narbengewebe entgegen wirken [66,67].

Suramin ist seit den 20er Jahren als Antiprotozoikum gegen die Schlafkrankheit bekannt. Chan et. al. wiesen 2003 den positiven Effekt von Suramin auf die Regeneration der Muskelfunktion nach, wobei Suramin TGF- β 1, durch die kompetitive Bindung an den Rezeptor, inhibiert und somit eine Verminderung der Fibroblastenaktivierung nach sich zieht [66].

Foster et. al. und Jarvinen et. al. konnten durch die Hemmung der Fibroblastenaktivität durch Decorin, ebenfalls über die Inhibierung von TGF- β 1, eine Reduktion des Narbengewebes nachweisen [67,68].

Einsatz von Wachstumsfaktoren

Eine weitere Methode zur Stimulierung der Regeneration ist der gezielte Einsatz von Wachstumsfaktoren. Allen et. al. konnten in vitro belegen, dass die Anwendung von insulin-like-growth factor I (IGF-I) und fibroblast growth factor (FGF) die Aktivierung von Satellitenzellen stimuliert, TGF- β hingegen die Proliferation und Differenzierung schwächt bis sogar hemmt [69]. In weiteren Versuchen wurde der positive Einfluss von IGF-I und II, epidermal growth factor (EGF), FGF, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) und platelet-derived growth factor (PDGF) auf die Aktivierung von Satellitenzellen bestärkt, wobei in den meisten Fällen die Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination eingesetzt wurden [10,11,36,70,71]. Zdanowicz et. al. konnten durch den Einsatz von IGF-I in Mäusen mit Muskeldystrophie Typ Duchenne, deren Muskelproteinhaushalt durch eine katabole Lage gekennzeichnet ist, den Muskelproteinhaushalt in Richtung anabole Lage steuern, was eine vermehrte Benutzung der Hinterläufe der dystrophen Mäuse bewirkte [72].

Des Weiteren zeigte der Einsatz von Erythropoetin (EPO) einen positiven Effekt auf die Regeneration, indem die Kapillardichte und die Satellitenzellaktivität gesteigert und die Leukozyteninfiltration vermindert wurde [73].

Stammzelltransplantation

Die in vielen Geweben postnatal vorkommenden adulten Stammzellen lassen sich in 2 Kategorien einteilen:

- *lineage comitted*: determinierte, als bereits organspezifisch geltende Progenitorzellen
- *lineage uncomitted*: wiederum in Epiblasten-artige Stammzellen und Stammzellen der drei embryonalen Keimblätter unterteilt, wobei die Epiblasten-artigen Stammzellen pluripotent und die Stammzellen des Ekto-, Meso- oder Endoderms multipotent sind.

Das heißt, dass sich die pluripotenten Epiblasten-artigen Stammzellen noch in alle Zelllinien entwickeln können (Pluripotenz), die multipotenten Stammzellen des Ekto-, Meso- oder Endoderms können sich jedoch nur in Zelllinien ihres vorgegebenen Keimblattes differenzieren (Multipotenz) [74,75].

Bittner et. al. gelang es im Mausversuch, die Ansiedlung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark im Muskelgewebe nachzuweisen. Grundlage dieser Studie sind die Muskeldystrophien, charakterisiert durch permanente De- und Regeneration von Muskelgewebe mit der dauerhaften Notwendigkeit myogener Progenitorzellen. Er stellte die Hypothese auf, dass es sich bei dem Pool der myogenen Progenitorzellen auch um rekrutierte, zusätzliche, undifferenzierte Stammzellen handeln muss, wie zum Beispiel dauerhaft rekrutierbare mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. In seinem Experiment erhielten weibliche gesunde und weibliche dystrophe (mdx) Mäuse das Knochenmark von gesunden männlichen Mäusen. Nach 70 Tagen wurden Proben vom Skelett- und Proben vom Herzmuskel untersucht. Die gesunden weiblichen Mäuse wiesen keine Myonuclei mit Y-Chromosomen auf, die kranken (mdx) Mäuse zeigten in allen Proben Y-Chromosomen Signale in den Zellkernen, womit Bittner et. al. bewiesen, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in die myogene Linie differenzieren können [76].

2003 wiesen Brazelton et. al. über die Markierung der mesenchymalen Stammzellen mittels green fluorescent protein (GFP) ebenfalls die Aufnahme der Zellen in die Skelettmuskulatur nach. Hierbei erhielten gesunde Mäuse eine Bestrahlung, womit deren Knochenmark zerstört wurde. Daraufhin wurden mittels GFP markierte MSC intravenös appliziert. Die Mäuse wurden 16 Monate beobachtet, ein Trauma wurde nicht zugefügt. Die Auswertung zeigte eine Ansammlung der GFP markierten mesenchymalen Stammzellen in der quergestreiften Muskulatur. Dabei fanden sich gravierende Unterschiede in der Verteilung. Die meisten Muskeln wiesen eine Aufnahme von unter 1% auf, der Musculus panniculus carnosus, ein subcutaner, den Rumpf ummantelnder quergestreifter Muskel, zeigte eine Aufnahme von 5% [31]. Der Musculus panniculus carnosus zeichnet sich durch eine hohe kontraktile Aktivität aus und weist ein hohes Regenerationspotential auf. Ein hierbei vermuteter Zusammenhang zwischen der Regenerationsfähigkeit und der Einwanderung mesenchymaler Stammzellen, führt zu der Hypothese, dass ein Trauma die Einwanderung mesenchymaler Stammzellen begünstigt.

Im Herzmodell gelang es, einen positiven Effekt auf das Remodelling nach Herzinfarkt über die Verminderung der Steifigkeit des Narbengewebes und vermehrte Angio- und Myogenese nachzuweisen [77-79]. Dabei wurden die Koronargefäße von Ratten ligiert und humane mesenchymale Stammzellen direkt in das ischämische Myokard injiziert oder per Trägermatrix eingebracht. Zwischen den unterschiedlichen Applikationsformen ließen sich keine signifikanten Unterschiede finden.

In der Skelettmuskulatur konnten Irintchev et. al. 1997 erstmals durch die Implantation von Myoblasten in einen durch Kälte geschädigten Muskel im Rattenmodell einen Kraftzuwachs

nachweisen [80]. Matziolis et. al. transplantierten autologe mesenchymale Stammzellen in einen mittels Quetschung schwer verletzten Muskel der Ratte und wiesen ebenso einen Kraftzuwachs gegenüber der unbehandelten Seite nach [81].

1.2 Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit in unserer Arbeitsgruppe

1.2.1 Ziele

Primärziel dieser Arbeit war es das 2006 neu etablierte und standardisierte Trauma des Musculus soleus histologisch zu charakterisieren. In der Literatur fanden sich bisher unterschiedliche Traumamodelle, von segmentaler Schädigung eines Muskels [12], bis zur totalen Zerstörung eines Muskels [82], jeweils ohne Berücksichtigung der für die Regeneration entscheidenden myoneuralen Verbindungen. Der Erhalt der Gefäß-/Nervenversorgung und somit auch der Endplatten ist maßgebend für die muskuläre Regeneration [83-85] und wurde in dem vorliegenden Modell realisiert. Durch die besondere Anatomie des Musculus soleus, mit einem zentralen Gefäß-/Nervenbündel, konnte die Aufrechterhaltung der Leitstruktur gewährleistet werden. Es erfolgte die Quetschung der distal und proximal davon gelegenen Muskulatur.

Als Sekundärziel gilt die histologische Verfolgung/Detektion transplantierte mesenchymaler Stammzellen. Die dabei verwendeten Stammzellen wurden vorher durch Eisennanopartikel markiert und eine Woche nach Trauma transplantiert und konnten somit einerseits makroskopisch in der MRT [86,87] und andererseits mikroskopisch nachgewiesen werden. Eine Korrelation der makroskopischen Ergebnisse aus der MRT und der hier gewonnenen histologischen Ergebnisse war hierbei ebenfalls Sekundärziel dieser Arbeit.

Als letzten Punkt galt es den Einfluss lokal transplantierte mesenchymaler Stammzellen auf histologischer Ebene zu untersuchen. Die Vorarbeit von Matziolis et. al. zeigte einen Kraftzuwachs des Musculus soleus um 14% nach lokaler Transplantation autologer MSC [81]. Die direkte Ursache des Kraftzuwachses ist bisher unklar. Wir postulieren, dass eine mögliche Ursache in der Reduktion von Narbengewebe oder in einer vermehrten Angiogenese liegen könnte. Diese beiden Punkte wurden abschließend in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.2.2 Hypothesen

Die Hypothesen lassen sich in folgende Untergruppen unterteilen:

Zeitlicher Verlauf der Muskelregeneration des Musculus soleus nach standardisiertem Crush-Trauma:

- Die Regeneration durch ein Crush-Trauma verletzter Skelettmuskulatur folgt bezüglich der Entwicklung von Fibrose und Angiogenese einem klaren Zeitverlauf.

Tracking lokal transplanteder MSC unter folgenden Gesichtspunkten:

- Die makroskopisch mittels MRT visualisierten MSC lassen sich mikroskopisch bezüglich ihrer Lokalisation und Verteilung korrelieren.
- Die lokale Transplantation autologer MSC
 - verringert die posttraumatische Fibrose.
 - zeigt einen positiven Einfluss auf die Angiogenese.

Im Folgenden gliedern sich die Abschnitte jeweils adaptiert an die Untergruppen, wie folgt in:

Traumacharakterisierung MSC-Transplantation

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 IN VIVO UND IN VITRO

2.1.1 Traumacharakterisierung

Versuchsaufbau

Alle Tiere erhielten ein offenes Crush-Trauma des linken Musculus soleus [81]. Es erfolgte eine Einteilung der Tiere in Gruppen, wonach gruppenweise die Kontraktionskraft des Muskels gemessen sowie eine sequenzielle MRT-Darstellung desselben in vivo 1, 4 und 8 Wochen post traumam erfolgte. Daraufhin erfolgte die Euthanasie der Tiere und der Musculus soleus beider Seiten wurde der Histologie zugeführt.

Versuchstiere

Für die Versuche wurden 36 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 450 - 550 g (Charles River, Sulzbach, Deutschland) herangezogen. Die Versuche erfolgten unter standardisierten Bedingungen unter einer Raumtemperatur von 25° C, wobei die Tiere freien Zugang zu Futter (Altromin Pellets, Altromin-GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser (ad libitum) hatten und an einen normalen Tag-Nacht-Rhythmus angepasst waren. Die Versuchsreihen wurden nach den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (§2 und §8) durchgeführt.

Es erfolgte eine Einteilung der Ratten in 3 Obergruppen. Die erste Gruppe bestand aus 18 Ratten, welche insgesamt in drei Gruppen à 6 Tieren aufgeteilt wurden. In dieser Gruppe erfolgte die Kraftmessung und die anschließende histologische Auswertung nach 1, 4 und 8 Wochen.

Die zweite Gruppe bestand aus 6 Tieren, bei denen eine Auswertung mittels MRT nach 1, 4 und 8 Wochen erfolgte.

Die letzte Gruppe bestand aus einer Aufteilung der Ratten in jeweils drei Untergruppen à 4 Ratten, wobei hier die histologische Auswertung an Tag 1, 2 und 4 erfolgte.

	Kraft & Histo	Kraft & Histo	Kraft & Histo	Histo	Histo	Histo	MRT	MRT	MRT
Gruppe	1W	4W	8W	1d	2d	4d	1W	4W	8W
Anzahl	6	6	6	4	4	4	6		

***Tabelle 1:** Einteilung der Ratten zur histologischen, biomechanischen und MR-morphologischen Auswertung im zeitlichen Verlauf nach Crush-Trauma.*

Traumatisierung

Zur Setzung des Traumas wurden die Ratten mittels einer subkutanen Injektion aus einer Mischung von 0,15 ml Ketamin und 0,15 ml Xylazin 2% auf 0,2 ml 0,9% Kochsalzlösung betäubt und anschließend das linke Bein rasiert.

Nach der Rasur erfolgte die Desinfektion des Hautareals mit Povidon-Jod. Anschließend wurde ein 2 cm langer Hautschnitt von der Achillessehne bis zum lateralen Kopf des Musculus gastrocnemius gesetzt, der Musculus soleus identifiziert und freipräpariert/mobilisiert.

Das Quetschtrauma wurde mittels einer Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland), deren Branchen mit einem Polyethylenschlauch zum Schutz der Faszie überzogen waren, durchgeführt.

Dabei wurde das erste Trauma direkt proximal der Achillessehne gesetzt, direkt an das erste Trauma angeschlossen wurden weitere drei Traumata. Es erfolgte eine Aussparung des Gefäßnervbündels (trapezförmig mit 3 mm Basis am Hilus und 2 mm am lateralen Rand). Drei weitere Traumata wurden proximal davon gesetzt. Insgesamt wurde die Klemme jeweils für 20 Sekunden auf der dritten Stufe geschlossen gehalten.

Der Druck bei geschlossenen Branchen entspricht $112 \pm 5,1$ N (Daten aus Voruntersuchungen mittels Materialprüfgerät Zwick 1455 (Zwick GmbH, Ulm, Deutschland)).

Nach mehrmaliger Spülung mittels NaCl erfolgte der schichtweise Wundverschluss. Unmittelbar postoperativ sowie 24 h danach erfolgte eine Analgesie mittels Rimadyl.

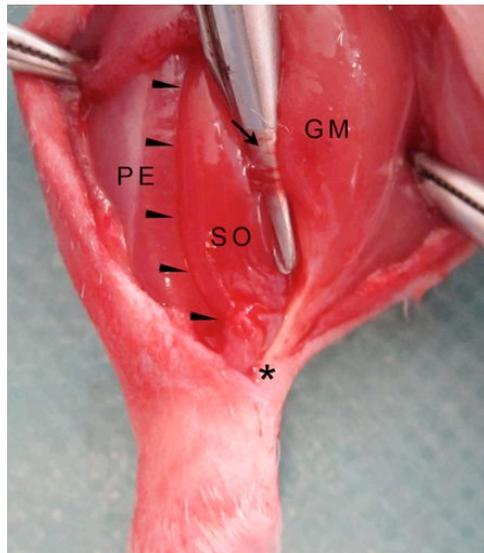


Abbildung 1: Innervation und Blutversorgung des Musculus soleus. Pfeilspitzen: laterale Begrenzung des M. soleus (SO); Pfeil: neurovaskuläres Bündel kommend vom M.gastrocnemius (GM), in den SO medial eintretend, die Pfeilspitze zeigt auf den Nerven, PE: Musculus peroneus, Sternchen: Achillessehne.



Abbildung 2: Schematische Darstellung des Musculus soleus, seiner zentralen Area nervovascularia und der traumatisierten Bereiche.

Muskelkraftmessung

Die 18 der Muskelkraftmessung zugeführten Tiere erhielten erneut die bereits oben erwähnte subcutane Anästhesie. Es erfolgte die Präparation des Nervus ischiadicus sowie des Musculus soleus beidseits. Der Musculus soleus wurde von der Achillessehne abgesetzt, die Tiere im Messgerät (Experimentria, Budapest, Ungarn) fixiert und der Musculus soleus mittels Naht an den Kraftmesser angeschlossen. Anschließend erfolgte die Stimulation des Nervus ischiadicus mit einer Stromstärke von 9 mA und einer Frequenz von 75 Hz (bipolar) für 0,1 Sekunden, 5 x mit 5 Sekunden Abstand für die fast-twitch Auswertung sowie für 3 Sekunden, 5 x, ebenfalls im 5 Sekundenintervall zur Messung der tetanischen Kontraktionskraft.

Nach Ende der Messung wurden die Tiere mittels einer Überdosis Anästhetika euthanasiert und für die histologischen Färbungen vorbereitet.

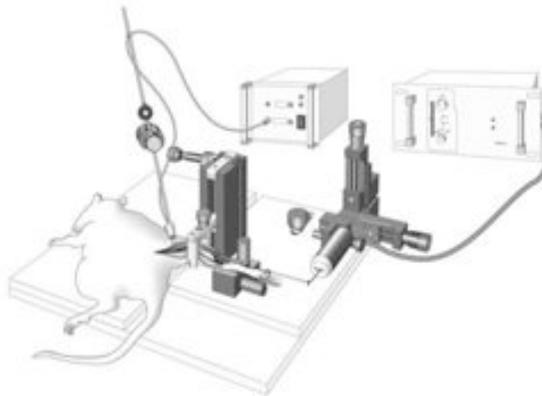


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Muskelkraftmessung.

MRT

6 Tiere wurden 1, 4 und 8 Wochen nach dem Trauma einer MRT-Untersuchung unterzogen. Hierbei wurden die Tiere mittels einer Inhalationsnarkose (Isofluran/O₂) anästhesiert und anschließend mittels eines 7 Tesla Kleintier-MRT (Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen, Deutschland) unter Kreislaufüberwachung untersucht, verwendet wurde eine 68 mm Spule. Der Untersuchungsbereich bezog sich auf den Unterschenkel vom Knöchel bis zum Tibeaplateau. Es wurden T1 und T2 Sequenzen (T1: TR/TE: 1000/10.6 ms; scan time 12 min; T2: TR/TE: 6351.6/75.6 ms; scan time 12 min) in einer Auflösung von 176 x 176 µm in einer Schichtdicke von 500 µm angefertigt und mittels ImageJ (Version 1.38i, NIH, USA) ausgewertet.

2.1.2 MSC-Transplantation

Versuchsaufbau

Alle Tiere erhielten das unter 2.1.1. beschriebene Trauma. Im Unterschied zum dort beschriebenen Trauma erfolgte 14 Tage zuvor eine Knochenmarksbiopsie aus der Tibia mit anschließender, dreiwöchiger Selektion und Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen über Plastik-Adhärenz. Sieben Tage nach dem erfolgten Trauma wurden dann die kultivierten Stammzellen in den Musculus soleus implantiert wobei einer Kontrollgruppe Kochsalzlösung (NaCl) injiziert wurde.

Nach Transplantation erfolgte wie auch schon in der Traumacharakterisierungsgruppe die biomechanische, histologische und MR-morphologische Auswertung.

Versuchstiere

Insgesamt wurden in diesem Versuch 42 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (140-160 g) (Charles River, Sulzbach, Deutschland) herangezogen. Es erfolgte die Einteilung der Tiere in insgesamt sieben Gruppen, mit einer Hauptunterteilung in zwei Obergruppen „MRT“ und „Kraftmessung“, wobei die Tiere in jeder dieser Obergruppen jeweils Stammzellen oder NaCl erhielten.

Biopsie/Kultivierung

Am Tag 0 der Versuchsreihe erfolgte unter sterilen Kautelen die Entnahme von Knochenmark aus der Tibia der Ratten unter oben genannter Anästhesie. Nach Zentrifugierung der Proben erfolgte die Aussaat in Zellkulturflaschen und die Kultivierung in DMEM + 10% FCS + Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) (PAA, Pasching, Österreich). Die Kultivierung der Stammzellen erfolgte für insgesamt drei Wochen und die Differenzierungsfähigkeit wurde in osteogenem und adipogenem Medium nachgeprüft.

Traumatisierung

Die Applikation des Traumas erfolgte in identischer Weise wie bereits in der Traumacharakterisierungsgruppe beschrieben wobei die Anzahl der Quetschungen auf Grund der hier kleineren Tiere auf 3 + 2 statt 4 + 3 reduziert wurde.

Stammzellmarkierung

Es erfolgte zum einen die Markierung der Stammzellen mittels VSOP (zur Detektion der Zellen im MRT durch die ferromagnetischen Eigenschaften der Partikel), zum anderen wurden die Zellen zweier Tiere zusätzlich mit Hoechst 33342 markiert. Der Farbstoff wurde hierzu mit einem Integra Mikrofilter (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland) sterilisiert und nach der Markierung der Zellen mit den VSOP für 5 Minuten in einer Konzentration von 7,5 µg/ml auf die Zellen gegeben, um die Zellkerne spezifisch zu markieren. Die Markierung erfolgte unmittelbar vor der Transplantation.

Transplantation

An Tag 21, also eine Woche nach Trauma, wurden die markierten Zellen unter Narkose den Tieren lokal implantiert. Hierfür wurde die Narbe um circa 5 Millimeter wieder eröffnet, der Musculus soleus dargestellt und die Zellen von distal in den Muskel injiziert.

Muskelkraftmessung

An Tag 42 erfolgte die Muskelkraftmessung, identisch zur in der Traumacharakterisierungsgruppe beschriebenen Messung. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert und zur Histologie überführt.

MRT

Die Ratten wurden vor der Transplantation einer MRT-Untersuchung zugeführt. Nach der Transplantation erfolgten die MRT-Untersuchungen am Tag 1, 4, 7, 14 und 21. Eine Ratte erhielt weitere Untersuchungen an den Tagen 28, 35 und 42 zur Überprüfung der Langzeitnachweisbarkeit.



Abbildung 4: Kleintier-MRT, 7 Tesla.

Vorbereitung zur Histologie

Für die Vorbereitung der Muskeln zur Paraffin-Weiterverarbeitung erfolgte die Konservierung in 4% Formaldehydlösung.

Für die Vorbereitung der Kryo-Schnitte erfolgte nach einer Vorspülung mit 100 ml PBS eine transkardiale Perfusion mit 200 ml einer 4% PBS gepufferten Glutaraldehydlösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Danach wurden die Muskeln entnommen und zwei Minuten in flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan kryokonserviert.

2.2 EX VIVO

2.2.1 Versuchsgruppen

2.2.1.1 Traumacharakterisierung

In die deskriptive histologische Traumacharakterisierung flossen die histologischen Ergebnisse von insgesamt 30 Ratten ein. Das Trauma wurde an den Tagen 1, 2 und 4 mit jeweils 4 Ratten und langfristig nach 1, nach 4 und nach 8 Wochen mit jeweils 6 Ratten ausgewertet.

Neben der deskriptiven Auswertung erfolgte die histomorphometrische Analyse zum Zeitpunkt der Wochen 1, 4 und 8. Hierbei bezog sich die Auswertung auf den zeitlichen Verlauf der Fibrose und der Angiogenese.

2.2.1.2 MSC-Transplantation

Insgesamt erfolgte die Auswertung dieser Versuchsreihe mit 30 Ratten.

Die deskriptive Auswertung bezieht sich hierbei auf den Nachweis der mittels VSOP markierten Stammzellen. Es wurden hierzu insgesamt 10 Tiere verwendet, welche mittels VSOP markierte transplantierte Stammzellen enthielten. Als Negativprobe wurden 2 Tiere aus der mit NaCl behandelten Gruppe herangezogen.

Des Weiteren erfolgte die deskriptive Auswertung zweier Ratten, welche zusätzlich mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff Hoechst markiert waren.

Zusätzlich erfolgte die histomorphometrische Analyse der Muskeln von 20 weiteren Ratten wobei es sich dabei um 10 Tiere handelte, denen 1×10^6 Zellen transplantiert wurden und um 10

Tiere, denen als Kontrollgruppe statt der Zellen 20 µl physiologische Kochsalzlösung lokal injiziert wurde. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte vier Wochen nach dem Trauma.

Im Folgenden wird auf die Einteilung in die zwei Gruppen „Traumacharakterisierung“ und „MSC“ verzichtet, da es sich um die Beschreibung der einzelnen Methoden handelt, welche anteilig in beiden Gruppen angewandt wurden.

2.2.2 Aufbereitung der Präparate

2.2.2.1 Paraffin

Die entnommenen Muskelpräparate wurden für vier Tage in einer 0,4% Formalinlösung fixiert. Danach wurden sie maschinell mit Hilfe eines Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) nach folgendem Schema für drei Tage entwässert: 1 x 70 %, 2 x 80%, 2 x 96%, 3 x 100% Alkohol, 2 x Xylol, 2 x Paraffin.

Anschließend erfolgte die achsgerechte Einbettung in Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Masfield, USA). Dazu wurden die Präparate aus dem Kunststoffbehälter entnommen, in einer metallenen Gussform achsengerecht mit der Schnittfläche nach unten in flüssigem Paraffin aus dem Paraffinbad (Leica EG 1120, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) eingebettet und mit dem beschrifteten Kunststoffbehälter versehen, womit eine regelrechte Kennzeichnung von Beginn an garantiert wurde. Die Paraffinpräparate härteten im Anschluss auf der Kühlplatte (Leica EG 1300, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) bei -12° C aus, wonach die metallene Gussform entfernt werden konnte.

2.2.2.2 Kryo

Das mittels flüssigem Stickstoff kryokonservierte, auf einem Korkplättchen aufgespannte Präparat wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -8° C tief gefroren aufbewahrt.

2.2.3 Anfertigung der Schnitte

2.2.3.1 Paraffin

Um die Ausdehnung des Paraffins bei Erwärmung zu verhindern, erfolgte eine stetige Kühlung mittels eines Eisblockes, womit ein akkurates Schneiden der Blöcke möglich war. Die Blöcke wurden mit der Schnittfläche parallel zum Messer des Rotationsmikrotoms (Leica RM 2125, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) eingespannt. Nach Aufsuchen der optimalen Schnittfläche durch entsprechendes Einstellen der Blockwinkel wurden 4 µm Serienschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann mittels Pinsel und Sonde in ein 20° C warmes Wasserbad überführt, mit einem feinen Pinsel weitmöglichst geglättet, von einander getrennt und auf beschriftete Objektträger (Marienfeld, Histo Bond Adhäsions-Objektträger 75 x 25 x 1 mm) aufgezogen. Zur weiteren Glättung wurden die auf den Objektträgern haftenden Schnitte in ein 45° C warmes Wasserbad (Leica HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) überführt. Anschließend erfolgte die Trocknung bei 37° C im Brutschrank. Um eine ausreichende Haftung der Präparate am Objektträger zu erzielen, wurden die Präparate für zwei Tage im Brutschrank belassen.

2.2.3.2 Kryo

Die tief gefrorenen Präparate wurden am Kryostaten (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und durch Wärme auf Objektträger aufgezogen. Anschließend erfolgte eine Spülung in Aceton. Nach erfolgter Lufttrocknung wurden die Schnitten wieder der Tiefkühlung überführt.

2.2.4 Vorbereitung zur Färbung

2.2.4.1 Paraffin

Alle Paraffinschnitte wurden für 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiert. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe nach unten stehendem Schema rehydriert und anhand der Inkubation mit Aqua destilata (Aqua dest.) an das wässrige Färbemedium angepasst.

2 x 100% Alkohol je 2 Minuten

1 x 96% Alkohol je 2 Minuten

1 x 80% Alkohol je 2 Minuten

1 x 70% Alkohol je 2 Minuten

1 x Aqua dest. für 2 Minuten

2.2.4.2 Kryo

Die Gefrierschnitte wurden ebenfalls in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und mittels Aqua dest. dem wässrigen Färbemedium angepasst. Es entfielen hier als Unterschied lediglich die Xylobäder, da keine Entparaffinierung von Nöten ist.

2.2.5 Färbungen

2.2.5.1 Konventionelle histologische Färbungen

2.2.5.1.1 HE

Für die deskriptive Histologie wurden die in Paraffin eingebetteten Präparate mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt. Die HE-Färbung ist eine Succedanfärbung, das heißt es wird nacheinander gefärbt. Aus Hämatoxylin, einem aus Blauholz gewonnenen Pflanzenfarbstoff, wird über Oxidation und Zugabe von Alaunen der Farbstoff Hämalaun hergestellt. Der positiv geladene Farbstoff färbt die basophilen Zellbestandteile wie die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums und die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels. Dabei lagern sich die positiv geladenen Komplexverbindungen des Hämalaun an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Das tiefblaue Färbeergebnis der Kerne wird durch Einstellen des pH-Wertes >3 mit Hilfe des Leitungswassers erreicht. Dieser Schritt bezeichnet das sogenannte Bläuen. An den damit abgeschlossenen progressiven Teil der HE-Färbung schließt sich der regressive Teil, die Eosin-Färbung. Das negativ geladene Eosin gehört der Fluoreszin-Gruppe an und bindet sich über elektrostatische Adsorption an die positiv geladenen Gewebsbestandteile, womit die rötliche Plasmafärbung zustande kommt. Regressiv bedeutet hier, dass erst überfärbt und dann differenziert wird.

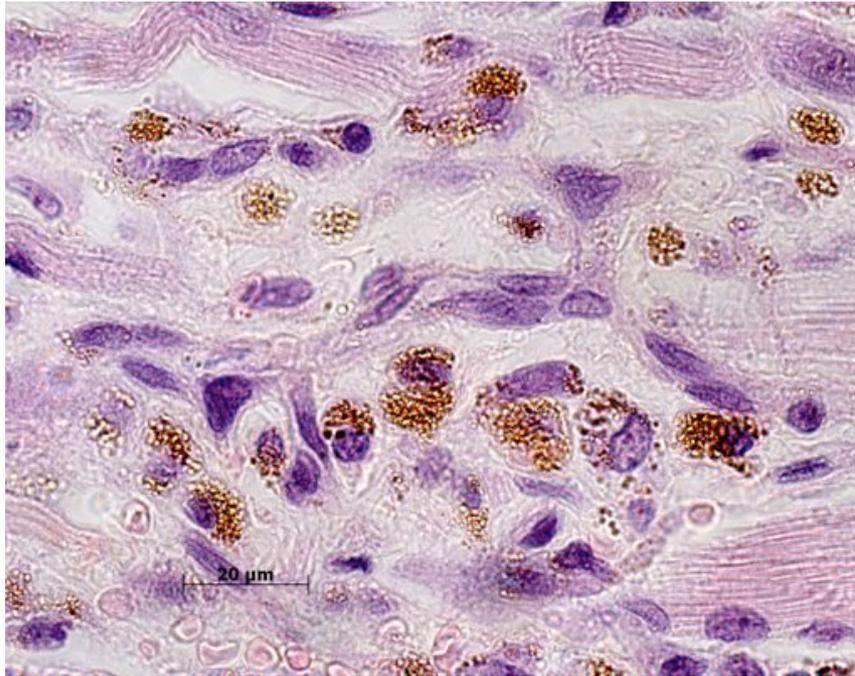


Abbildung 5: *Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Musculus soleus nach Transplantation VSOP markierter MSC 21 d nach der Transplantation. Die VSOP erkennt man an braun-goldenen Partikelansammlungen.*

Durchführung:

- Hämatoxylin nach Harris für 7 Minuten
- 3 x Spülen in Aqua dest.
- HCl-Alkohol 0,25% kurz
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- 3-4 x Tauchen in Eosin
- Entwässern in 2 x 96% Alkohol und 2 x 100% Alkohol
- Entfetten mit Xylol 2 x 10 Minuten

Danach erfolgte die Konservierung der Schnitte mittels 24 x 60 mm großen Deckgläsern (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) unter der Verwendung von Vitro Clud (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland).

2.2.5.1.2 Berliner Blau

Mit der Berliner Blau Reaktion, auch bekannt als Preußisch Blau Reaktion, wird dreiwertiges Eisen über zweiwertiges Kaliumhexacyanoferrat nachgewiesen. Der Name Berliner Blau geht dabei auf den Berliner Chemiker und Farbenhersteller Diesbach zurück, der 1704 zufällig diesen ersten synthetischen Farbstoff entdeckte. Er fand nicht nur in der Kunst große Bedeutung, sondern auch in der Medizin bei Cäsium- oder Thalliumvergiftungen. Dabei bindet sich das Berliner Blau durch Kationenaustausch an das Gift, womit es über den Darm ausgeschieden und somit nicht mehr aufgenommen wird.

Bei dieser Färbung wird 2% Kaliumhexacyanoferrat (II) (Merck, Deutschland) mit 2% Salzsäure (Merck Deutschland) zu gleichen Teilen versetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Lösung jeweils frisch angesetzt wird und die Benutzung von metallenen Gegenständen, wie zum Beispiel die Bügel der Färbeschiffchen, vermieden werden muss um Artefakte zu vermeiden. Die Darstellung der Kerne erfolgt über die Gegenfärbung mit Kernechtrot.

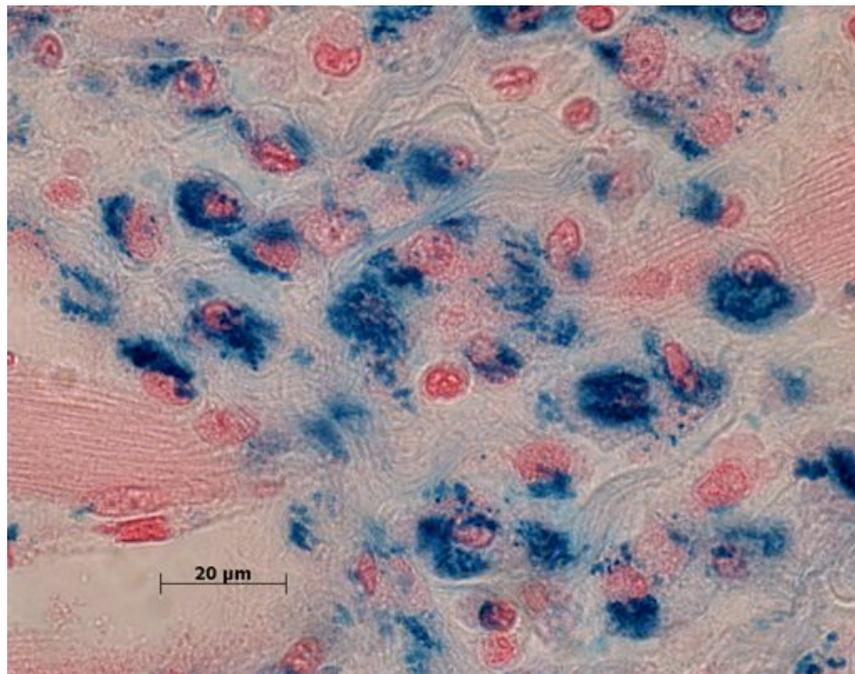


Abbildung 6: *Berliner Blau Reaktion im Musculus soleus nach Transplantation VSOP markierter MSC, 21 d nach der Transplantation, starke Blaufärbung des VSOP markierten MSC.*

Durchführung:

- 2 x Aqua dest. jeweils 5 Minuten
- „Berliner Blau Lösung“ (Herstellung siehe oben) für 20 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Kernechtrot für 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Entwässern anhand der aufsteigenden Alkoholreihe
 - 70% Alkohol für 2 Minuten
 - 80% Alkohol für 2 Minuten
 - 96% Alkohol für 2 Minuten
 - 2 x 100% Alkohol für je 2 Minuten
- Entfetten mit Xylol, 2 x 10 Minuten

Eindeckeln der Schnitte wie unter 3.5.1.1. beschrieben.

2.2.5.1.3 Siriusrot

Mit der Siriusrotfärbung werden Kollagenfasern nachgewiesen, welche sich unter dem Polarisationsmikroskop auf Grund ihrer Anisotropie differenziert darstellen. Dabei erscheinen dünne Fasern grün und dickere Fasern orange-rot. Die aus Kollagen IV bestehende Basalmembran wird dabei nicht dargestellt. Die Siriusrotfärbung ist spezifischer als die Elastica von Gieson Färbung.

Zur Herstellung der Siriusrot-Färbelösung wurden 5 g Sirius Red (Fluka, Direct Red 80, Sigma-Adrich, München, Deutschland) in 500 ml gesättigter Pikrinsäure (Honeywell Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland) gelöst. Dazu wurde die Lösung, bestehend aus 5 g Sirius Red, 500 ml Aqua dest. und Pikrinsäure, bis zur Ausfällung von Kristallen mit Pikrinsäure angereichert. Das Essigwasser wurde aus 1000 ml Aqua dest. und 5 ml Eisessig hergestellt.

Lichtmikroskopisch stellen sich die Kollagenfasern rot und das Zytoplasma gelb dar. Beim Entwässern ist auf extrem kurze Einwirkzeiten des jeweiligen Alkohols zu achten, da sich sonst das Pikringelb wieder aus dem Zytoplasma löst.

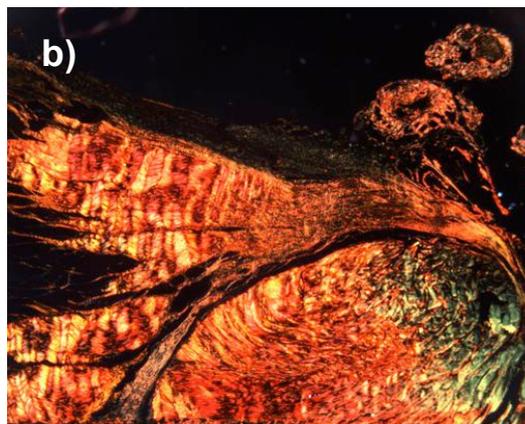
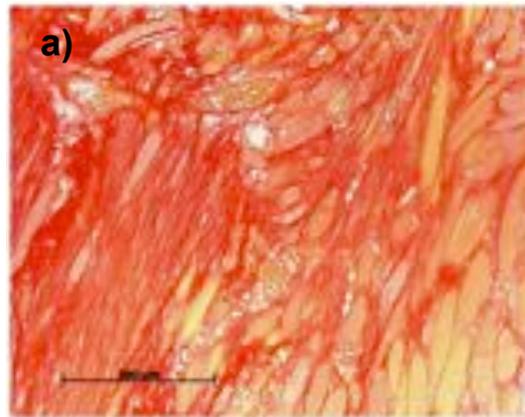


Abbildung 7:a) Siriusrotfärbung eines traumatisierten Musculus soleus 4 Wochen nach dem Trauma. **b)** Muskelsehnenübergang in Siriusrotfärbung unter polarisiertem Licht.

Durchführung:

- Inkubation mit Siriusrot-Färbelösung für 60 Minuten
- Spülen in Aqua dest.
- Entfernen der überschüssigen Farbreste durch Essigwasser, 2 x Spülen
- Spülen in Aqua dest.
- Entwässern anhand der aufsteigenden Alkoholreihe
 - 70% Alkohol
 - 80% Alkohol
 - 96% Alkohol
 - 2 x 100%Alkohol
- Entfetten mit Xylol, 2 x 10 Minuten

Eindeckeln der Schnitte wie unter 3.5.1.1. erwähnt.

2.2.5.2 Markierung

Die Zellkernmarkierung mittels des fluoreszierenden Kernfarbstoffes Hoechst 33342 erfolgte bereits *in vitro*. Eine Lichtabschirmung der Schnitte musste während der Auswertung beachtet werden.

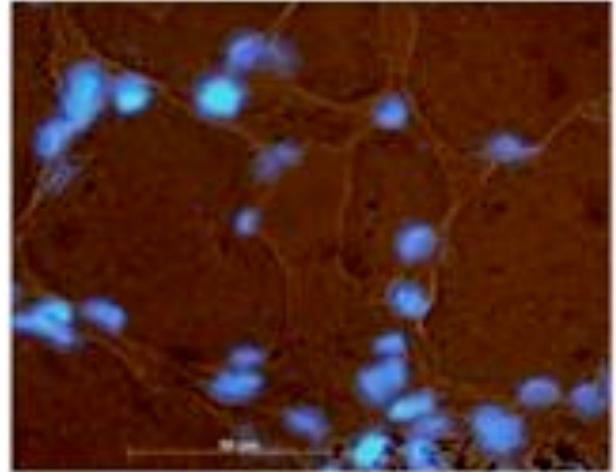


Abbildung 8: Zusätzlich zu den VSOP mittels Hoechst markierte Zellkerne im Musculus soleus, 21 d nach der Transplantation.

2.2.5.3 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie macht man sich das System der Antigen-Antikörper-Bindung zunutze. Durch die Spezifität der Antikörper (Ak) kann man gezielt die gesuchten Antigene (Ag) im Präparat nachweisen. Dafür wird ein unkonjugierter Primärantikörper (PAK) auf das Gewebe gegeben, welcher sich dann gezielt gegen die Gewebe-Ags richtet. Um die unspezifische Bindung an andere Proteine durch Ladungsverteilungen oder ähnliche Strukturen zu vermeiden, werden sie durch Aufbringen von Normalserum geblockt. Die Ag-Ak-Komplexe werden durch die Zugabe des biotinylierten sekundären Aks detektiert, welcher sich an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, verwendet man Normalserum aus der Tierspezies, aus der der sekundäre Antikörper gewonnen wurde. Durch die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes wird die hohe Sensitivität der hier in der Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen gewährt. Avidin, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glycoprotein, besitzt eine hohe Affinität zu Biotin (Vitamin H). Das an den Zweitantikörper gekoppelte Biotin kann somit eine der vier Bindungsstellen des Avidins besetzen. Die weiteren Bindungsstellen können durch an Biotin gekoppelte Markermoleküle besetzt werden. In den immunhistochemischen Versuchen dieser Arbeit dient die Alkalische Phosphatase als Markermolekül und katalysiert ihrerseits die folgende Farbreaktion. Bei der zugegebenen Substrat-Chromogen-Lösung handelt es sich um Neufuchsin als Substrat, das durch

die gekoppelte Alkalische Phosphatase enzymatisch zum sichtbaren roten Chromogen reduziert wird. Das in der Substrat-Lösung enthaltene Chromogen sichert den optimalen pH-Wert für die stattfindende enzymatische Reaktion. Die dadurch sichtbar gewordenen Gewebsstrukturen können nun zur quantitativen und deskriptiven Auswertung herangezogen werden.

Durchführung:

- Spülen in PBS-Puffer, pH-Wert 7,2 2 x 5 Minuten
- Umranden der Schnitte mit Fettstift (Pap Pen, The Binding Site, Birmingham, GB)
- Demaskierung der Ags durch Pepsin oder Hyaluronidase falls nötig bei 37° C mit anschließendem Spülschritt in PBS-Puffer für 2 x 5 Minuten
- Inkubation mit Normalserum (Vectastain ABC Kit, Elite PK 6200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur (RT) für 20 Minuten
- Inkubation mit Primärantikörper bei 4° C über Nacht
- Spülen in PBS-Puffer 2 x 5 Minuten
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Ak (Vector Laboratories, Burlingame, USA) bei RT 30 Minuten
- Spülen in PBS-Puffer 2 x 5 Minuten
- Inkubation mit dem AB-Komplex (Alkaline Phosphatase Standard Kit AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) bei RT für 50 Minuten
- Spülen in PBS-Puffer 2 x 5 Minuten
- Inkubation mit Chromogen-Puffer, pH-Wert 8, 25 Minuten
- Inkubation mit AP-Substrat (Red Alkaline Substrate Kit I, SK-5100, Vector Laboratories, Burlingame, USA) Entwicklung unter Sichtkontrolle (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland)
- Abstoppen der Farbreaktion durch Spülen in PBS-Puffer kurz
- Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer
- Spülen in Aqua dest. kurz
- 3 x Tauchen in Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Spülen in Aqua dest. kurz
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser 1-2 Minuten
- Aufsteigende Alkoholreihe (1 x 70%-80%-96%, 2 x 100%) jeweils 1 Minute
- Entfetten in Xylol 2 x 5 Minuten

Für die Auswertung der Angiogenese wurde hier der Monoclonal Mouse Anti-Human α -SMA Antikörper (Daco Cytomation, Glostrup, Denmark) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

Für die Deskription in der Traumacharakterisierung wurden zusätzlich noch Monoclonal Mouse Anti-Human ED1 und Desmin (Daco Cytomation, Glostrup, Denmark) in einer Verdünnung 1:100 verwendet.

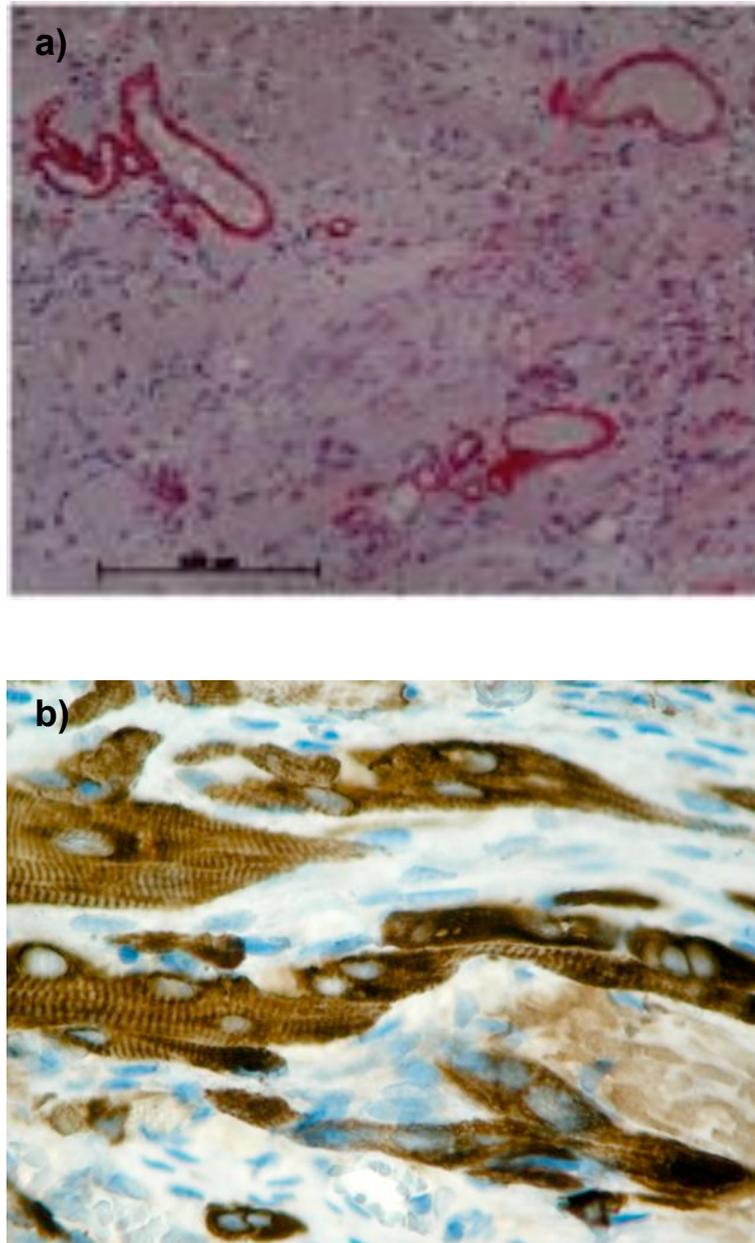


Abbildung 9: Immunhistochemie des *Musculus soleus* 1 Woche nach dem Trauma. **a)** α -SMA
b) Desmin

Abschließend erfolgte auch hier die Konservierung der Schnitte mittels Deckgläschen, siehe 3.5.1.1.

2.2.6 Auswertung der histologischen Präparate

2.2.6.1 Deskriptive Histologie

Die jeweiligen Schnitte der Versuchstiere aus der Traumacharakterisierung wurden lichtmikroskopisch mittels eines Leica DMRB Lichtmikroskopes (Leica, Wetzlar, Deutschland) in verschiedenen Vergrößerungen untersucht und abfotografiert.

Die Hoechst-markierten Schnitte wurde mittels eines Leica DMRB Fluoreszenzmikroskopes (Leica DMRB Mikroskop, Leica, Deutschland) mit den Wellenlängen 365 und 420 nm untersucht und abfotografiert.

Die mittels der Berliner Blau Reaktion gefärbten Schnitten wurden komplett aufgeschnitten und gefärbt (jeder 20. Schnitt) um eine möglichst genaue Korrelation zu den MRT-Bildern zu erhalten.

2.2.6.2 Histomorphometrie

2.2.6.2.1 Einlesen der Schnitte

Die Siriusrot/ α -SMA gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Wetzlar, Germany) grob orientierend in 25er Vergrößerung betrachtet und dann eingelesen. Über eine mit dem Mikroskop verbundene Kamera (Zeiss, AxioCam, MRc, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurden die erstellten Einzelbilder in das Programm Axio Vision Rel. 4.4 übertragen.

Um den gesamten Schnitt auswerten zu können, wurde das Präparat jeweils in der oberen linken, sowie der unteren rechten Ecke markiert. Für die Mosaikaufnahme wurden im Programm eine Überlappung von 15-20% und der automatische Autofokus auf jede Kachel eingestellt. Nach dem Stitching der Kacheln wurden die Bilder jeweils konvertiert und ein Maßstabsbalken eingefügt.

2.2.6.2.2 Quantifizierung der Fibrose

Anhand des Programms KS Run 400 3.0 (Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland) wurde die Quantifizierung des kollagenen Bindegewebes vorgenommen. Die eingelesenen Schnitte wurden mit einem Freihand-Tool umfahren, wodurch ihre Gesamtfläche ermittelt wurde. Die Fibrose wurde anhand der Farbpixel vom Programm markiert und konnte manuell unter mikroskopischer Kontrolle nachbearbeitet und somit zusätzlich sequenziert werden. Die somit entstandene Maske wurde nochmals korrigiert, wobei die Sehnenansätze manuell

herausgeschnitten wurden. Die absolute Fläche der Fibrose wurde in Prozent angegeben und anschließend zur Gesamtfläche ins Verhältnis gestellt.

2.2.6.2.3 Beurteilung der Gefäße

Die α -SMA gefärbten Schnitte wurden zur Gefäßauswertung mit dem Photoprogramm Adobe Photoshop 8.0.1 ausgewertet. Dafür wurde das Präparat anhand eines Rasters in regions of interest (ROIs) aufgeteilt. Innerhalb der ROIs wurden dann die durch die immunhistochemische Färbung sichtbar gewordenen Gefäße erneut markiert und anhand einer am Maßstab kalibrierten Ellipse in kleine und große Gefäße eingeteilt. Als kleine Gefäße galten dabei alle Gefäße mit einem Durchmesser unter 40 μm und als große Gefäße dementsprechend alle Gefäße größer gleich 40 μm . Am Ende der Auswertung aller ROIs wurde die jeweilige Gefäßanzahl addiert um den absoluten Wert für einen Schnitt zu erhalten.

2.2.7 Statistische Auswertung

In der deskriptiven Statistik sind die absolute und die relative Häufigkeit als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich der von einander unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben verwendet. Bei den intraindividuellen Ergebnisvergleichen wurde der Wilcoxon-Test für abhängige, nicht parametrisch verteilte Stichproben gebraucht. Ein Testergebnis wurde als signifikant bei $p \leq 0,05$ angenommen.

Die gesamte histologische Auswertung erfolgte durch einen verblindeten Untersucher.

3 ERGEBNISSE

3.1 Traumacharakterisierung

3.1.1 Deskription

In der histologischen Auswertung des Traumas am ersten posttraumatischen Tag zeigten sich in der Siriusrotfärbung zum einen stark geschwollene rote Muskelfasern mit intakter Begrenzung, zum anderen rupturierte Muskelfasern. Die beiden verschiedenen Typen beschädigter Muskelfasern lassen sich zwei Verletzungstypen zuordnen:

- In-situ-Nekrose-Typ
- Abscherungs-/Zerreißungs-Typ

Die Tatsache, dass bei der Scherverletzung ebenfalls die in der Siriusrotfärbung nicht angefärbten Basalmembranen zerreißen, lässt sich mit den Auswertungen der Tage 2 und 4 bestätigen. An diesen Tagen zeigten sich zunehmend isolierte regenerierende Muskelfasern in der Siriusrotfärbung.

Die vom Quetschtrauma ausgesparte Area nervovascularia zeigte sich histologisch ebenfalls indirekt vom Trauma beeinträchtigt. Es fanden sich eine massive Infiltration der Region durch inflammatorische Zellen, hauptsächlich Monozyten und Makrophagen, sowie ein ausgeprägtes interstitielles Hämatom. Gegenüber den gequetschten Arealen wies die Area nervovascularia jedoch deutlich mehr intakte Muskelfaserareale auf.

Im kurzfristigen zeitlichen Verlauf zeigten sich die inflammatorischen Zellen unmittelbar nach dem Trauma präsent. Der Höhepunkt der inflammatorischen Reaktion lag am zweiten und vierten posttraumatischen Tag.

Eine Woche nach dem Trauma zeigten sich die größten Teile des Hämatoms resorbiert. Es ließ sich nun lockeres Bindegewebe finden, welches von Monozyten und Makrophagen durchsetzt war, womit die Inflammation zu diesem Zeitpunkt weiterhin nachweisbar war, wie in den Abbildungen 11, 12 und 15 mittels HE-Färbung und Siriusrot-Färbung dargestellt. Gegenüber den ersten Tagen dominierten nun jedoch zentrinnukleäre Muskelfasern als Zeichen der Regeneration das Bild, veranschaulicht durch Abbildung 16, Desminfärbung. Weiterhin ließen sich multiple neu gebildete vaskuläre Strukturen abgrenzen, ebenfalls als Zeichen der stattfindenden Regeneration.

Vier Wochen nach dem Trauma zeigte sich in der Siriusrot-Färbung das lockere Bindegewebe in straffes Bindegewebe umgewandelt, wobei einige Fibroblasten immer noch eine lockere Kernchromatinstruktur aufwiesen, sprechend für die weiterhin bestehende Aktivität. Vereinzelt ließen sich in den Strukturen kleine Narbenareale finden, jedoch fanden sich die Hauptanteile des Bindegewebes interstitiell zwischen den in Regeneration befindlichen Muskelfasern.

Acht Wochen nach dem Trauma zeigte sich alles Bindegewebe ausgereift, die Fibroblasten wiesen alle bereits spindelförmige Kerne auf. Lockeres Bindegewebe ließ sich kaum noch finden, der überwiegende Teil stellt sich als reifes Bindegewebe dar, sichtbar gemacht unter dem Polarisationsmikroskop anhand der Siriusrot gefärbten Schnitte. Das interstitielle Bindegewebe zwischen den regenerierten Muskelfasern konnte nun als endo- und perimysiales Kollagendepot identifiziert werden. Der Hauptanteil der existenten Muskelfasern zeigte sich ausgereift mit randständigen Zellkernen, es fanden sich lediglich noch vereinzelte in Regeneration begriffene Muskelfasern.

Der hier charakterisierte kurz- und langfristige zeitliche Verlauf der posttraumatischen Regeneration kann wie bereits in der Literatur vorher beschrieben in die drei Phasen der Inflammation/Regeneration/Heilungsabschluss mit Fibrosereifung unterteilt werden [36]. Eine deutliche Überlappung der Phasen wurde festgestellt.

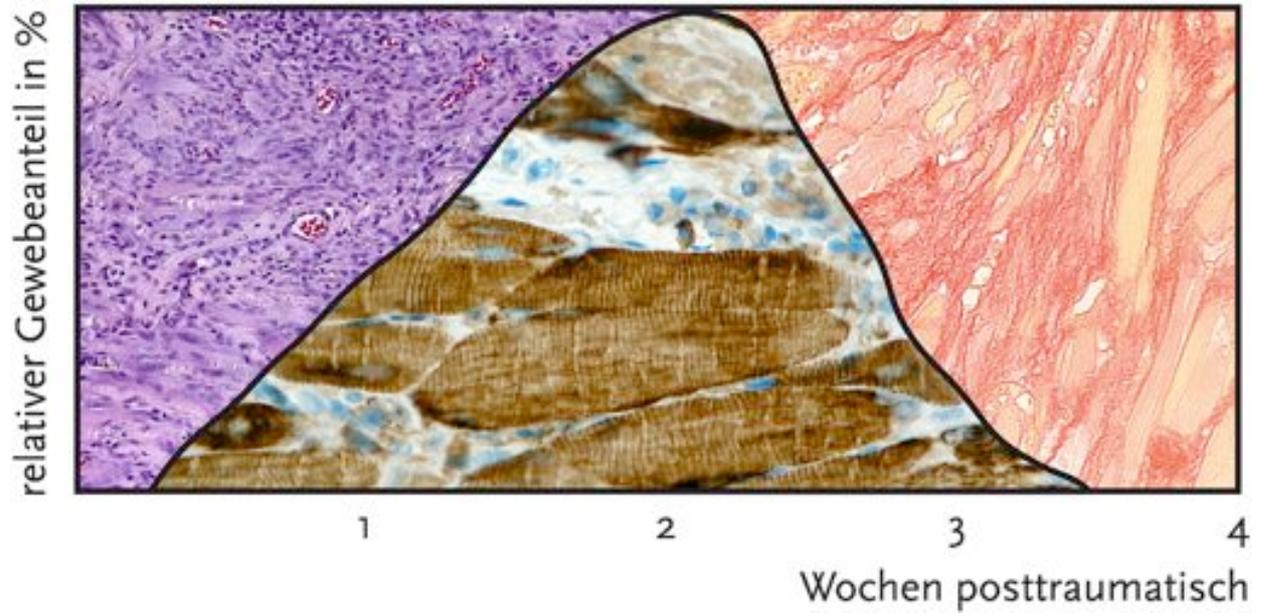


Abbildung 10: Die drei Phasen der Regeneration nach Li & Huard: Inflammation, Regeneration und Heilungsabschluss, insgesamt in ihren Startpunkten überlappend.

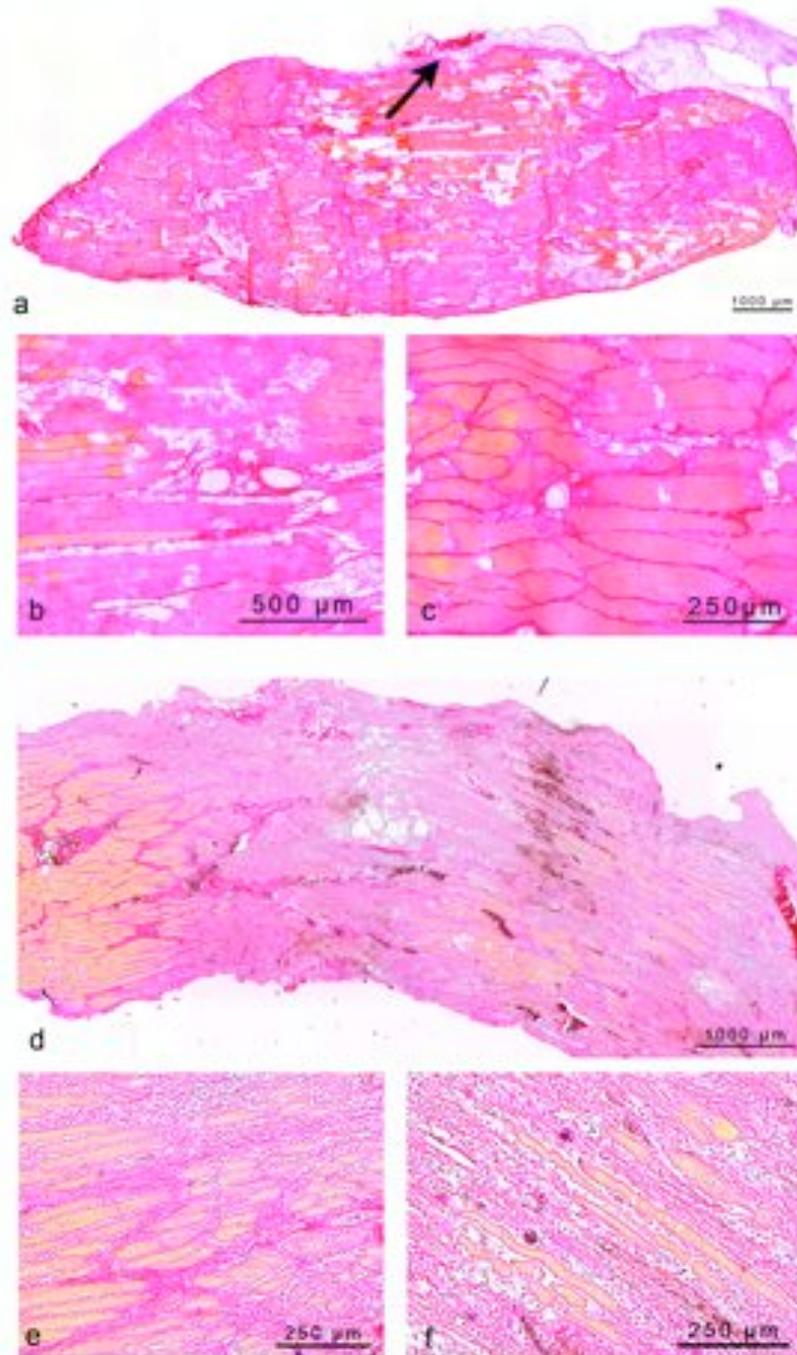


Abbildung 11: Siriusrot gefärbte Kryo-Schnitte des Musculus soleus in den ersten vier Tagen nach dem Trauma. **a)** Übersicht mit ersichtlicher Area nervovascularosa. **b)** Rupturierte Muskelfasern **c)** Pränekrotische geschwollene Fasern als Ausdruck der in situ Nekrose. **d)** Übersicht der erhaltenen Area nervovascularosa. **e)** Inflammation an der Grenzzone. **f)** Muskelfasern umgeben von losem Bindegewebe.

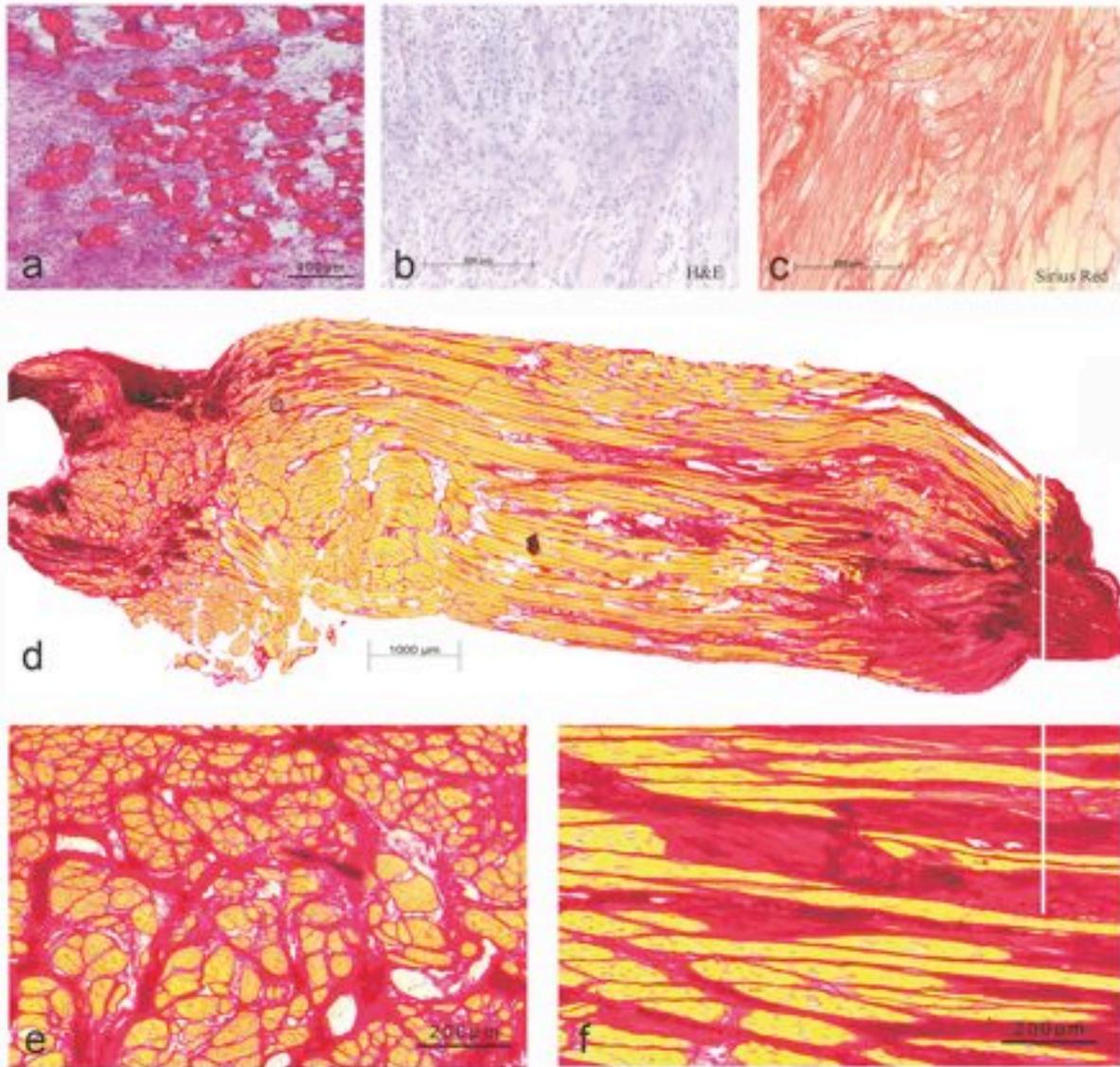


Abbildung 12: *Musculus soleus* 4 Tage, 1, 4 und 8 Wochen nach Trauma. **a)** Querschnittener Gefrierschnitt mit ausgeprägtem inflammatorischem Gewebe 4 Tage nach Trauma (HE). **b)** Zellreiches loses Bindegewebe und regenerierende Muskelfasern im Paraffinschnitt 1 Woche nach Trauma (HE). **c)** Siriusrot mit Darstellung des dichten Bindegewebes mit lokaler Narbenbildung 4 Wochen posttraumatisch. **d)** Siriusrot gefärbter kompletter Längsschnitt 8 Wochen nach Trauma mit typischer Fibrosebildung distal und proximal der ausgesparten Area nervovascularia. **e)** und **f)** Detailausschnitte aus **d)** mit bereits interstitiell formiertem Bindegewebe.

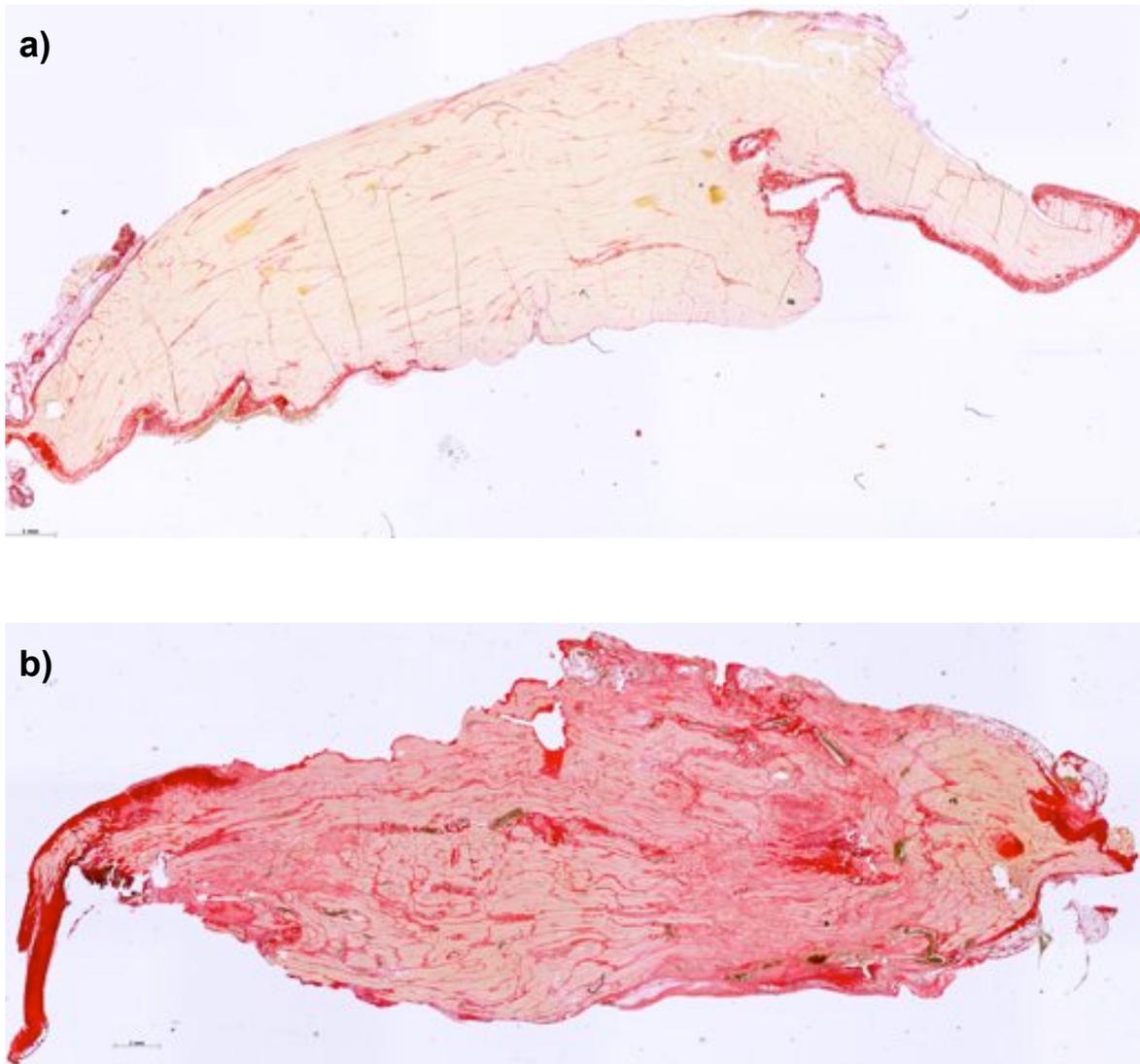


Abbildung 13: **a)** Siriusrot gefärbter kompletter Längsschnitt eines gesunden Musculus soleus.
b) Siriusrot gefärbter kompletter Längsschnitt eines traumatisierten Musculus soleus, 8 Wochen nach dem Trauma. Lichtmikroskopische Darstellung.

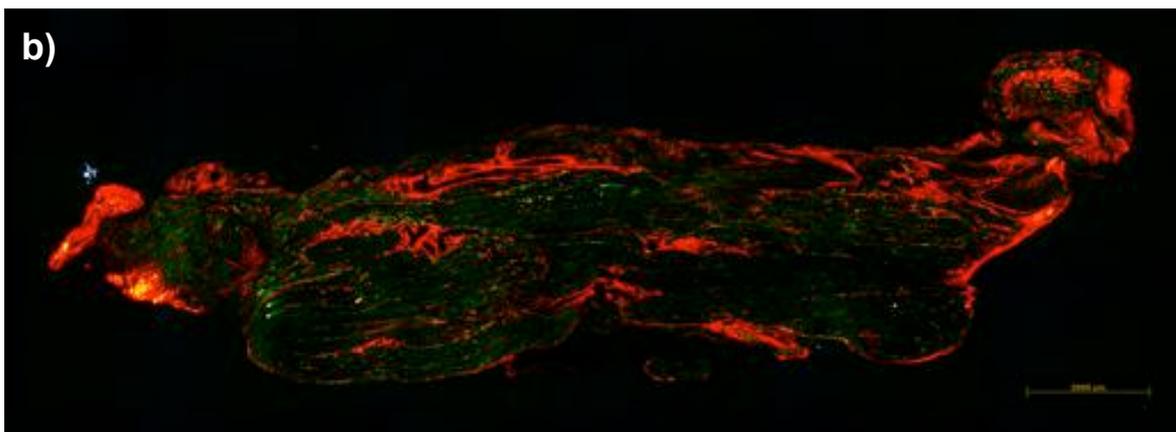
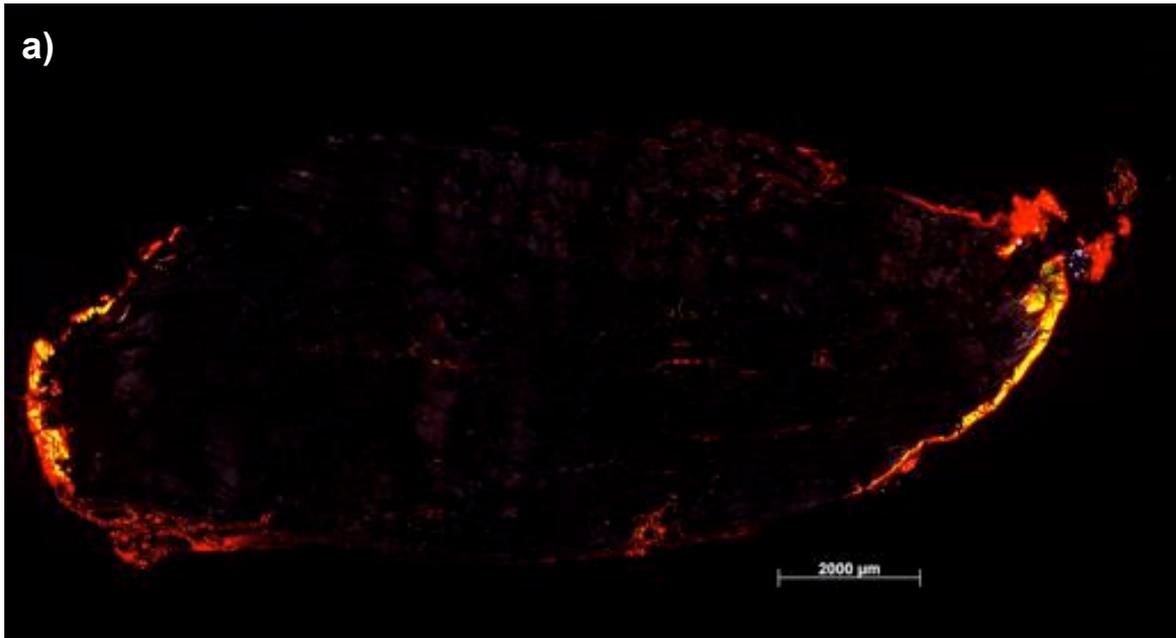


Abbildung 14:a) Siriusrot gefärbter kompletter Längsschnitt eines gesunden Musculus soleus. b) Siriusrot gefärbter kompletter Längsschnitt eines traumatisierten Musculus soleus 8 Wochen nach dem Trauma. Darstellung unter polarisiertem Licht.

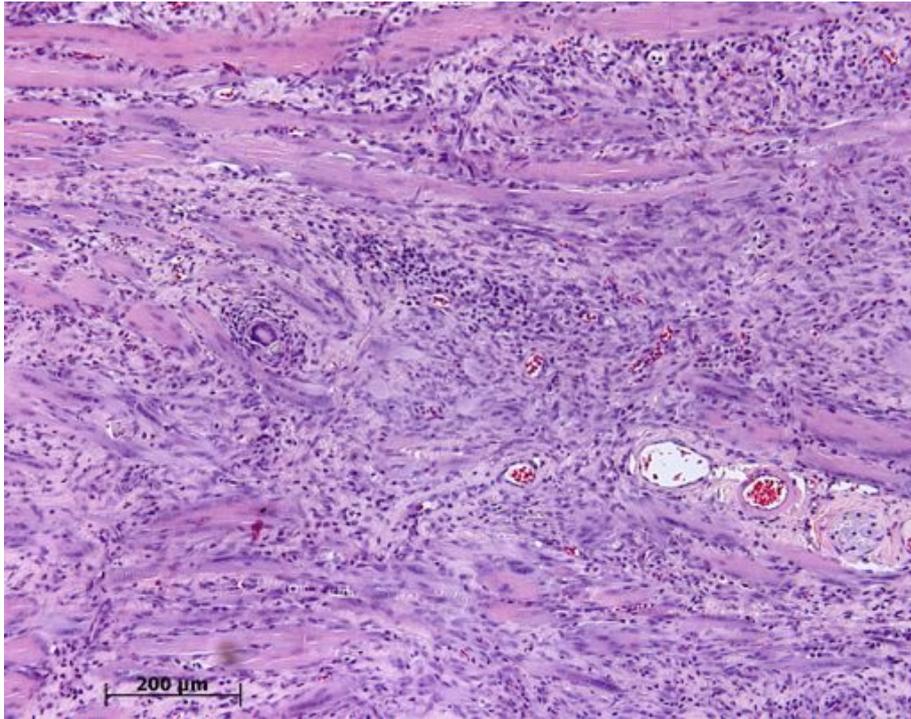


Abbildung 15: Darstellung der ausgeprägten Inflammation in der Frühphase, wenige Tage nach dem Trauma; dargestellt mittels der HE-Färbung

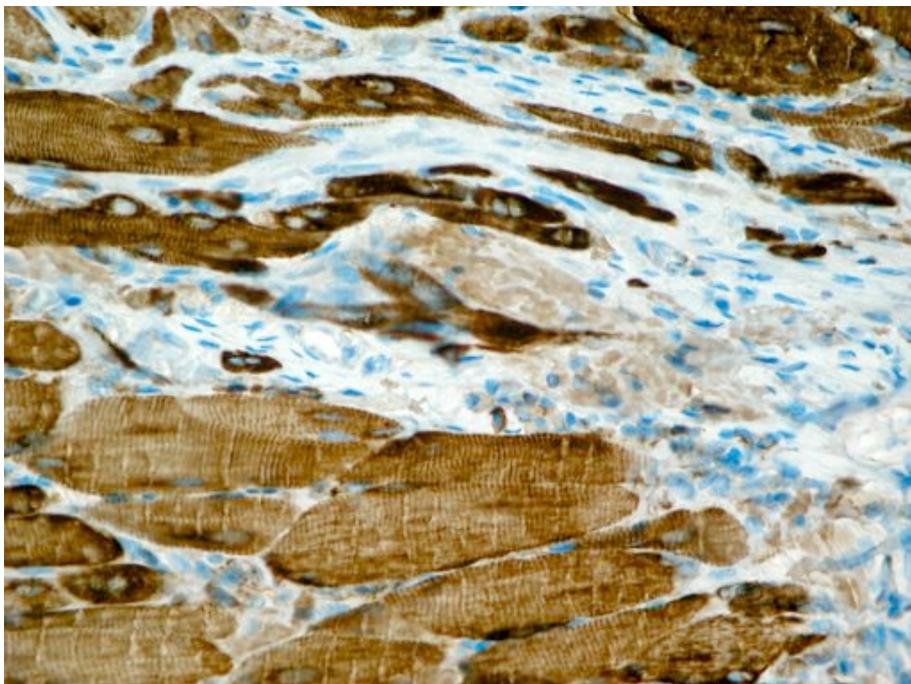


Abbildung 16: Darstellung in Regeneration befindlicher Muskelfasern neben losem Bindegewebe circa eine Woche nach dem Trauma; dargestellt mittels der immunhistologischen Desmin-Markierung.

3.1.2 Fibrose

Die histomorphometrische Auswertung der bindegewebigen Areale erfolgte 1, 4 und 8 Wochen nach stattgehabtem Quetschtrauma.

Eine Woche nach dem Trauma lag der Anteil des kollagenen Bindegewebes im gesamten Muskel bei $40 \pm 4\%$. Nach vier Wochen zeigte sich eine Reduktion auf $24 \pm 8\%$, nach acht Wochen zeigte sich keine weitere wesentliche Reduktion. Die in der ersten Woche beschriebenen $40 \pm 4\%$ repräsentieren dabei loses Bindegewebe, welches sich im Verlauf der folgenden Wochen der Reifung unterzieht.

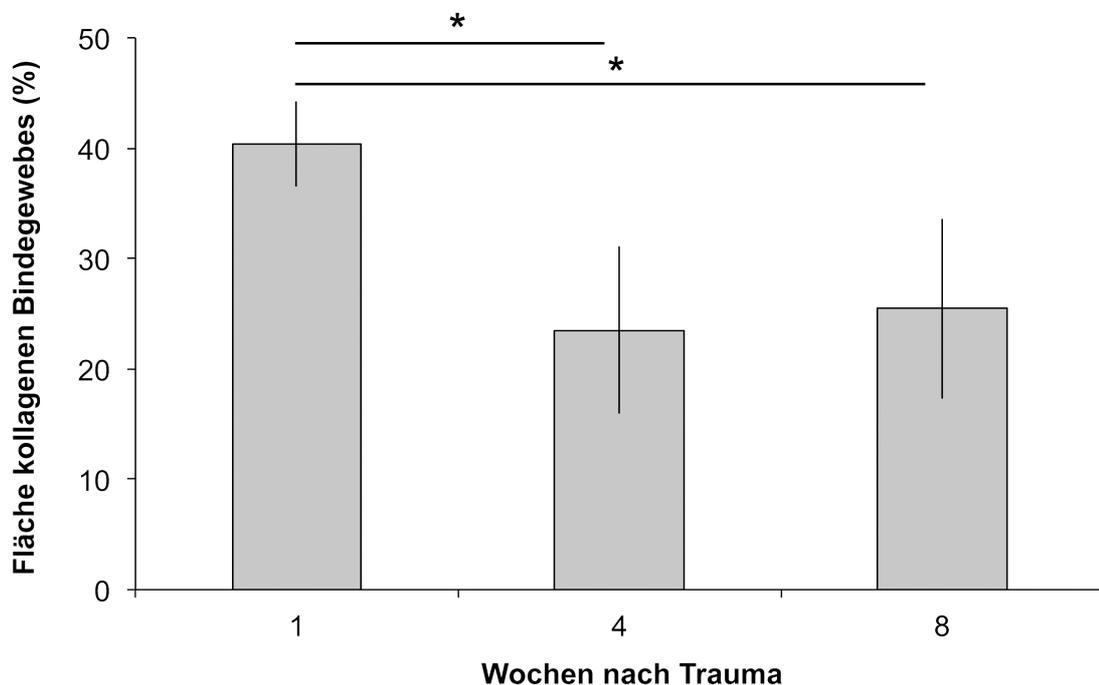


Abbildung 17: Relativer Anteil der Fibrose des gesamten Muskels im zeitlichen Verlauf.

3.1.3 Angiogenese

In der histomorphometrischen Auswertung der Angiogenese wurden die Gefäße in kleine und große Gefäße unterteilt und anschließend 1, 4 und 8 Wochen nach dem Traum ausgewertet.

In der ersten Woche fanden sich 145 ± 23 kleine und 85 ± 14 große Gefäße pro Schnitt. Zum nächsten Messzeitpunkt nach vier Wochen zeigte sich die Zahl der kleinen Gefäße mit 146 ± 53 nahezu identisch, die Zahl der großen Gefäße sank auf 37 ± 15 . Die letzte Messung zeigte ein weiteres Absinken der kleinen Gefäße und ein geringes Anwachsen der großen Gefäße. Im

gesamten Verlauf sinkt die Gesamtanzahl der Gefäße, dabei folgen die kleinen Gefäße den Großen, was insgesamt für eine lange Remodellingzeit der Angiogenese spricht.

Als Kontrolle wurde die Gegenseite mit 38 ± 25 kleinen und 34 ± 18 großen Gefäßen herangezogen.

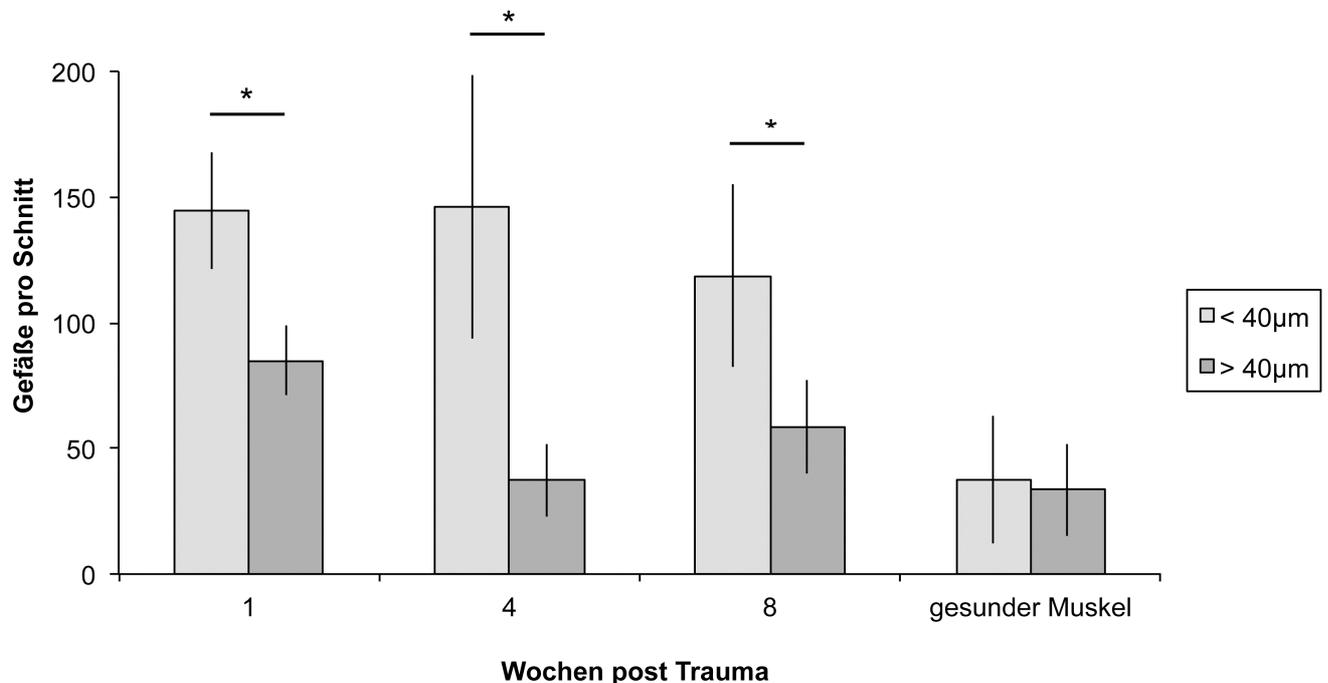


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der kleinen und großen Gefäße im posttraumatischen Muskel mit der gesunden Gegenseite im Vergleich.

3.2 MSC-Transplantation

3.2.1 Deskription

Der deskriptive Abschnitt der MSC-Versuchsreihe bezieht sich auf die Korrelation der makroskopisch mittels MRT lokalisierten und mikroskopisch mittels Berliner Blau Reaktion und Hoechst visualisierten MSC.

In den transplantierten Muskeln konnten die VSOP markierten MSC nachgewiesen werden. Die Negativprobe der mit NaCl behandelten Tiere wies keine mittels Berliner Blau markierte Zellen nach, es zeigten sich auch keine weiteren Areale angefärbt, womit die Färbung als sensitiv für

die Eisenoxidnanopartikel anzusehen ist. Die genaue histologische Durchsicht der Berliner Blau positiven Schnitte zeigte alle Eisenpartikel intrazellulär, die beladenen Zellen fanden sich zumeist im Interstitium.

Neben den interstitiell gelegenen Zellen konnten auch einige wenige Fusionsereignisse von MSC mit regenerierenden Muskelfasern identifiziert werden. Diese waren gekennzeichnet von intramysial unterhalb des Sarkolemms gelegenen aktiven Zellkernen, die noch von Eisenoxidnanopartikeln umgeben waren, welche im Begriff waren, in das Sarkoplasma zu diffundieren.

Die Hoechst Kernmarkierung zeigte ebenfalls die MSC zuverlässig auf, die Eisennanopartikel ließen sich hierbei als kleine dunkle Partikel um den Kern herum angeordnet nachweisen.

Zur Korrelation mit den makroskopischen Ergebnissen des Zellpools aus den MRT-Daten wurden einzelne Muskeln komplett aufgeschnitten und gefärbt, anschließend mit der entsprechenden MRT-Schicht korreliert. Die Verteilung der Zellen auf histologischem Niveau entsprach hierbei der makroskopischen Verteilung. Eine versehentliche Fehltransplantation der MSC in den unverletzten Musculus peroneus erwies eine nahezu lineare Ausbreitung der Zellen entlang des Stichkanals, histologisch sowie auch in der MRT.

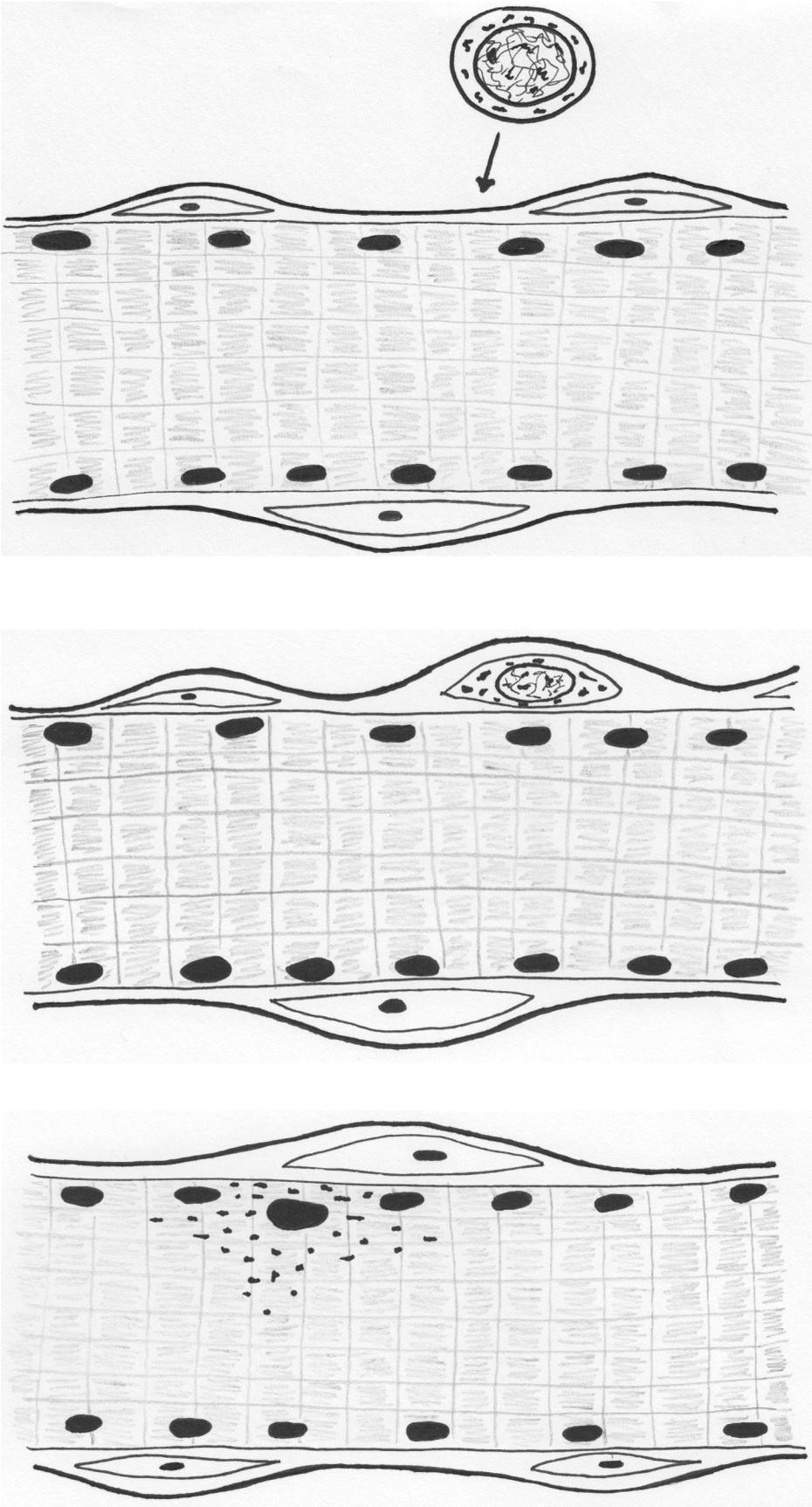


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Fusionsereignisse.

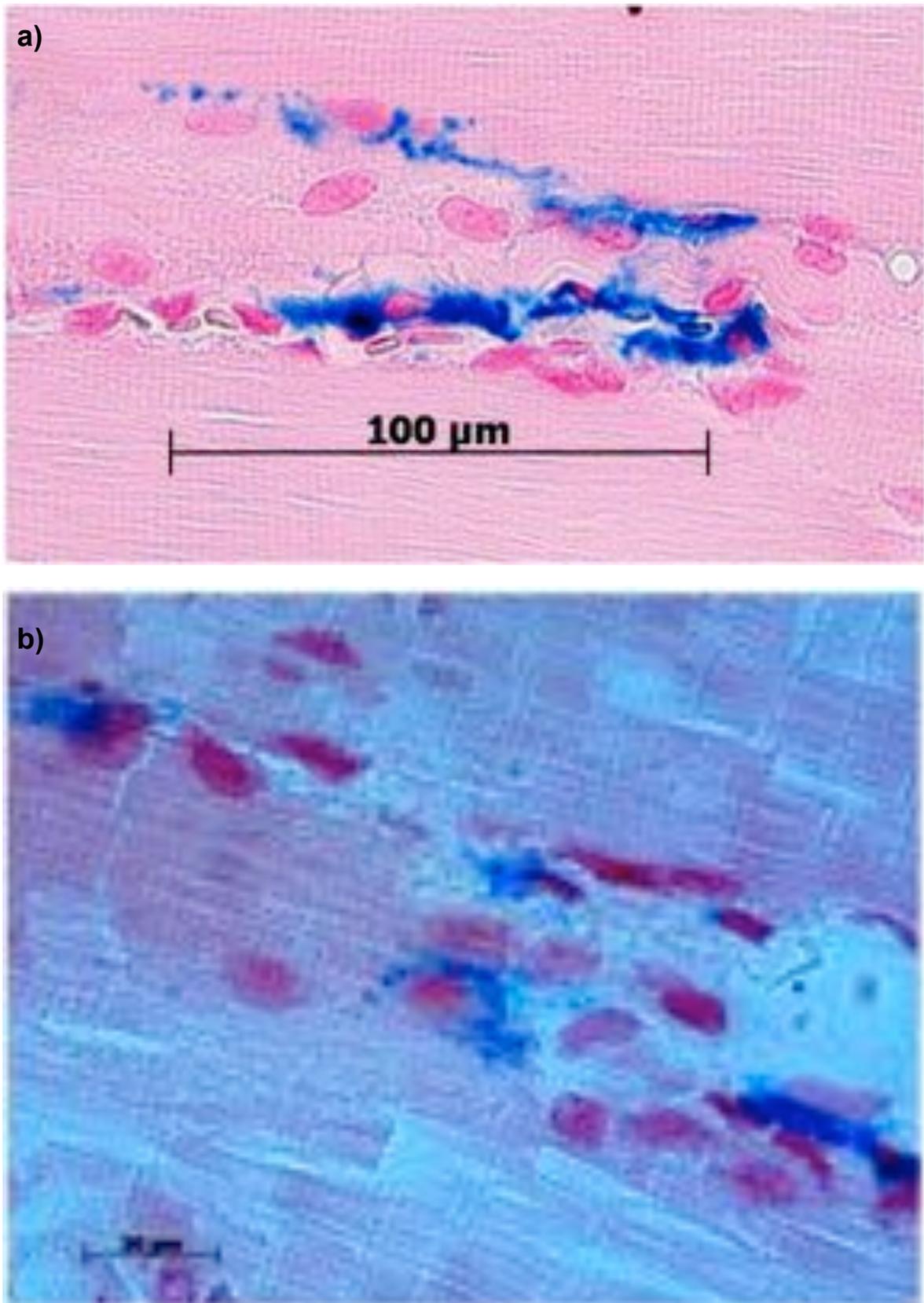


Abbildung 20: a) und b) VSOP markierte MSC dargestellt mittels der Berliner Blau Reaktion mit ersichtlichen Fusionsereignissen zwischen VSOP markierten MSC und regenerierenden Muskelfasern.

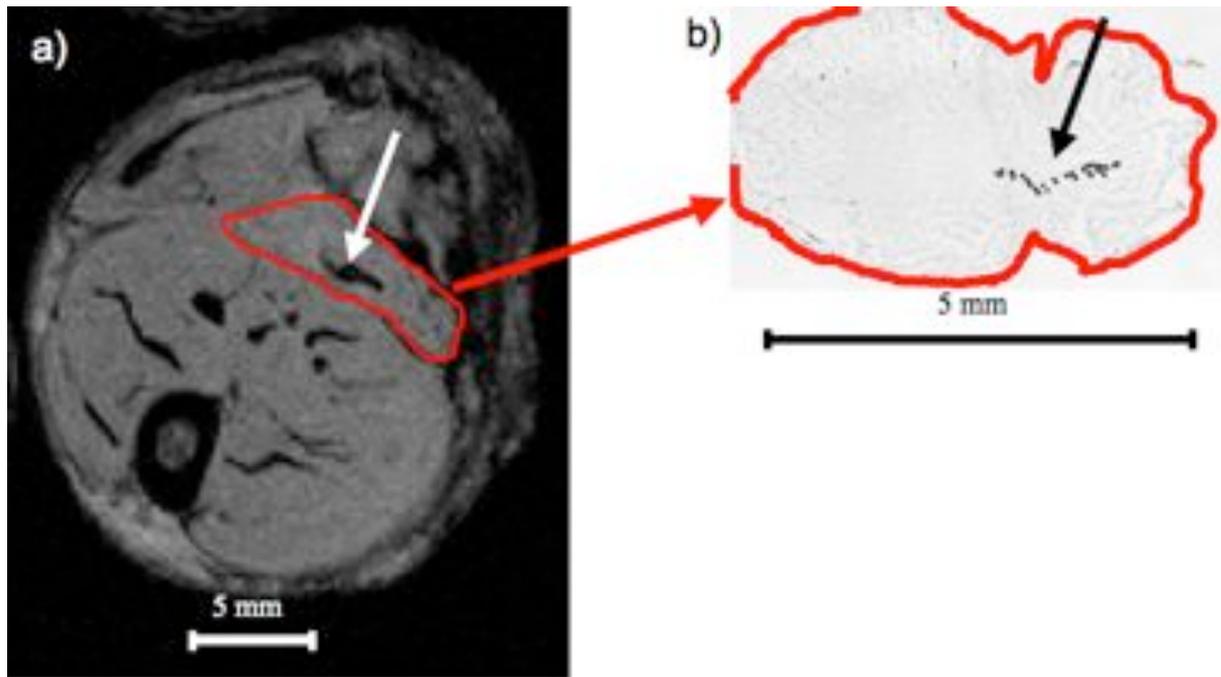


Abbildung 21: *a)* Axiales MRT Bild eines Unterschenkels einer mit VSOP markierten Zellen transplantierten Ratte (FLASH 2D Scan), die Hypointensität (weißer Pfeil) innerhalb des M. soleus (rot) entspricht VSOP markierten Zellen. Die Hypointensität findet in dem Berliner Blau gefärbten Kryo-Schnitt (*b)*) das entsprechende Korrelat (schwarzer Pfeil). (Abbildung siehe auch Dissertation Philipp von Roth [87])

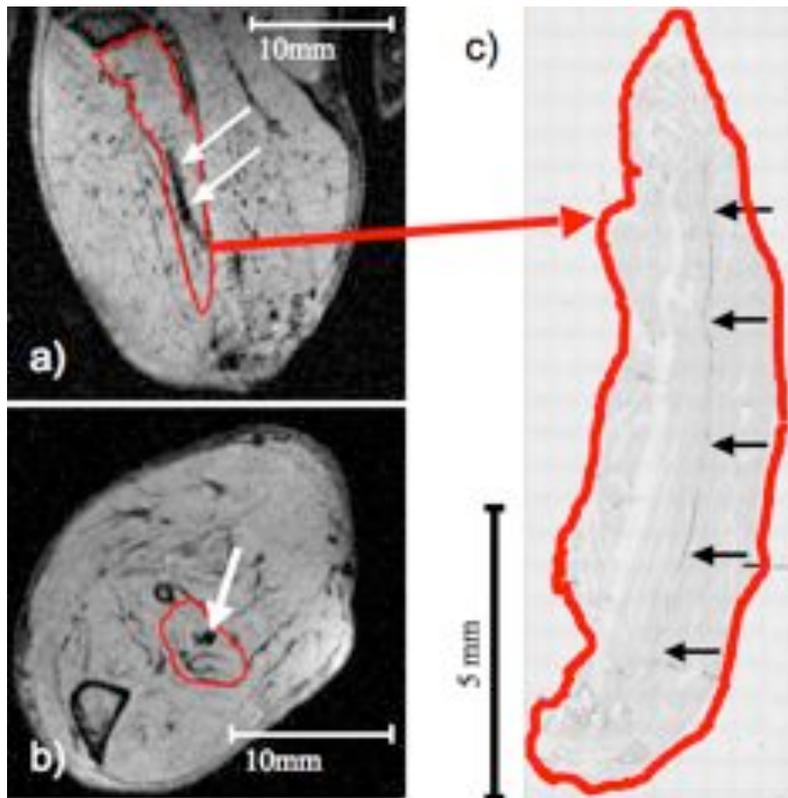


Abbildung 22: MRT Schnitte a) sagittal, b) axial, (Flash2D) des linken Unterschenkels einer Ratte, bei der die Zellen fälschlicherweise in den M. peroneus (rot markiert) transplantiert wurden. Der Berliner Blau gefärbte Längsschnitt des M. peroneus (c) illustriert die longitudinale Verteilung der transplantierten Zellen im Interstitium des Muskels sowie die Korrelation der Lokalisation im MRT und im histologischen Präparat. (Abbildung siehe auch Dissertation Philipp von Roth [87])

3.2.2 Einfluss der MSC auf die Fibrose

Die Untersuchung der Tiere in Bezug auf die Fibrose im Vergleich der mittels MSC versus NaCl behandelten Tiere erfolgte vier Wochen nach dem Trauma, also zu einem Zeitpunkt, an dem gemäß des oben charakterisierten Verlaufes bereits ein stabiles Fibroseareal besteht.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen die mittels MSC behandelten Tiere $21,9 \pm 7\%$ Fibroseareal, die mittels NaCl behandelten Kontrolltiere $23,9 \pm 8\%$ Fibrose auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie und Kontrollgruppe fand sich somit nicht.

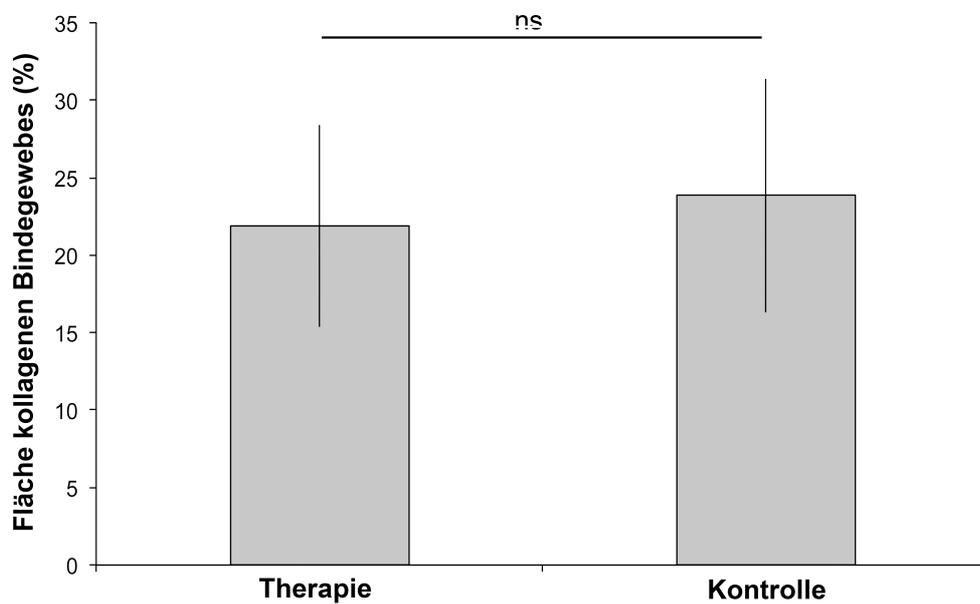


Abbildung 23: Verhältnis der Fibroseareale zwischen Therapie- und Kontrollgruppe in %.

3.2.3 Einfluss der MSC auf die Angiogenese

Analog zur Traumacharakterisierungsgruppe wurden auch hier die Gefäße in klein und groß anhand der 40 µm Grenze eingeteilt. Die mit MSC behandelten Tiere wiesen im Durchschnitt 127 ± 56 kleine und 48 ± 31 große Gefäße pro Schnitt auf. Die Kontrollgruppe zeigte 146 ± 53 kleine und 37 ± 15 große Gefäße im Mittelwert. Ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe konnte nicht ausgemacht werden.

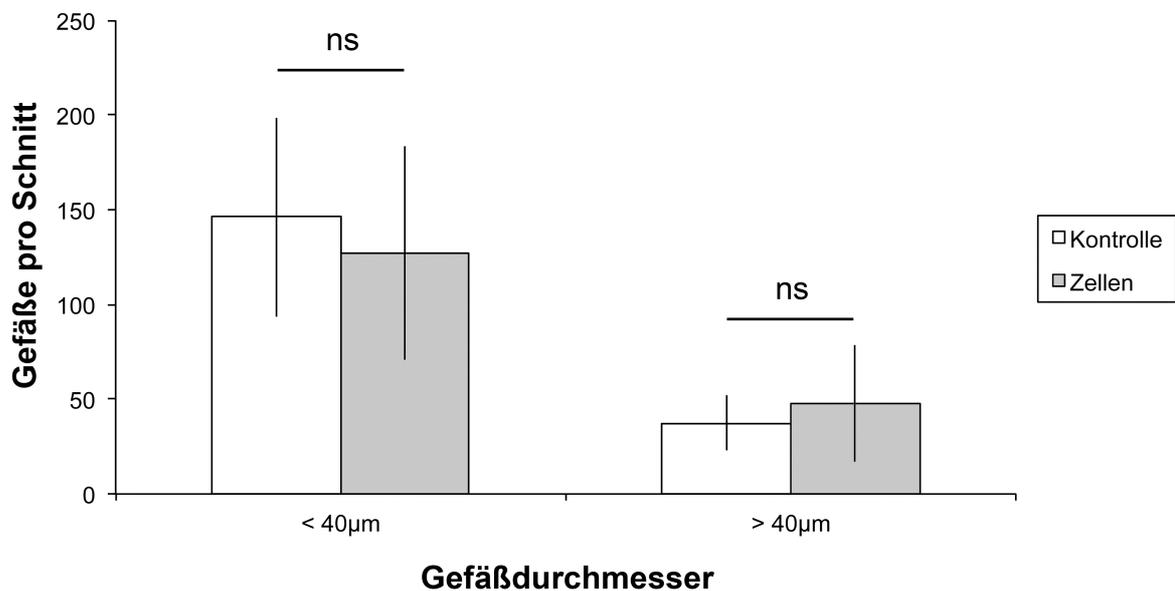


Abbildung 24: Absolute Anzahl der kleinen und großen Gefäße in Therapie- und Kontrollgruppe.

4 DISKUSSION

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein selektives Skelettmuskeltrauma standardisiert unter histologischen Gesichtspunkten, ergänzend zu den biomechanischen Aspekten im zeitlichen Verlauf charakterisiert werden, wobei eine genaue Analyse der bindegewebig-narbigen Areale sowie der Gefäßneueinsprossung erfolgte.

Die Hypothese, dass die Lokalisation mit Eisenoxidnanopartikeln markierter MSC in der MRT mit den histologischen Daten korreliert, konnte bestätigt werden.

Die Hypothese, dass die verbesserte funktionelle Regeneration drei Wochen nach lokaler Transplantation von 1×10^6 MSC in den Musculus soleus auf eine Steigerung der Angiogenese oder eine Reduktion der Fibrose zurückzuführen ist, musste verworfen werden.

4.1 Traumacharakterisierung

In dieser Arbeit handelt es sich um die histologische Analyse eines selektiven Quetschtraumas des Musculus soleus unter Aussparung der zentralen Gefäß- und Nervenversorgung. Die bisherigen in der Literatur beschriebenen Traumata lassen sich in segmentale Traumata [12] oder komplette Traumata [82,88] einteilen, wobei entweder immer nur ein Abschnitt des Muskels oder aber die komplette Einheit inklusive der myoneuralen Verbindung zerstört wurde, welches insgesamt als nachteilig für die Regeneration zu werten ist. Das hier verwendete Trauma versucht dem zu entgehen, in dem es das komplette Muskelareal distal und proximal der ausgesparten Area nervovascularia mit einbezieht und somit eine Grundlage zur Forschung an der Skelettmuskulatur mit Erhalt der myoneuralen Versorgung bietet.

Im Vergleich mit der täglichen Klinik entspricht dies natürlich nicht der gesamten Vielfalt der komplexen Traumata und wird nicht immer so selektiv auftreten, allerdings ist anhand dieser Basis eine genaue Betrachtung der Einflüsse eines Traumas auf die Muskulatur, welcher die Regenerationsmöglichkeit durch erhaltene Innervation gegeben ist, möglich.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Traumamodell liegen zwei Verletzungstypen parallel vor, der „In-situ-Nekrose-Typ“ und der „Abscherungs-/Zerreißungs-Typ“. Beim „Abscherungs-/Zerreißungs-Typ“ kommt es zur Zerreißung der Muskelfaser, wobei von den geteilten/zerrissenen Anteilen der Muskelfasern jeweils die Regeneration ausgeht. Diese Form der Regeneration wurde bereits frühzeitig durch Schmalbruch et.al. im segmentalen Quetschtrauma des Musculus soleus in der Literatur beschrieben [12].

Äärimaa et. al. untersuchten die Muskelregeneration nach selektivem Trauma. Hierbei durchtrennten sie den Musculus soleus und versorgten den Schnitt unmittelbar operativ mittels

Adaptation der Muskelstümpfe und Naht des Epimysium. Darauf folgte eine Ruhigstellung der Extremität für 7 Tage. Im Endergebnis zeigte sich hierbei eine deutliche Reduktion des Narbengewebes und darüber ein verbessertes Erlangen der muskulären Funktion [89]. In den Studien über segmentale Quetschungen oder selektive Muskeldurchtrennungen kommt es lediglich zu kleinen segmentalen Fibrosearealen. Über die Ausbildung neuer myotendinöser Verbindungen mit dem umschriebenen dichten Bindegewebe kommt es hierbei meist zu einer kompletten Wiedererlangung der Funktion solange die Verbindung zur nervalen Innervation nicht durchtrennt ist [8,60,90].

Im hier angewandten kompletten Quetschtrauma dominiert jedoch die Ausbildung fibrotischen Gewebes den gesamten Regenerationsprozess. In der biomechanischen Auswertung fehlen dem traumatisierten Muskel die Hälfte (tetanisch) und ein Drittel (fast twitch) der Kraft gegenüber der gesunden Seite, bezogen auf einen Untersuchungszeitpunkt acht Wochen nach dem Trauma.

Im Gegensatz zum selektiven Trauma, indem es zu umschriebenen, kleinen Fibrosearealen kommt, herrscht hier ein diffuses interstitielles Bindegewebe vor, welches die mechanische Eigenschaft des Muskels verändert. Im Reifungsprozess der Fibrose vollzieht das Bindegewebe einen Wandel von lockerem zu straffem Bindegewebe, womit die Steifigkeit des Muskelgewebes verändert, in diesem Falle erhöht, wird.

Zusätzlich zu den durch das Trauma herabgesetzten kontraktile Fähigkeiten kommt nun die Veränderung der mechanischen Eigenschaft des traumatisierten Muskelgewebes, die zunehmende Steifigkeit des Fibroseareals, erschwerend hinzu. Obwohl in dem vorliegenden Traumamodell neue myotendinöse Verbindungen dargestellt werden konnten, kommt es zu einer fehlenden Erlangung der Ausgangskraft. Hierbei scheint die Ausdehnung des fibrotischen Areal maßgebend zu sein [91].

Chan et.al. konnten 2003 nachweisen, dass die Bildung der posttraumatischen Fibrose effektiv durch die Anwendung von Suramin reduziert werden kann. Hierbei wurde im Mausmodell die lokale Anwendung von Suramin untersucht. Den Mäusen wurde ein segmentales Trauma des Musculus gastrocnemius zugefügt und nachfolgend zu verschiedenen Zeitpunkten Suramin in verschiedenen Konzentration injiziert. Suramin bindet sich dabei kompetitiv an den Rezeptor des TGF- β . Als Antwort auf ein Trauma kommt es zu einer Überproduktion vom transforming growth-factor beta mit folglich Aktivierung der Fibroblasten und somit zur Ausbildung von Bindegewebe. Über die kompetitive Bindung von Suramin an den Rezeptor des TGF- β wird die Aktivierung von Fibroblasten verhindert und somit das Ausmaß der Fibrose maßgeblich reduziert [66].

Foster et. al. wiesen ebenfalls über die Inhibierung von TGF- β mittels Decorin und γ -Interferon eine deutliche Reduktion der Fibrose nach [67]. Die über die Anwendung antifibrotischer Substanzen gewonnene Reduktion der Fibrose und die damit verbesserte muskuläre Regeneration zeigen sich signifikant, womit den antifibrotischen Substanzen in zukünftigen Studien Rechnung getragen werden sollte.

Die Analyse der Angiogenese zeigte im Seitenvergleich eine deutliche höhere Anzahl von sowohl kleinen als auch großen Gefäßen im traumatisierten Muskel gegenüber der gesunden Gegenseite, wobei der Höhepunkt der Angiogenese innerhalb der ersten Woche lag, was mit dem in der Literatur beschriebenen Traumaverlauf übereinstimmt [16,92].

Im langfristigen Verlauf sank insgesamt die Anzahl der großen und kleinen Gefäße. Hierbei sank zuerst die Anzahl der großen Gefäße nach vier Wochen, die Anzahl der kleinen Gefäße sank nach acht Wochen. Der zeitliche Verlauf lässt hierbei auf eine sehr lange Remodellingphase der Gefäßneubildung schließen.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ein Trauma zur vermehrten Aktivierung von endothelialen Vorläuferzellen führt, worüber eine vermehrte Angiogenese im traumatisierten Areal initiiert wird [29]. Die Beschreibungen lassen sich sehr gut mit den hier gemachten Ergebnissen korrelieren. Studien über den langfristigen Verlauf der Angiogenese nach einem schweren muskulären Quetschtrauma sind derzeit jedoch in der Literatur noch nicht vorhanden.

Abschließend lässt sich zur Angiogenese im achtwöchigen posttraumatischen Verlauf sagen, dass es anfänglich zu einem deutlich erhöhten Gefäßaufkommen sowohl kleiner als auch großer Gefäße kommt, die Anzahl im Verlauf jedoch kontinuierlich abnimmt und sich den Zahlen der gesunden Gegenseite annähert, was insgesamt als sehr lange Remodellingzeit der Gefäßneubildung interpretiert werden muss.

Abschließend stellt sich die Frage der Reinnervation der von der zentralen Innervation getrennten und zerstörten/sich regenerierenden Muskelfasern. In der Literatur wurde über unterschiedliche Muskeltraumata die Folge der Denervation dargestellt [93]. Einerseits erfolgte die totale Denervation im Rattenmodell durch Durchtrennung des Nervus ischiadicus [94], andererseits erfolgte eine indirekte Denervation mittels lokaler Applikation des Schlangengiftes Notexin in den Musculus soleus [95]. In allen Fällen zog die Denervation eine ausgeprägte Degeneration des Muskels mit folglich Atrophie nach sich.

Rantanen et. al. konnte 1995 erstmals die Neubildung von myoneuralen Verbindungen nachweisen. In diesem Versuch wurde der Musculus extensor digitorum der Ratte durchtrennt

und der Heilungsverlauf 56 Tage lang beobachtet. Hierbei entdeckte man nach circa 10-15 Tagen an den denervierten Muskelfaserstümpfen irreguläre Acetylcholinesterase- und alpha-Bungarotoxin-positive Anhäufungen als erstes Zeichen der beginnenden Reinnervation. Im Verlauf bildeten sich daraus neue myoneurale Verbindungen. Zusätzlich konnten aussprossende, durch das Bindegewebe dringende Axone entdeckt werden. Insgesamt wurde in dieser Studie der Beweis aufgestellt, dass denervierte, zerrissene Muskelfasern zur eigenständigen Reinnervation in der Lage sind [96].

In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte mittels α -Bungarotoxin-Markierungen die Neubildung myoneuraler Verbindungen und die Ausbildung von Endplatten an den regenerierenden Muskelfasern ebenfalls nachgewiesen werden [91].

Zusammenfassend imponiert die Fibrose als größter limitierender Faktor im Regenerationsprozess. Um einer Wiederherstellung der Muskelfunktion nach ausgedehntem Trauma in Zukunft näherzukommen, bedarf es weiterer Studien zur Untersuchung der Reduktionsmöglichkeiten der posttraumatischen Fibrose.

Das in dieser Arbeit komplett histologisch charakterisierte, standardisierte Trauma bietet hierbei eine fundierte Grundlage für die weitere muskuläre Traumaforschung.

4.2 Korrelation der mikro- und makroskopisch visualisierten MSC

Zur Korrelation zwischen Mikro- und Makroskopie wurden in dieser Arbeit die Berliner Blau Reaktion sowie die Hoechst-Kernmarkierung angewandt. Die mittels VSOP markierten MSC konnten makroskopisch mittels MRT visualisiert werden. Die transplantierten Zellen zeigten sich hierbei poolartig angeordnet. Eine Korrelation zwischen der Anzahl der transplantierten Zellen und des Zellpoolvolumens fand sich jedoch nicht [87]. Es wird dabei davon ausgegangen, dass nicht alle transplantierten Zellen überlebt haben und von Makrophagen abgeräumt wurden. Zusätzlich fand sich im dreiwöchigen Verlauf eine Reduktion des Zellpoolvolumens von circa 44%. Hierbei sind Verdünnungseffekte durch Fusion der MSC mit Muskelfasern oder ein Absterben der transplantierten Zellen mit Abräumung mit folglich fehlender Detektierbarkeit im MRT denkbar [87].

Die makroskopisch visualisierten, VSOP markierten MSC ließen sich mikroskopisch durch den intrazellulären Eisengehalt mittels der Berliner Blau Reaktion eindeutig nachweisen. Die Negativkontrolle, sowie die Validierung durch die Doppelmarkierung mit Hoechst bestätigten den Nachweis.

Die mit Eisenpartikeln beladenen Zellen zeigten sich in allen Präparaten ebenfalls poolartig angeordnet. Eine Fehltransplantation der Zellen in den vom Trauma nicht affektierten Musculus peroneus zeigte eine längliche Aufreihung der markierten Zellen entlang des Muskels, eine Ausbreitung der Zellen in der Transversalebene wurde hierbei nicht beobachtet. Insgesamt verblieben die Zellen in ihrem Pool und dessen naher Umgebung.

Abwanderungsereignisse ins gesunde Gewebe konnten auf Grund des Versuchsaufbaus nicht beobachtet werden, sind aber prinzipiell denkbar.

Es fanden sich zudem selten markierte Zellen in distalen Muskelbereichen. Eine Abwanderung über die Blutbahn in andere Gewebe gilt es jedoch generell in Betracht zu ziehen. Um eine mögliche Abwanderung der lokal transplantierten MSC zu verfolgen, bedarf es weiterer Studien.

In der Literatur wurde bewiesen, dass transplantierte MSC durch ihre Umgebung stark beeinflusst werden und sich ihre Entwicklung an den Anforderungen des jeweiligen Gewebes orientiert, insbesondere erfolgt hierbei die Beeinflussung durch die extrazelluläre Matrix, Zytokine, Wachstumsfaktoren und die eigentlichen physikalischen Bedingungen [97]. Zusätzlich wurde das Einwandern von MSC aus anderen Geweben in das traumatisierte Areal beschrieben [26-31,98,99].

Invers wurde durch Stout et. al. nachgewiesen, dass es ebenfalls eine Abwanderung muskulärer Stammzellen ins periphere Blut nach entsprechend schwerem Trauma gibt. Hierbei wurde im Schweinmodell eine Splen- und Pankreatektomie durchgeführt. Es wurde der Gehalt an blastomere-like stem cells im Skelettmuskel und im peripheren Blut gemessen. Gegenüber der gesunden Gruppe wies die traumatisierte Gruppe eine signifikante Erhöhung der Zellen im peripheren Blut, mit entsprechender Erniedrigung ihrer Anzahl im Skelettmuskel, nach [35].

Der positive Effekt von lokal oder auch systemisch eingebrachten MSC ist in der Literatur mannigfaltig belegt. Im Rattenmodell wurde durch die Legierung von Koronararterien eine Ischämie des Myokards hervorgerufen. Darauf folgend wurden MSC lokal in das ischämische Gewebe injiziert oder über eine Trägermatrix eingebracht. Beide Versionen führten über eine vermehrte Angio- und Myogenese sowie eine Verminderung der Steifigkeit des Narbengewebes zu einem verbesserten Remodelling [77-79,100].

Irintchev et. al. wiesen 1997 erstmals durch die Implantation von Myoblasten in einen durch Kälte geschädigten Muskel im Rattenmodell einen Kraftzuwachs nach [80], später bestätigten Matziolis et. al. den Kraftzuwachs durch lokal transplantierte MSC im Musculus soleus der Ratte [81].

Des Weiteren wurde in der Literatur von einer Migration intravenös applizierter MSC in ischämisches Hirngewebe im Rattenmodell berichtet, wobei das monocyte chemoattractant protein-1 eine wesentliche Rolle zu spielen scheint [101].

Die einzeln nachgewiesenen Fusionsereignisse bestätigen die Beteiligung der Stammzellen an der muskulären Regeneration wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [18,76]. Der durch Matziolis et. al. nachgewiesene Kraftzuwachs des Musculus soleus nach lokaler autologer MSC Transplantation von 14% tetanisch und 13% fast twitch gegenüber der Kontrollgruppe kann nicht alleine durch die einzelnen in dieser Arbeit beobachteten Fusionsereignisse bedingt sein [81]. Für diese Behauptung fanden sich insgesamt zu wenige Fusionsereignisse. Der überwiegende Teil der markierten MSC fand sich im Interstitium, nur wenige markierte MSC zeigten sich in Fusion mit regenerierenden Myotuben begriffen. Hierbei zeigten sich von Eisenoxidnanopartikeln umgebene aktive Zellkerne unter dem Sarkolemm, sowie bereits in die regenerierende Myotuben integrierte Zellkerne deren Eisenoxidnanopartikel sich überwiegend schon verteilt hatten. Oft zeigten sich Akkumulationen von markierten MSC intramuskulär entlang von Gefäßen.

2008 konnten Chen et. al. die Freisetzung multipler Zytokine und Chemokine durch Stammzellen in traumatisiertem Gewebe nachweisen. Hierbei konnten überwiegend Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF, TGF- β 1 oder der vascular-endothelial growth-factor alpha nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgte jedoch auch der Nachweis von EPO und dem chemoattracting protein MIP-1a und MIP-1b (macrophage inflammatory protein) [102,103].

Da die einzelnen Fusionsereignisse als Ursache für den deutlichen Kraftzuwachs als unwahrscheinlich erscheinen, ist es wahrscheinlich, dass die oben erwähnten parakrinen Effekte der MSC eine große Rolle spielen. Die auffällige Lage der markierten MSC in der Nähe von Gefäßen mag darin bedingt sein.

Abschließend bleibt zusammen zu fassen, dass es eine Korrelation zwischen den makro- und mikroskopisch visualisierten markierten MSC gibt und der Kraftzuwachs der MSC transplantierten Muskeln nicht alleine durch einzelne Fusionsereignisse bedingt sein kann. Die wahrscheinlich maßgebende Beteiligung parakriner Effekte der MSC sollte daher Bestandteil weitergehender Studien sein.

4.3 Einfluss der MSC auf die Ausbildung der Fibrose

Die hier erhobenen histomorphometrischen Ergebnisse der Auswertung der Fibroseareale ergab keinen signifikanten Unterschied. In der Gruppe der transplantierten Tiere fanden sich $21,9 \pm 7\%$ Bindegewebe im Muskel, in den mit NaCl behandelten Kontrolltieren $23,9 \pm 8\%$.

Die Messung erfolgte hierbei vier Wochen nach dem Trauma. Der ermittelte Wert der Fibrose ist kongruent mit dem dargestellten nativen Traumamodell. Die Vermutung, dass die MSC einen positiven Einfluss auf die Fibrose im Sinne einer Reduktion, zum Beispiel über die Aktivierung/Sezernierung von Metalloproteinasen (MMP), haben, konnte nicht bestätigt werden [104]. Dennoch ist eine Beeinträchtigung der Fibrose durch die transplantierten MSC denkbar im Sinne einer Beeinflussung der Art des Bindegewebes und der damit verbundenen Steifigkeit. Discher et. al. konnten 2007 eine Abnahme der Fibrose nach MSC-Transplantation im Infarktareal im Herzmodell nachweisen [77].

Ein möglicher Unterschied mag in der Beschaffenheit der unterschiedlichen Muskelgewebe liegen. Weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses transplantierte Stammzellen auf die Fibrose erscheinen sinnvoll, jedoch ist der Haupteinfluss der transplantierten MSC nicht in der Verminderung des Narbengewebes zu suchen.

4.4 Einfluss der MSC auf die Angiogenese

Die histomorphometrischen Daten der Gefäßauszählung bezüglich kleiner und großer Gefäße ergab im Vergleich der mit MSC behandelten Tiere und der Kontrolltiere keinen signifikanten Unterschied. Die hier analog des Verletzungsmusters Ischämie versus Quetschung in der Literatur beschriebene Zunahme der Angiogenese durch die Transplantation von MSC [77,78] nach Myokardinfarkt im Herzmodell konnte im Skelettmuskel nicht nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Applikationswege in den Versuchen scheinen bezüglich der Ursachenfindung nicht relevant zu sein. Discher et. al. applizierten die MSC lokal direkt in das ischämische Myokard [77]. Nagaya et. al. hingegen applizierten die Stammzellen systemisch über eine intravenöse Injektion [78].

Auch hier scheint der Unterschied bezüglich der Regeneration in der Verschiedenheit der beiden Muskelgewebe zu liegen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die lokal transplantierten markierten MSC weder die Fibrose signifikant reduzieren, noch die Angiogenese signifikant forcieren.

Insgesamt steht jedoch fest, dass MSC ein hohes Differenzierungspotential haben. Die vereinzelt beobachteten Fusionsereignisse reichen dennoch nicht für den signifikanten Kraftzuwachs nach

Transplantation aus. Die untersuchten Muskeln wiesen lediglich regenerierende Muskelfasern, inflammatorische Zellen, die transplantierten markierten MSC und unterschiedliche Arten von Bindegewebe sowie Gefäße auf. Ein möglicher Ansatz in der Ursachenforschung des MSC bedingten Kraftzuwachses traumatisierter Muskulatur, könnte im Übergang auf die molekulare Ebene liegen.

Es ist nachgewiesen, dass durch die MSC sezernierte Zytokine die eigene Zellproliferation steigern [105,106] und Zytokine wie IGF-2 einen positiven Einfluss auf das Überleben sowie die Differenzierung von Myoblasten haben [107,108]. Zusätzlich ist ein positiver Effekt der von MSC produzierten Zytokine wie HGF, IGF oder auch FGF auf die Regeneration bewiesen [105,106,109,110].

Inwieweit sich die durch die MSC freigesetzten Zytokine mit den durch die inflammatorischen Zellen freigesetzten Zytokinen in ihrer Wirkung potenzieren oder beeinflussen, ist derzeit unerforscht.

Weitere Forschung nach der Ursache des positiven Effektes lokal transplantiertes MSC auf die Muskelregeneration sollte unter anderem dem hier postulierten parakrinen Mechanismus der Zellen nachgehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Drenckhahn D. Benninghoff Anatomie, 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg1994:167-186.
- [2] Junqueira LC, Carneiro J. Histologie, 6. Auflage, Springer2004:146-162.
- [3] Wernig A. Regeneration capacity of skeletal muscle. *Ther Umsch*2003 Jul;60(7):383-9.
- [4] Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol*2004; 12[3-4]:311-9.
- [5] Chen JCJ, Goldhamer DJ. Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*2003;1:101.
- [6] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*1961;9(2):493-&.
- [7] Jarvinen T, Jarvinen TLN, Kaariainen M, Kalimo A, Jarvinen M. Muscle injuries - Biology and treatment. *American Journal of Sports Medicine*. [Review]. 2005 May;33(5):745-64.
- [8] Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. [Article]. 1992 Feb;24(2):197-205.
- [9] Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *Journal of Cell Biology*. [Article]. 2003 Dec;163(5):1133-43.
- [10] Coleman ME, Demayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. Myogenic vector expression of insulin-like growth-factor-I stimulates muscle-cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*1995;270(20):12109-16.
- [11] Doumit ME, Cook DR, Merkel RA. 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. *Journal of Cellular Physiology*1993;157(2):326-32.
- [12] Schmalbruch H. Skeletal muscle regeneration *Tissue & Cell*1976;8(4):673-92.
- [13] Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*2004;84(1):209-38.
- [14] Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Developmental Biology*2000;218(2):115-24.
- [15] Srikuea R, Pholpramool C, Kitiyanant Y, Yimlamai T. Satellite cell activity in muscle

- regeneration after contusion in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010 Nov;37(11):1078-86.
- [16] Jarvinen M, Aho AJ, Lehto M, Toivonen H. Age-dependent repair of muscle rupture-a histological and microangiographical study in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1983;54(1):64-74.
- [17] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*. [Review]. 2001 Aug;91(2):534-51.
- [18] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279(5356):1528-30.
- [19] Tanaka S, Miyata T, Fujita T, Kawahara E, Tachino K, Funakoshi H, Nakamura T. Differing Responses of Satellite Cell Activity to Exercise Training in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Physical Therapy Science* 2009 May;21(2):141-5.
- [20] Darr KC, Schultz E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal-muscle. *Journal of Applied Physiology*. [Article]. 1987 Nov;63(5):1816-21.
- [21] Mackey AL, Kjaer M, Dandanell S, Mikkelsen KH, Holm L, Dossing S, Kadi F, Koskinen SO, Jensen CH, Schroder HD, Langberg H. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *Journal of Applied Physiology* 2007;103(2):425-31.
- [22] Stratos I, Graff J, Rotter R, Mittlmeier T, Vollmar B. Open Blunt Crush Injury of Different Severity Determines Nature and Extent of Local Tissue Regeneration and Repair. *Journal of Orthopaedic Research* 2010 Jul;28(7):950-7.
- [23] Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, DiMaio JM, Gallardo TD, Garry DJ. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells*. [Article]. 2004;22(7):1305-20.
- [24] Cao BH, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Cell Cycle*. [Article]. 2004 Feb;3(2):104-7.
- [25] Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2003;13(3):123-8.
- [26] Fong ELS, Chan CK, Goodman SB. Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials*. [Review]. 2011 Jan;32(2):395-409.
- [27] Palermo AT, LaBarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: A physiological response to stress. *Developmental Biology* 2005;279(2):336-44.
- [28] Pennisi E. Muscle disease - Bone marrow cells may provide muscle power.

- Science1998;279(5356):1456-.
- [29] Laing AJ, Dillon JP, Condon ET, Street JT, Wang JH, McGuinness AJ, Redmond HP. Mobilization of endothelial precursor cells: Systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *Journal of Orthopaedic Research*2007;25(1):44-50.
- [30] Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology*2001;153(5):1133-9.
- [31] Brazelton TR, Nystrom M, Blau HM. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Developmental Biology*2003;262(1):64-74.
- [32] Ferrari G, Stornaiuolo A, Sartori S, Cusella-De Angelis G, Cossu G, Mavilio F. Bone marrow transplantation as source of myogenic progenitors: Differentiation of stem cells into muscle. *Cell Transplantation* 1999;8:195.
- [33] Usas A, Huard J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. [Article]. 2007 Dec;28(36):5401-6.
- [34] Wu XY, Wang SL, Chen BL, An XL. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell and Tissue Research*. [Review]. 2010 Jun;340(3):549-67.
- [35] Stout CL, Ashley DW, Morgan JH, Long GF, Collins JA, Limmios JI, Lochner F, McCommon G, Hixson D, Black AC, Young HE. Primitive stem cells residing in the skeletal muscle of adult pigs are mobilized into the peripheral blood after trauma. *American Surgeon*2007;73(11):1106-10.
- [36] Huard J, Li Y, Fu FH. Current concepts review - Muscle injuries and repair: Current trends in research. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*2002;84A(5):822-32.
- [37] Kieb M, Lorbach O, Engelhardt M. Muscle injuries: diagnostics and treatments. *Orthopade*2010;39(12):1098-107.
- [38] Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Current Opinion in Rheumatology*. [Review]. 2000 Mar;12(2):155-61.
- [39] Engelhardt M. Sportverletzungen. Diagnose, Management und Begleitmaßnahmen, Urban und Fischer, München,2006. ISBN: 978-3437240904
- [40] Armfield DR, Kim DHM, Towers JD, Bradley JP, Robertson DD. Sports-related muscle injury in the lower extremity. *Clinics in Sports Medicine*. [Review]. 2006 Oct;25(4):803-+.
- [41] Tara, Imaging of Arthritis and metabolic bone disease, chapter 12

- [42] Mabee JR. Compartment syndrome: A complication of acute extremity trauma. *Journal of Emergency Medicine*1994;12(5):651-6.
- [43] Heemskerk AM, Strijkers GJ, Drost MR, van Bochove GS, Nicolay K. Skeletal muscle degeneration and regeneration after femoral artery ligation in mice: Monitoring with diffusion MR imaging. *Radiology*. [Article]. 2007 May;243(2):413-21.
- [44] Racz IB, Illyes G, Sarkadi L, Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *European Surgical Research*1997;29(4):254-63.
- [45] Berchtold R, Bruch H-P, Trentz O. *Chirurgie*, 5. Auflage, Urban und Fischer, München,2005; ISBN: 978-3437419218.
- [46] Ghaly A, Marsh DR. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *International Journal of Experimental Pathology*2010;91(3):244-55.
- [47] Defraigne JO, Pincemail J. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. *Physiopathology and prevention. Acta Chirurgica Belgica*1998;98(4):176-86.
- [48] Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle - A biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *Journal of Orthopaedic Research*2004;22(6):1336-44.
- [49] Garrett WE, Seaber AV, Boswick J, Urbaniak JR, Goldner JL. Recovery of skeletal-muscle after laceration and repair. *Journal of Hand Surgery-American Volume*1984;9A(5):683-92.
- [50] Dymont PG. Management of minor soft-tissue trauma in adolescent athletes. *Journal of Adolescent Health*1986;7(6):S133-S5.
- [51] Jarvinen TAH, Jarvinen TLN, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology*2007;21(2):317-31.
- [52] Webber A. Acute soft-tissue injuries in the young athlete. *Clinics in Sports Medicine*1988;7(3):611-24.
- [53] Lamb SE, Marsh JL, Hutton JL, Nakash R, Cooke MW, Grp C. Mechanical supports for acute, severe ankle sprain: a pragmatic, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. [Article]. 2009 Feb;373(9663):575-81.
- [54] Burgess TL, Lambert MI. The efficacy of cryotherapy on recovery following exercise-induced muscle damage. *International Sportmed Journal*2010;11(2):258-77.
- [55] Schaser KD, Disch AC, Stover JF, Lauffer A, Bail HJ, Mittlmeier T. Prolonged

- superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *American Journal of Sports Medicine*2007;35(1):93-102.
- [56] Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *Journal of Applied Physiology* 2011;110:382-8.
- [57] Thorsson O, Hemdal B, Lilja B, Westlin N. The effect of external-pressure on intramuscular blood-flow at rest and after running. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. [Article]. 1987 Oct;19(5):469-73.
- [58] Mehallo CJ, Drezner JA, Bytowski JR. Practical management: Nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) use in athletic injuries. *Clinical Journal of Sport Medicine*2006;16(2):170-4.
- [59] Chien SH, Chen SK, Lin SY, Chen SS, Wu HS. Repair method and healing of skeletal muscle injury. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*1991;7(9):481-8.
- [60] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration - A morphological and functional study in a mouse model. *American Journal of Sports Medicine*1999;27(2):222-9.
- [61] Best TM, Loitz-Ramage B, Corr DT, Vanderby R. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries - Results in an animal model. *American Journal of Sports Medicine*1998;26(3):367-72.
- [62] Mutschler W, Muth CM. Hyperbaric oxygen therapy in accident surgery. *Unfallchirurg*2001;104(2):102-14.
- [63] Garcia-Covarrubias L, McSwain NE, van Meter K, Bell RM. Adjuvant hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injury and traumatic ischemia: An evidence-based approach. *American Surgeon*2005;71(2):144-51.
- [64] Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle. *American Journal of Sports Medicine*1999;27(1):54-9.
- [65] Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International Journal of Sports Medicine*. [Article]. 2004 Jan;25(1):73-7.
- [66] Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *Journal of Applied Physiology*;95(2):771-80.

- [67] Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *Journal of Orthopaedic Research*2003;21(5):798-804.
- [68] Jarvinen TAH, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Article]. 2010 Dec;107(50):21671-6.
- [69] Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal-muscle satellite cell-proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth-factor. *Journal of Cellular Physiology*1989;138(2):311-5.
- [70] Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *Journal of Applied Physiology*2007 Nov;103(5):1857-63.
- [71] Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: Animal experiments using a muscle contusion model. *International Journal of Sports Medicine*2004;25(8):582-7.
- [72] Zdanowicz MM, Moyses J, Wingertzahn MA, Oconnor M, Teichberg S, Slonim AE. Effect of insulin-like growth-factor-I in murine muscular-dystrophy. *Endocrinology*1995;136(11):4880-6.
- [73] Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin Improves Functional and Histological Recovery of Traumatized Skeletal Muscle Tissue. *Journal of Orthopaedic Research*2008;26(12):1618-26.
- [74] Young HE, Black AC. Adult stem cells. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*. [Review]. 2004 Jan;276A(1):75-102.
- [75] Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*2006;44(4):215-30.
- [76] Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoyer H, Elbe-Burger A, Wachtler F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and Embryology*1999;199(5):391-6.
- [77] Discher DE, Engler AJ. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Proceedings of the ASME Summer Bioengineering Conference 2007*2007:249-50.
- [78] Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H,

- Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*2004;287(6):H2670-H6.
- [79] Pozzobon M, Bollini S, Iop L, De Gaspari P, Chiavegato A, Rossi CA, Giuliani S, Leon FF, Elvassore N, Sartore S, De Coppi P. Human Bone Marrow-Derived CD133(+) Cells Delivered to a Collagen Patch on Cryoinjured Rat Heart Promote Angiogenesis and Arteriogenesis. *Cell Transplantation*2010;19(10):1247-60.
- [80] Irintchev A, Langer M, Zweyer M, Theisen R, Wernig A. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *Journal of Physiology-London*1997;500(3).
- [81] Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Engineering*. [Article]. 2006 Feb;12(2):361-7.
- [82] Fink E, Fortin D, Serrurier B, Ventura-Clapier R, Bigard AX. Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(7):421-9.
- [83] Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anatomical Record*2001;263(2):139-54.
- [84] Koishi K, Zhang M, McLennan IS, Harris AJ. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn*. 1995 Mar;202(3):244-54.
- [85] Pereira BP, Tan JA, Zheng L, Tan BL, Lahiri A, Lim AY, et al. The cut intramuscular nerve affects the recovery in the lacerated skeletal muscle. *J Orthop Res*. 2006 Jan;24(1):102-11.
- [86] Winkler T, Von Roth P, Schumann MR, Sieland K, Stoltenburg-Didinger G, Taupitz M, Perka C, Duda GN, Matziolis G. In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats. *Tissue Engineering Part A*2008;14(7):1149-60.
- [87] Von Roth P, In vivo Visualisierung mesenchymaler Stammzellen nach lokaler Transplantation im schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte, Dissertation, 2009.
- [88] Bassaglia Y, Gautron J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*1995;16(4):420-9.

- [89] Aarimaa V, Kaariainen M, Vaittinen S, Tanner J, Jarvinen T, Best T, Kalimo H. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscular Disorders*2004;14(7):421-8.
- [90] Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res.* 1998 Mar;16(2):197-206.
- [91] Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda, GN, Tohtz SV. (2011): Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma., *Acta Ortop.*; 2011 Feb; 82(1):102-11
- [92] Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated-muscle.4.Effect of early mobilization and immobilization on tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chirurgica Scandinavica*1976;142(1):47-56.
- [93] Ehrhardt J, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Current Opinion in Neurology*2005;18(5):548-53.
- [94] Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation. *Anatomy and Embryology* 2005;209:269-79.
- [95] Sesodia S, Cullen MJ. The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles. *Acta Neuropathologica* 1991;82:21-32.
- [96] Rantanen J, Ranne J, Hurme T, Kalimo H. Denervated segments of injured skeletal-muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular-junctions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*1995;54(2):188-94.
- [97] Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R. Adult mesenchymal stem cells: Potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*2002;2(4):309-20.
- [98] Archacka K, Moraczewski J, Grabowska I. Participation of „non-muscle“ stem cells in regeneration of skeletal muscle. *Postepy Biologii Komorki*2010;37(1):187-207.
- [99] Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells & Materials.* [Article]. 2010 Jul-Dec;20:121-33.
- [100] Tang JM, Xie QY, Pan GD, Wang JN, Wang MJ. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*2006;30(2):353-61.
- [101] Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and

- ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology*2002;7(2):113-7.
- [102] Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *Plos One* 2008;3.
- [103] Gneocchi M, He HM, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang LN, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine*2005;11(4):367-8.
- [104] Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, et al. Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells* 2007;25:1985-94.
- [105] Cheng SL, Zhang SF, Mohan S, Lecanda F, Fausto A, Hunt AH, Canalis E, Avioli LV. Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *Journal of Cellular Biochemistry*1998;71(3):449-58.
- [106] Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, Gerritsen WR. Hepatocyte growth factor scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34(+)). *Experimental Hematology*. [Article]. 1998 Aug;26(9):885-94.
- [107] Stewart CEH, James PL, Fant ME, Rotwein P. Overexpression of insulin-like growth factor-II induces accelerated myoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*1996;169(1):23-32.
- [108] Kamochi H, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ueda Y, Masuda C, Takada E, Watanabe K, Sakakibara M, Natuki Y, Kimura K, Beppu M, Aoki H, Suzuki N. Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation*2006;82(4):516-26.
- [109] Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research*2000(370):272-85.
- [110] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Growth factors improve muscle healing in vivo. *Journal of Bone and Joint Surgery-British*. Volume2000;82B(1):131-7

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Professor Dr. med. Carsten Perka für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und die langatmige Geduld bedanken.

Ein außerordentlicher Dank geht an Herrn Dr. med. Tobias Winkler, der mich die gesamte Zeit der Doktorarbeit über unterstützt hat und mir jederzeit mit viel Geduld, guten Ratschlägen und hilfreichen Anmerkungen zur Seite stand und mich motiviert hat. Danke!

Bei Frau Camilla Bergmann und Herrn Martin Wolny möchte ich mich für die stete Hilfe im Labor bedanken. Ohne Frau Bergmann wäre diese Arbeit niemals zu Stande gekommen.

Für die ruhige Geduld und die dauerhafte Motivation möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Kerstin und Achim und meinen Großeltern, Erika und Claus bedanken. Für die grafische Unterstützung und Hilfe geht hierbei ein besonderer Dank an meine Tante Sabine.

Ein ganz spezieller Dank geht an David für seine beruhigenden und wohlwollend zustimmenden Worte.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. med. vet. Britta Kollmann, die auf alle Fragen anregende Antworten fand und mich insbesondere in den technischen Angelegenheiten dieser Arbeit unterstützt hat. Insbesondere bin ich ihr für die stets gut gelaunte Motivation dankbar!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich mit der Frage nach der Doktorarbeit immer wieder zurück zum Thema brachten. Hierbei geht ein individueller Dank an Frau Anja Prescher, die mir in jeder Situation hilfreich zur Seite stand und immer die entsprechenden Worte fand. Merci!

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONEN

Schumann, M.-R.; Gdaniez, K. (2005): Preperitoneal Lipoma, G.H. Willital et al. Atlas of Children's Surgery, Pabst Science Publishers, Page 107-108

Gdaniez, K.; Schumann, M.-R. (2005): Subglottic Stenosis-Tracheostomy, G.H. Willital et al. Atlas of Children's Surgery, Pabst Science Publishers, Page 47-51

Winkler, T.; von Roth, P.; Schumann, MR.; Sieland, K.; Stoltenburg-Didinger, G.; Taupitz, M.; Perka, C.; Duda, GN.; Matziolis, G. (2008): In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats., Tissue Eng Part A.; 2008 Jul; 14(7): 1149-60

Winkler, T.; von Roth, P.; Matziolis, G.; Schumann, MR.; Hahn, S.; Strube, P.; Stoltenburg-Didinger, G.; Perka, C.; Duda, GN.; Tohtz, SV. (2011): Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma., Acta Ortop.; 2011 Feb; 82(1):102-11

ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

„Ich, Maria-Rose Schumann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Einfluss lokal transplanteder mesenchymaler Stammzellen auf die Regeneration nach Skelettmuskeltrauma: Morphologie und Histomorphometrie" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift

