

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Klinischer Hintergrund	2
1.2	Physiologische Muskelregeneration	8
1.3	Aktuelle Therapie der Skelettmuskelverletzung	11
1.4	Experimentelle Ansätze zur unterstützten Muskelregeneration	12
1.4.1	Traumamodelle	12
1.4.2	Experimentelle Therapieansätze	13
1.4.2.1	Physikalisch–biomechanische Überlegungen	13
1.4.2.2	Substanzbasierte Therapieansätze	14
1.4.2.3	Zellbasierte Therapieansätze	15
1.5	Zielsetzung	16
2	Zelltherapie des Skelettmuskeltraumas	18
2.1	Traumamodell	18
2.2	Proof of Concept	20
2.3	Dosis-Wirkungsbeziehung	22
2.4	In vivo Visualisierung	24
2.5	Sofortige versus späte Transplantation	26
2.6	Geschlechtsspezifische Analyse	28
3	Diskussion	30
4	Zusammenfassung und Ausblick	39
5	Abkürzungsverzeichnis	43
6	Literaturverzeichnis	44
7	Danksagung	53
8	Erklärung	54

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Verletzungen der Skelettmuskulatur gehören zu den großen Herausforderungen der Orthopädie und Unfallchirurgie, da bei einer sehr großen Häufigkeit der Entität die Regeneration der Muskulatur bisher keiner kausalen Therapie zugänglich ist.

Als Ursachen klinisch relevanter Muskelverletzungen kommen Unfälle oder die iatrogene Schädigung der Muskulatur beim Zugang zu Operationsgebieten in Frage.

Die größte und bekannteste Gruppe der unfallbedingten Muskeltraumata stellen sportassoziierte Verletzungen dar. Circa ein Drittel aller Sportunfälle sind mit Skelettmuskelverletzungen verbunden, mit der Überdehnung der Muskulatur über die Belastungsgrenze als wesentlichstem Mechanismus, welcher zu Faserbündelrissen bis hin zu kompletten Muskelbauchrissen führen kann. (1, 2) Die untere Extremität ist durch die Laufbelastung in den meisten Sportarten häufiger involviert als die obere (1, 3), nicht jedoch bei reinen Wurfsporarten (4). An der unteren Extremität sind es vor allem zweigelenkige Muskeln, wie der Musculus rectus femoris, die ischiocrurale Muskelgruppe oder der Musculus gastrocnemius, an der oberen vor allem die Muskeln der Rotatorenmanschette der Schulter, welche besonders häufig betroffen sind. (5, 6) Ein wichtiger Pathomechanismus bei der sportbedingten Muskelverletzung ist eine Überdehnung bei simultaner Kontraktion, was zu extremen Zugspannungen innerhalb der Muskulatur führt und Muskeln mit einer hohen koordinativen Last anfälliger macht. Ein weiterer Verletzungsmodus findet sich in der direkten Kontusion der Muskulatur, welche wiederum einerseits zu Strukturunterbrechungen führen kann, andererseits auch indirekt über das oft ausgeprägte intramuskuläre Hämatom Druckschäden des kontraktiven Muskelgewebes bewirken kann. Dieser Mechanismus konkurriert bei Kontaktsportarten, wie American Football oder Rugby, in seiner Häufigkeit mit der Überdehnungsverletzung. (7, 8)

In ihrer Inzidenz seltener, jedoch für die Patienten meist mit lebenslangen funktionellen Einschränkungen verbunden, sind Skelettmuskelverletzungen bei offenen oder geschlossenen Frakturen im Rahmen von Hochrasanztraumata. (9, 10) Auch hier sind die Muskelloggen der unteren Extremität am häufigsten betroffen. Neben dem Primärschaden durch die direkte Quetschung, Zerreißung oder scharfen Durchtrennung der Muskulatur kommt hierbei dem Sekundärschaden mit einem über die Zeit nach dem Trauma progredienten Gewebeverlust durch eine Unterbrechung der Gefäß-/Nervenversorgung sowie durch die ausgeprägte

posttraumatische Inflammation eine entscheidende Rolle zu. Oft sind zur effizienten Therapie eines höhergradigen posttraumatischen Weichteilschadens wiederholte Debridements mit der Entfernung von postprimären Myonekrosen notwendig, um den Sekundärschaden und die hohen Infektionsraten zu vermindern.

In der Regel stellt bei diesen Komplexverletzungen die operative Versorgung der Knochenpathologie mit den heute zur Verfügung stehenden modernen Osteosynthese- und Rekonstruktionstechniken ein weitgehend eingegrenztes Problem dar. Die Determinante für den klinischen Verlauf liegt im Ausmaß der Weichteilverletzung und nicht zuletzt im therapeutischen Umgang damit. Widergespiegelt wird dies nicht nur in posttraumatischen funktionellen Defiziten sondern auch im Auftreten von chronischen Schmerzsyndromen, welche durch adaptierte Rehabilitationsverfahren nur anteilig mitigiert werden können. (11) Des Weiteren findet sich eine Korrelation der Grade des Weichteilschadens mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer posttraumatischen Infektion, welche bei offenen Frakturen Grad III nach Gustilo und Anderson bei über 25 % liegt und den Verlauf massiv verkomplizieren kann, (12) unter anderem über den zusätzlichen Muskelsubstanzverlust durch die infektionsbedingten Myonekrosen.

Ein zusätzlicher Traumamechanismus findet sich in der indirekten Schädigung der Muskulatur innerhalb ihrer Faszienlogen im Rahmen eines posttraumatischen Kompartmentsyndroms. Steigt der intrakompartimentelle Druck durch Hämatom- und sekundäre Ödembildung um über 20-30 mm Hg über den kapillären Perfusionsdruck, so führt dies zu einer Minderversorgung der Muskulatur und der im Kompartiment verlaufenden Nerven. Für erstere hat dies ischämische Nekrosen zur Folge, die sich auch systemisch durch die Myoglobinfreisetzung in den Blutkreislauf über ein Crush-Syndrom der Nieren manifestieren können. (13) Am häufigsten treten Kompartmentsyndrome an der unteren Extremität auf, oft in Assoziation mit Tibiaschaftfrakturen, wohingegen die obere Extremität weniger häufig betroffen ist. (14)

Neben den unfallbedingten Skelettmuskelverletzungen ist in den vergangenen Jahren die iatrogene Muskelschädigung zunehmend als Problem mit bisher unterschätzter klinischer Bedeutung erkannt worden. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um die zugangsbedingte Traumatisierung von gelenksumgebender Muskulatur bei Operationen am Bewegungsapparat. Hier können dorsale Operationen an der Wirbelsäule und die Endoprothesenimplantation als repräsentative Beispiele angeführt werden.

Die das Achsskelett umgebende Muskulatur befindet sich seit langem im Fokus der konservativen Therapie von Patienten mit unspezifischem Rücken- und Kreuzschmerz. In der

operativen Therapie der Wirbelsäule wurde die zentrale funktionelle Rolle der Skelettmuskulatur erst relativ spät in den Behandlungsalgorithmen gewürdigt, z. B. durch die Einführung minimalinvasiver Techniken zur Verminderung der zugangsbedingten Muskelschädigung. Diese kann in der Schnittbildgebung als fettige Atrophie und Degeneration der paravertebralen Muskulatur beispielsweise nach lumbalen Fusionsoperationen quantifiziert werden (15) Als ein wesentlicher Faktor für das Ausmaß der Muskelverletzung bei der konventionellen posterioren Zugangstechnik, bei der die paravertebrale Muskulatur von den dorsalen Wirbelstrukturen abgelöst wird, wurde der Druck der Haken bzw. Wundspreizer identifiziert. Hierbei existiert eine positive Korrelation zwischen der Operationszeit und dem Muskelschaden. (16) Diese Problematik des quetschungsbedingten Muskeltraumas wurde auch in anderen Bereichen, wie der Hüftchirurgie lange unterschätzt. (siehe dazu auch weiter unten)

Ein wirbelsäulenspezifisches Problem ist die iatrogene Verletzung und konsekutive Degeneration segmentübergreifender Muskeln, wie der Mm. longissimi und multifidi. Dadurch kommt es bei einem lokalisierten Muskelschaden, der für ein fusioniertes, afunktionelles Segment ja nur wenig Konsequenzen hätte, immer auch zu einer funktionellen Affektion der angrenzenden, noch nicht oder in geringerem Ausmaß pathologisch veränderten Bewegungssegmente. Ob dies auch eine Auswirkung bezüglich biomechanischer Probleme nach Fusion wie das Auftreten von Anschlusslockerungen hat, kann bisher nur gemutmaßt werden. Hier werden sicherlich in Zukunft Korrelationsstudien Aufschluss geben.

Auch in der Endoprothetik sind knochenseitige Herausforderungen, wie die stabile Fixation der Prothesenkomponenten und deren Integration in den Knochen weitgehend gemeistert. Die 10-Jahres-Überlebensraten heute implantierter Knie-Totalendoprothesen liegen bei 93 – 96 % (17), von Hüfttotalendoprothesen bei 85 -94 % (18).

Im Fokus liegen nun funktionelle Defizite nach Endoprothesenimplantation, welche auch aufgrund verbesserter diagnostischer Tools wie der Ganganalyse, bildmorphologischer Evaluation durch die MRT und der Untersuchung von Laborparametern für Muskelschädigung in einem großen Umfang evident wurden.

Nach Implantation einer Hüft- oder Knieprothese steht die Wiedererlangung eines physiologischen Gangbildes im Vordergrund der Rehabilitation. Nach Knie-Totalendoprothese wird dies vorwiegend durch die postoperativ kompromittierte Funktion des Musculus quadriceps femoris behindert, welcher auch zwei Jahre nach der Operation noch relevante

Kraftdefizite im Vergleich zur gesunden Gegenseite aufweist. Insbesondere die gestörte Balance zu den beim Zugang nicht verletzten kräftigeren Beugern wirkt sich auf das harmonische Gehen nachteilhaft aus. (19)

In ihrer Konsequenz für den Patienten noch weitreichender ist die Verletzung der beckenstabilisierenden Muskulatur bei der Hüftprothesenimplantation. Ein Literaturreview mit dem Einschluss von 2455 Patienten nach Hüfttotalendoprothese zeigte eine Inzidenz von postoperativem Hinken von bis zu 20 %. (20) Ein Review über eine Kohorte von 1333 Patienten nach Hüfttotalendoprothese fand eine Rate von 11,6 % an mäßig bis schwer hinkenden Patienten bei Verwendung eines transglutaealen Zuganges. (21) Auch hier liegt der Hauptgrund für die beschriebenen funktionellen Defizite in der zugangsbedingten Muskelschädigung, im Falle der Hüftprothesenimplantation der des M. gluteus medius und minimus. Dieses sehr sensible System wird bereits durch verhältnismäßig kleine Eingriffe, wie das Einbringen eines Femurnagels über einen Split der Muskulatur über dem Trochanter major bei jungen Patienten gestört, wie man sechs und zwölf Monate nach dem Eingriff zeigen konnte. (22, 23)

Der nach der Primärimplantation manchmal noch kompensierbare Schaden der Muskulatur wird mit jedem Zugangstrauma bei Prothesenrevisionen manifester. Durch das steigende Patientenalter und die durch die operativ-technischen Verbesserungen immer früher ansetzenden Ersteingriffe, sehen wir uns mit einer zunehmenden Anzahl an Wechseloperationen konfrontiert. (Abbildung 1)

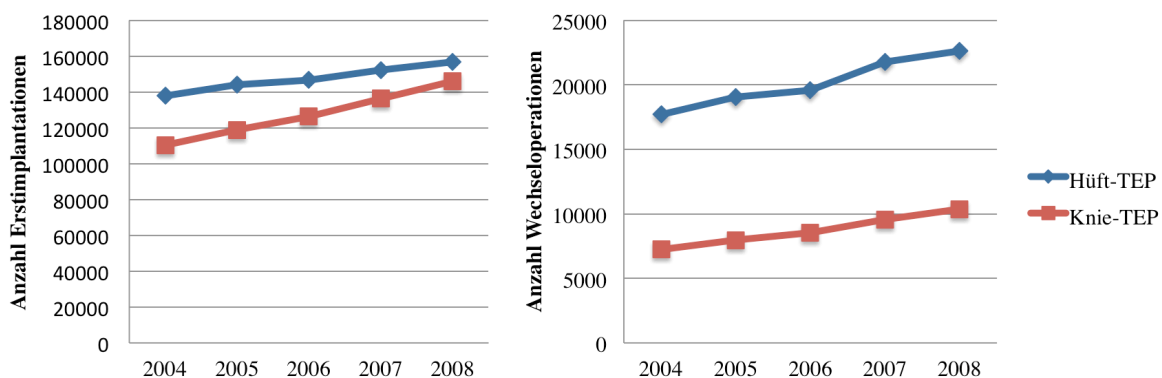


Abbildung 1. Anzahl der Hüft- und Knieendoprothesen-Erstimplantationen und Wechsel der Jahre 2004-2008. (BQS – Report, Institut für Qualität und Patientensicherheit)

Im Falle der Implantation einer Hüfttotalendoprothese führt die wiederholte Operation nicht selten zu einer subtotalen Umwandlung der Mm. glutei medius und minimus in nicht kontraktiles Ersatzgewebe, wie beispielhaft in den MRT-Aufnahmen der Abbildung 2

dargestellt. Dies führt zu schweren Gangstörungen mit Trendelenburg-Hinken infolge einer Unfähigkeit, das Becken am Standbein zu stabilisieren, weshalb die Patienten oft ein Leben lang auf die Benützung von Unterarmgehstützen angewiesen sind.

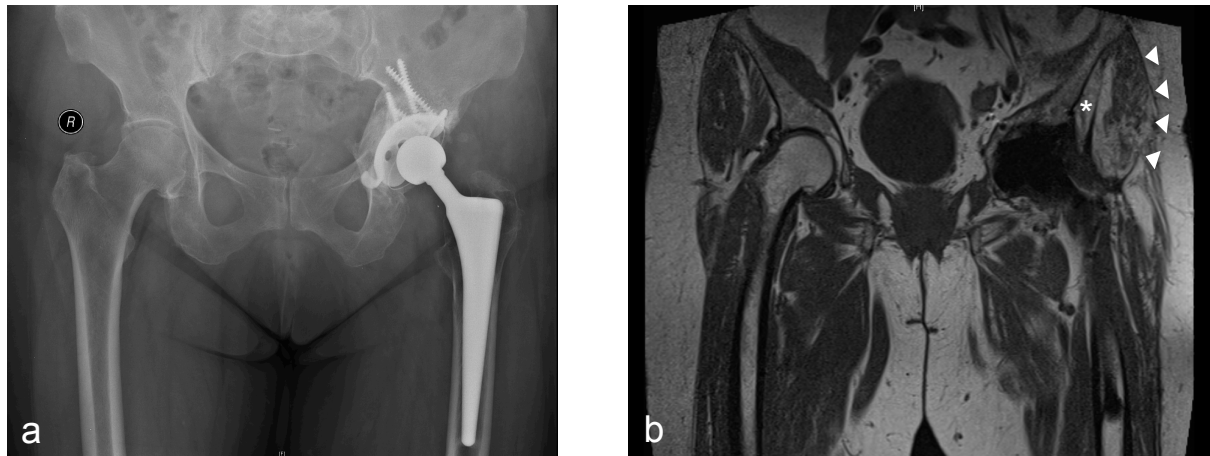


Abbildung 2. Gegenüberstellung einer unauffälligen Beckenübersichtsaufnahme und eines pathologischen MRT-Befundes einer Patientin nach 2-maligem Wechsel der Hüfttotalendoprothese und ausgeprägtem Insuffizienzhinken links: (a) Beckenübersichtsaufnahme mit Abbildung der Prothesenkomponenten ohne Lockerungszeichen. Biomechanisch-funktionell wesentliche Parameter wie Offset und Beinlänge sind gut rekonstruiert. Es zeigen sich keine Avulsionsfrakturen im Bereich der Ansätze der pelvitrochantären Muskulatur. (b) Im frontalen T1-gewichteten MRT-Schnitt stellen sich der M. gluteus medius (Pfeilköpfe) und minimus (Asterisk) bei normalem Signal rechts auf der linken Seite mit nur wenigen residuellen Anteilen gesunder, kontraktile Muskulatur dar. Auch diese ist diffus orientiert und durch den narbigen Umbau pathologisch verändert.

Um dem Problem der iatrogenen Muskelschädigung entgegenzutreten wurden in den letzten zwei Dekaden zahlreiche minimalinvasive operative Zugänge beschrieben, für die eine weitgehende Schonung der Muskulatur im Zugangsbereich beansprucht wurde. Ermöglicht wurden diese auch durch die Entwicklung neuer Implantate, wie beispielsweise des Less Invasive Stabilisation Systems (LISS) in der Traumatologie (24), der Hüftprothesenschäfte mit reduzierter lateraler Schulter oder der perkutan einbringbaren dorsolateralen Instrumentation an der Wirbelsäule (25).

Im Bereich der Wirbelsäulenchirurgie scheint sich gegenüber dem konventionellen dorso-medianen Zugang ein tatsächlicher Vorteil minimalinvasiver Zugänge in Bezug auf postoperative Rumpfkraft (26), paraspinale Muskelatrophie (27) sowie postoperativen Schmerz und Mobilisation (28) abzuzeichnen. Dies gilt für verschiedene Techniken, welche die beim konventionellen Vorgehen notwendige Ablösung der tiefen paramedianen transversospinalen Muskelgruppe vermeiden sowie die Quetschung der paraspinalen Muskulatur z. B. durch den Einsatz von Röhrenretractoren reduzieren. In den Fällen, in denen über einen konventionellen paramedianen Zugang vorgegangen werden muss, wie bei Revisionseingriffen oder der Korrektur langstreckiger degenerativer Lumbalskoliosen, kann der resultierende Weichteilschaden durch muskelschonende Prinzipien, wie der intermittierenden Retraktion zumindest vermindert werden.

In anderen Bereichen der orthopädischen Chirurgie brachten die minimalinvasiven Operationstechniken oft nicht die erwartete funktionelle Verbesserung, da sich durch die verkleinerten Zugänge die Schädigung der Muskulatur durch den dabei notwendigen vermehrten Hakendruck von einem scharfen in ein stumpfes Trauma umwandelte, welches in seinem Ausmaß oft als äquivalent betrachtet werden kann.

Beispielsweise zeigte die Analyse der hüftumgebenden Muskulatur nach der Implantation einer Hüfttotalendoprothese bei Kadavern signifikante Primärschäden bei der Anwendung verschiedenster minimalinvasiver Zugänge, wie dem Two-Incision Zugang, dem mini-posterioren Zugang sowie dem mini-Smith-Petersen Zugang. Im Falle des Two-Incision Zugangs können sogar bis zu 37,5 % des M. gluteus medius geschädigt werden. (29, 30) Des Weiteren konnte man durch die Verwendung von modernen, artefaktsupprimierenden, magnetresonanztomographischen Verfahren erkennen, dass die quetschungsbedingte Schädigung der hüftumgebenden Muskulatur bei minimalinvasiven Implantationen der schnittbedingten Verletzung bei konventionellen Techniken gleichkommt. Im Falle der hüftstabilisierenden Muskulatur ist exemplarisch dokumentiert, dass nicht nur das Ausmaß, sondern auch die Art des entdeckten Muskelschadens oft überraschend war. Dies konnte in einer MRT-Studie gezeigt werden, in der wir die periartikuläre Muskulatur nach Implantation einer Hüfttotalendoprothese über einen minimalinvasiven, anterolateralen versus transglutealen Zugang darstellten. (31) In der Hälfte der Fälle zeigte sich hierbei ein Sehndefekt und eine Atrophie des M. gluteus minimus, welcher durch beide Implantationstechniken in gleichem Ausmaß geschädigt worden war. Dieser Muskel ist anatomisch vom größeren M. gluteus medius bedeckt und hat genau wie dieser eine

beckenstabilisierende, abduzierende und rotierende Funktion, die damit auch bei minimalinvasiver Operation kompromittiert ist.

Eine Studie, in welcher die Muskelschädigung nach Implantation einer Knieendoprothese mittels Serummarkeranalyse quantifiziert wurde, konnte aufzeigen, dass auch die meisten der postulierten minimalinvasiv-muskelschonenden Zugänge zum Kniegelenk, wie der minimalinvasive Subvastus-Zugang und der Midvastus-Zugang, mit einer der konventionellen Technik äquivalenten Muskelverletzung einhergehen. (32) Trotzdem zeigen die meisten Arbeiten im Bereich der Knieendoprothetik einen leichten Vorteil der minimalinvasiv operierten Patienten bei der Extensionskraft. In einer rezenten Studie konnte gezeigt werden, dass bei einem ganganalytischen Vergleich nach minimalinvasivem versus konventionellem medial-parapatellärem Zugang der Kraftvorteil in den funktionellen Tests jedoch nicht umgesetzt werden kann. (33)

1.2 Physiologische Muskelregeneration

Mauro et al. beschrieb 1961 erstmalig lokale Stammzellen, von denen im Falle einer Verletzung die Regeneration von Muskelfasern ausgeht und die nach wie vor als zelluläre Hauptakteure nach Skelettmuskeltrauma gelten. (34, 35) Diese Satellitenzellen sind zwischen Basallamina und Sarkolemm gelegen und proliferieren bei Verletzungen asymmetrisch, d. h. eine Zelle verbleibt zum Pool-Erhalt, die andere fusioniert mit der regenerierenden Muskelfaser und differenziert zum Myoblasten. (35, 36) Ausgelöst wird Proliferation und Differenzierung der Zellen durch aus verletzten Fasern und immigrierten Zellen sezernierte Wachstumsfaktoren und Cytokine, wie HGF, FGF, IGF, IL-1 und IL-6. (37-40)

Im Alter nimmt die Population der Satellitenzellen ab. (41) Auch chronische Regenerationsprozesse bei permanenten De- und Regenerationszyklen, wie sie bei Muskeldystrophien vorkommen, erschöpfen den Zellpool in dem Ausmaß, dass achtjährige Patienten mit Muskeldystrophie Typ Duchenne nur mehr den Satellitenzellpool eines gesunden 80-Jährigen aufweisen. (36)

Gesteigerte Satellitenzellaktivität findet sich bei aktivem Training (42, 43), die Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika kann ihre Aktivität vermindern (44).

Seit der Entdeckung der Satellitenzelle konnten weitere lokale Zellen im Skelettmuskel mit myogenem Regenerationspotential beschrieben werden. Hier sind vor allem gefäßassoziierte

Zellen zu nennen, unter ihnen Mesangioblasten und Perizyten. Diese zeigen eine gute Differenzierungsfähigkeit *in vitro* und konnten im Tierversuch aufgrund ihres Differenzierungs- und Fusionspotentials erfolgreich zur Restitution von Dystrophin-defizienten Muskelfasern eingesetzt werden. (45, 46) Auch endotheliale Zellen, welche aus dem Skelettmuskel isoliert wurden, können verletzte Muskelfasern regenerieren. (47) Interstitielle Zellen, welche ebenfalls als Progenitorzellen für Muskelfasern identifiziert werden konnten, sind Side Population Cells (48) und Muscle-derived Stem Cells (MDSC) (49).

Meilensteine im Verständnis der Regeneration von Skelettmuskulatur stellten die Arbeiten von Ferrari et al. (50) und Bittner et al. (51) dar. Erstmals konnte gezeigt werden, dass auch Zellen aus dem Knochenmark und damit nicht ortsständige Stammzellen bei Regenerationsprozessen im Skelettmuskel nach Myolyse oder bei Dystrophie involviert sind. Eine Arbeit von Brazelton et al. (52) zeigte in einem Mausmodell die Inkorporation von Knochenmarkszellen auch im Rahmen des physiologischen Turn-Overs in verschiedenen Skelettmuskeln, wobei die anteilige Inkorporation GFP-positiver Zellen nach 16 Monaten in allen Muskeln bis auf den nagereigenen Panniculus carnosus (5%) nur von 0,005 % bis 0,04 % der Muskelfasern lag.

Zusammengefasst wird die muskuläre Regeneration von ortsständigen Stammzellen wie auch von ins Traumagebiet migrierten hämatogenen und mesenchymalen Zellen getragen. Mediert werden diese Prozesse wesentlich durch die inflammatorische Reaktion.

Der Heilungsprozess kann grob in drei sich überschneidende Phasen unterteilt werden (6, 53):

Degeneration/ Inflammation

Unmittelbar nach dem Trauma werden Proteasen ins Gewebe freigesetzt, welche zu einer Autodigestion verletzter Muskelfasern führen. Chemotaktisch angelockte neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind Teil der ersten inflammatorischen Welle, welche bereits in der ersten Stunde beginnt und im Rahmen derer es zu einem Abräumen von untergegangenen Debris kommt. Hierbei kommt den Makrophagen eine zentrale Rolle auch in der Sekretion von Cytokinen zu, welche auf der einen Seite direkt zur Regeneration beitragen, auf der anderen Seite andere Zellen chemotaktisch an den Ort des Traumas locken und stimulieren. (54)

Dass der inflammatorische Prozess eine wesentliche Rolle in der Heilung verletzten Muskelgewebes innehat, zeigen auch Arbeiten, die nachwiesen, dass sich

antiinflammatorische Substanzen, wie sie im klinischen Alltag häufig bei Muskelverletzungen eingesetzt werden, negativ auf die Gewebequalität auswirken können. (55, 56)

Regeneration

Ab dem 3. Tag nach Trauma können zentronukleäre, d. h. neu gebildete bzw. regenerierende Muskelfasern beobachtet werden. (57, 58) Initiiert wird die eigentliche Regenerationsphase wie oben beschrieben durch die lokale Cytokinausschüttung, deren Hauptanteil auf Makrophagen zurückgeht. (54, 59) Die wesentlichen involvierten lokalen Vorläuferzellen umfassen Satellitenzellen, Side-Population Cells, Muscle-derived Stem Cells, Mesangioblasten und Perizyten. Welchem Zeitverlauf die Satellitenzellaktivierung, -proliferation und -differenzierung folgt, hängt auch von der Art des Traumas ab. Bei chemischer Schädigung, z.B. durch Myotoxine, kann die Aktivierung bereits nach sechs Stunden erfolgen. (41) Begleitet wird die Regeneration der Myotuben von einer Neubildung und Einsprossung von Kapillaren, der Ausbildung neuer myoneuronaler Verbindungen sowie myotendinöser Verbindungen auch mit dem interstitiellen Bindegewebe. (60)

Reifung und Remodelling

Im Heilungsverlauf bilden sich reife Muskelfasern mit randständigen Zellkernen und größer werdenden Durchmessern aus. Parallel zur Regeneration der Myotuben kommt es zum Ersatz zerstörten kontraktilen Muskelgewebes durch kollagenes Bindegewebe, das sich von einem zunächst lockeren, zellreichen Gewebe in ein straffes Narbengewebe umwandelt. Dieses ist einerseits wesentlich für die Wiederherstellung der funktionellen Kontinuität des Muskels und die damit verbundene Kraftübertragung. Andererseits stellt es eine dauerhafte Veränderung dar, die die Bildung kontraktilen Gewebes verhindert und ebenso eine Barriere für neu aussprossende Axone und Muskelfasern bildet. (6, 61)

Die klinischen Konsequenzen dieser Defektheilung sind verminderte Kontraktilität des Muskels, ein verkleinerter Bewegungsumfang und Schmerzen.

1.3 Aktuelle Therapie der Skelettmuskelverletzung

Die Therapie der unfallbedingten Skelettmuskelverletzung folgt Prinzipien, die sich bereits vor langer Zeit etabliert haben und im Wesentlichen darauf ausgerichtet sind, die Bedingungen für die intrinsische Regeneration des Muskels zu optimieren.

Diese intrinsische Heilung verletzten Muskelgewebes läuft über zwei Hauptmechanismen:

- I. Die Bildung neuer kontraktiler Elemente durch lokale Stammzellen, hier vor allem Satellitenzellen.
- II. Die Heilung verletzter Muskulatur über einen Defektheilungsmechanismus. Defizientes Muskelgewebe wird hierbei nicht durch neue kontraktile Muskelsubstanz, sondern durch fibröses Bindegewebe ersetzt. Der funktionelle Wert desselben liegt in der reinen Übertragung durch kontraktile Fasern generierter Kräfte.

Die konservative Therapie von Muskelverletzungen folgt einem einfachen mechanistischen Ablauf, dem **RICE**-Schema angepasst. Unmittelbar nach der Verletzung wird der Muskel lokal gekühlt (**I**ce) und mit einem Druckverband (**C**ompression) versorgt, der für drei Stunden beibehalten wird, um den Raum für das sich sofort entwickelnde Hämatom zu verkleinern. Der Verletzte ist angehalten, die betroffene Extremität zu schonen (**R**est) und hochzulagern (**E**levation), um den Rückfluss zu verbessern. Längere Schonung wirkt einer effizienten Heilung entgegen, wie auch tierexperimentelle Arbeiten belegen konnten. (62)

Additive medikamentöse Verfahren, wie die lokale Infiltration des Muskels mit Lokalanästhetika (welche im Übrigen myolytisch wirken), homöopathischen Substanzen oder Aminosäureextrakten, wie Actovegin, werden von namhaften Sporttherapeuten empfohlen und durchgeführt, entbehren jedoch nach wie vor der Basis eines wissenschaftlichen Beleges. Der Einsatz von Plättchen-reichem Plasma (PRP) und autolog konditioniertem Plasma (ACP), die vor allem durch ihre Konzentration an Wachstumsfaktoren im Tierexperiment zu einer vermehrten Aktivierung von Satellitenzellen (63) und einer Heilungsbeschleunigung (64) führten, wird nur mit Einschränkungen empfohlen.

Operative Therapien von Skelettmuskelverletzungen zielen darauf ab, die Kontinuität des Muskels soweit wiederherzustellen, dass zumindest der oben genannte Defektheilungsmechanismus durch die Organisation des einströmenden Hämatoms eine reelle Chance hat, eine funktionelle Einheit zu schaffen. (65, 66) Ein großes Problem bei der Adaptation gerissenen Muskelgewebes ist, dass für die Naht nur Faszien- und

Sehnenstrukturen verwendet werden können, da das Fadenmaterial das Muskelfasergewebe durch den geringen Anteil an kollagenem Bindegewebe bei Kontraktion durchschneidet. Durch die Kombination von Rückstichtechniken kann die Ausrissfestigkeit der Nähte zwar verbessert werden (67), die unvermeidlichen Dehissenzen in der Reparaturzone stellen jedoch, auch trotz dieser Maßnahme, eine der entscheidenden Limitationen der Muskelheilung nach operativer Versorgung dar.

Im Falle der oft umfangreichen Muskelbeteiligung bei Komplexverletzungen muss oft in mehreren Revisionseingriffen eine schrittweise Weichteilkonditionierung durchgeführt werden. Hierbei werden Myonekrosen, welche ischämisch oder durch die posttraumatische Inflammation bedingt sind, entfernt. Ein konsequentes Vorgehen ist unabdingbar, da in situ verbliebenes nekrotisches Muskelgewebe den Boden von posttraumatischen Infektionen bildet, welche eine weitere Reduktion des durch Trauma und Debridements ohnehin schon geschwächten kontraktiven Muskelgewebes zur Folge hat. (9, 10) Größere Substanzverluste können sekundär oft nur durch Muskellappenplastiken gedeckt werden, was wiederum zu einer erheblichen Morbidität im Gebiet der Lappenhebung und im Zielgebiet nur zu einem afunktionellen Gewebersatz führt. (68)

In Conclusio existieren für die Therapie von Muskelverletzungen viele in ihren Möglichkeiten limitierte Ansätze in der klinischen Praxis, welchen gemein ist, dass sie keinen additiven Effekt auf die Regeneration besitzen, sondern vor allem die muskeleigenen Heilungsmechanismen unterstützen.

1.4 Experimentelle Ansätze zur unterstützten Muskelregeneration

1.4.1 Traumamodelle

Für die Analyse neuer innovativer Therapien bei Skelettmuskelverletzungen existieren mehrere Tiermodelle. In vitro Modelle wie z.B. Scratchvarianten im Zellkultur-Monolayer können die Komplexität der Verletzung bisher nicht nachbilden. Das Ziel eines experimentellen Muskeltraumas muss es jedoch sein, die wesentlichen Regenerationsabläufe der klinischen Situation widerzuspiegeln. Bisherige in vivo Modelle umfassen toxische Traumata (50), Kryotraumata (69), Ischämietraumata (70), Schnitttraumata (66, 71), Kontusions- und Crush- also Quetschungstraumata.

Die Verwendung von Toxinen, wie z. B. dem Cobravenom Cardiotoxin, ist eine gängige Methode, welche über eine Depolarisierung der Plasmamembranen (72) zu einer Myolyse führt. Obwohl auch eine Neurotoxizität postuliert wird, stellt die Myolyse durch Schlangentoxine die selektivste Form einer Muskelfaserschädigung dar. (73) Allerdings ist die Regeneration der Muskulatur nach einem derartigen Trauma stark beschleunigt und umfassender als beispielsweise nach einem Crushtrauma, da die Basallaminae und die Mikrovaskularisierung komplett erhalten bleiben. Dies macht das Modell für kliniknahe Analysen nur eingeschränkt verwendbar.

Ischämie Modelle sind hoch standardisierbar, können aber als Regenerationsmodelle tatsächlich nur die klinischen Pendant der direkten oder indirekten Devaskularisierung abdecken.

Die mechanischen Traumata spiegeln die meisten klinischen Situationen am besten wider. Häufig verwendet wurden bisher Kontusionsmodelle, bei denen die Verletzung durch ein herabfallendes Gewicht ausgelöst wird mit der konsekutiven Traumatisierung aller Weichteilstrukturen unter dem Areal des Impulses. (74)

Offene Crushtraumamodelle erlauben die Analyse der Regeneration in einem selektierten Muskel. (75-79) Leider haben bisherige Modelle die Nachteile, dass entweder nur ein Teil des Muskels durch einen rein segmentalen Crush verletzt wird (80), oder auch die Gefäß-/Nervenversorgung des betroffenen Muskels beschädigt wird (81), sodass die Regeneration der verletzten Muskelfasern durch die kompromittierte Versorgung überlagert wird. Dies erschwert Effektanalysen, da Defizite der Innervation und Ischämien zu einer Heilungsverzögerung führen. (82, 83)

1.4.2 Experimentelle Therapieansätze

1.4.2.1 Physikalisch–biomechanische Überlegungen

Die dem klinischen Therapieprotokoll zugrunde gelegten Überlegungen der initialen Kühlung sowie der nur kurzfristigen Immobilisierung der Patienten konnten im Tierexperiment auf histologischer und funktioneller Ebene bekräftigt werden. In einer Arbeit aus unserer Klinik konnten Schaser et al. zeigen, dass Kryotherapie unmittelbar nach einem Kontusionstrauma in der Ratte zu einer verbesserten Mikrozirkulation und zu einer reduzierten Myonekrose führt. (84) Menetrey et al. untersuchten die Heilung einer Schnittverletzung bei Mäusen und beschrieben einen negativen Effekt einer fünftägigen Immobilisierung der betroffenen

Extremität gegenüber einer Gruppe ohne Therapie. (66) Dies konnte auch bei Rattenmuskeln gezeigt werden, die einem Crushtrauma unterzogen worden waren. (85)

1.4.2.2 Substanzbasierte Therapieansätze

Experimentelle Arbeiten überprüften zum einen Wirkstoffe, die bereits im Patienten zum Beispiel als Analgetika im Einsatz waren und deren Effekt auf die Muskelheilung untersucht wurde. Zum anderen wurden Wirkstoffe mit bereits bekannten Mechanismen untersucht, deren Umlegung auf die Skelettmuskelheilung zu einer hypothetisch verbesserten Regeneration führen sollte.

Beispiele von ersterem Ansatz sind Untersuchungen zum Effekt von Corticosteroiden und NSAR auf muskuläre Vorläuferzellen und Muskelheilung. Hier konnte gezeigt werden, dass eine einmalige intramuskulär applizierte Dosis des Corticosteroids Methylprednisolon Acetat die Regeneration nach Kontusionstrauma massiv kompromittierte. (86) Bezüglich des Einflusses der bei Patienten in der Behandlung von Weichteilverletzungen häufig eingesetzten NSAR sind in der Literatur widersprüchliche Aussagen zu finden. Die gängige antiinflammatorische Substanz Naproxen führte zu keiner Verschlechterung der Muskelheilung (87), wohingegen eine Arbeit zu Piroxicam eine verminderte Kraft nach Überdehnungs-Trauma zeigte (88).

Aufgrund der oben genannten Überlegungen zur posttraumatischen Fibrose waren gerade auch anti-fibrotisch wirksame Substanzen Inhalt von Versuchen zur Optimierung der Muskelregeneration. Im Experiment erfolgreiche Ansätze wurden hierbei mit dem TGF- β -Antagonisten Decorin und dem Myostatin-Antagonisten Suramin durchgeführt. (89, 90) Interessanterweise hing die Reduktion der Fibrose allerdings nicht direkt mit der Verbesserung der Muskelfunktion zusammen, was die Autoren schlussfolgern ließ, dass für eine optimale funktionelle Heilung auch das Verhältnis der Regeneration der Muskelfasern und des Bindegewebes eine wesentliche Rolle spielt.

Einige für die Muskelregeneration wesentliche Wachstumsfaktoren konnten bereits identifiziert und therapeutisch im Experiment eingesetzt werden. Hierbei sind vor allem IGF-1 und bFGF zu nennen, die erfolgreich bei Schnitttraumata eingesetzt werden konnten. (91)

1.4.2.3 Zellbasierte Therapieansätze

Die grundlegende Idee hinter dem Einsatz von exogen zugeführten Zellen zur Regeneration pathologisch veränderter Skelettmuskulatur liegt zum einen in der Supplementierung des Muskelgewebes mit dort nicht oder in zu geringem Ausmaß vorhandenen Strukturproteinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren, zum anderen in einer Vergrößerung des lokalen Stammzellpools. Zusätzliche postulierte Wirkmechanismen von Zelltherapien wie beispielweise über die immunmodulatorische und antiapoptotische Wirkung von mesenchymalen Stammzellen erweiterten dieses Spektrum in den letzten Jahren. (92)

Ein weiterer Grund für den Einsatz von Zellen in der regenerativen Medizin ist auch die Erwartung, der Komplexität der Heilungsvorgänge mit einem Therapeutikum entgegenzutreten, das seine Wirkung an das Milieu, in das es verabreicht wurde, anpassen kann. Der Einfluss verschiedener mechanischer, zellulärer und solubler Faktoren auf mesenchymale Stammzellen konnte in zahlreichen *in vitro* Arbeiten beschrieben werden. (93-95) Die Verabreichung medikamentöser Wirkstoffe kann mit diesem Therapieansatz sicherlich nicht konkurrieren, dieser muss jedoch auch für die verschiedenen Formen der Zelltherapie *in vivo* noch experimentell bestätigt werden.

Initiale Versuche regenerierende Skelettmuskulatur durch die lokale Injektion von Zellen zu beeinflussen, wurden im Mausmodell der Muskeldystrophie Typ Duchenne durchgeführt. Hierbei wurden allogene Myoblasten transplantiert, welche in der Lage waren, eine Dystrophinexpression in Muskelfasern zu bewirken. (96-98) Besonders die der Erkrankung inhärente Problematik der ubiquitären Dystrophindefizienz kombiniert mit dem solitären Wirkmechanismus der Fusion der Zellen mit den Host-Fasern sowie die notwendige Immunsuppression ließen die auf die ersten experimentellen Ergebnisse folgenden klinischen Studien scheitern. (99)

Im Falle einer Verletzung von Skelettmuskulatur sind die Probleme, die sich einer zellbasierten Therapie stellen, von anderer Natur als bei Myopathien. Neben dem Umstand, dass es sich bei einer Verletzung um ein lokal umschriebenes Phänomen handelt, sind in die Pathologie nicht nur spezifische Proteine der Skelettmuskelfasern involviert, sondern auch muskeleigene Blutgefäße, Nerven und Bindegewebe. Vor diesem Hintergrund wurden Versuche mit nicht-muskellosoziierten Zellen mit dem Potential, in mehrere Zelltypen zu differenzieren, durchgeführt. Ferrari et al. führten erstmals eine Transplantation von Knochenmarkszellen in einen traumatisierten Muskel (Myolyse durch Cardiotoxin) durch und konnten eine Integration von β -Gal-markierten Zellen in regenerierende Muskelfasern zeigen

- allerdings nur in einer sehr geringen Anzahl. Die Studie konnte auch bei intravenöser Gabe der Knochenmarkszellen eine prinzipiell mögliche Beteiligung der Zellen an der Regeneration nachweisen.

Bone Marrow-Derived Cells (BMDCs), hierbei spezifisch mesenchymale Stammzellen (MSCs), haben neben dem Vorteil ihres Differenzierungspotentials auch die Fähigkeit, über ihr Sekretom extrazelluläre Prozesse zu steuern. Dadurch ist es ihnen möglich, das lokale Immunsystem, die lokale Bindegewebsbildung und Angiogenese zu beeinflussen. Weiters konnte ein Einfluss auf die Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit wie auch die Apoptoserate verschiedener Zellen nachgewiesen werden. Experimentelle Arbeiten dazu lagen zum Zeitpunkt unserer initialen Studien zur Zelltherapie im Muskeltrauma vor allem im Bereich der myokardialen Regeneration vor. (100-102)

1.5 Zielsetzung

Bei der Behandlung von Verletzungen der Skelettmuskulatur steht uns aktuell keine Therapie zur Verfügung, die es vermag, zerstörtes Muskelgewebe wiederherzustellen. Die Defektheilung nach traumatischen oder iatrogenen Traumata führt häufig zu schlechten klinischen Ergebnissen und invalidisierten Patienten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Konzept zu entwickeln, das es uns erlaubte, einen zellbasierten Therapieansatz für die Regeneration verletzter Skelettmuskulatur zu etablieren.

Dafür war es zunächst nötig, ein Tiermodell zu etablieren, das bei einer klinisch relevanten Traumatisierung eines Skelettmuskels eine möglichst selektive Analyse der Muskelfaserregeneration erlaubte.

Der zweite Schritt war es, auf Basis dieses Modells die Wirksamkeit einer lokalen Transplantation mit MSCs zu untersuchen und eine Dosis-Wirkungsbeziehung dieser Therapieform zu beschreiben.

Als nächstes Ziel verfolgten wir die in vivo Detektion der MSCs im Zeitverlauf nach einer Markierung mittels Eisenoxidnanopartikeln, sowie die Korrelation der in vivo Daten mit histologischen Schnitten.

In den weitaus meisten klinischen Szenarien wäre der Einsatz eines Zelltherapeutikums unmittelbar nach Muskelverletzungen einer späteren Applikation vorzuziehen. Deshalb

planten wir einen experimentellen Ansatz, in dem wir die Wirksamkeit einer sofortigen Transplantation im Vergleich zu der bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten späten Transplantation untersuchten.

Die abschließende Zielsetzung war es, einen Einfluss des Geschlechtes auf die Effizienz der MSC-Therapie zu analysieren, da mehrere experimentelle Arbeiten auch in anderen Gebieten Geschlechtereffekte bei Zelltherapien nachgewiesen hatten.

2 Zelltherapie des Skelettmuskeltraumas

2.1 Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV

Zeitverlauf der Skelettmuskelregeneration nach schwerem Trauma - Analyse der Muskelfunktion vor dem Hintergrund von MRT und histologischen Erkenntnissen

Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma - Muscle function against the background of MRI and histological findings

Acta Orthop. 2011 Feb;82(1):102-11; <http://dx.doi.org/10.1016/j.genm.2012.01.007>

Zu Beginn unserer Forschungsarbeit bestand die Problematik vor allem darin, dass bisherige Tiermodelle von Skelettmuskeltraumata entweder nur auf segmentalen Verletzungen basierten oder - den ganzen Muskel traumatisierend - die Gefäß-/Nervenversorgung mitbetrafen. Letzteres schränkt eine differenzierte Betrachtung der Heilungsvorgänge ein, da sowohl Ischämie wie auch Denervation die Regeneration von Skelettmuskelfasern beeinträchtigen. (82, 83, 103, 104) Den folgenden Versuchen ging also zunächst die Etablierung eines für die Untersuchung des Effektes einer Zelltherapie geeigneten Muskeltraumas voraus.

Im beschriebenen Modell etablierten wir ein selektives Trauma des M. soleus der Sprague Dawley Ratte. Bei der Verletzung handelt es sich um eine Quetschverletzung, welche standardisiert unter Aussparung der bei diesem Muskel im mittleren Drittel des Muskelbauches gelegenen Insertion des Gefäß-/Nervenbündels durchgeführt wird. Die Faszie bleibt dabei intakt, wodurch eine lokale Injektion von Zellen nach dem Trauma keinen Efflux aus dem Muskel zur Folge hat.

Wir publizierten die Beschreibung des Traumamodells erst nach den ersten Anwendungen, da wir die biomechanischen Auswertungen durch später durchgeführte makro- und mikromorphologische Analysen ergänzten und somit die Qualität der Charakterisierung erheblich steigern konnten. Die MRT-Datensätze zeigten, dass die Selektivität des Traumas sehr hoch ist mit einem auf den M. soleus beschränkten Signal in T1- und T2-Wichtungen, welches über die Zeit gut mit den histologischen Analysen korrelierte.

Immunhistochemische Färbungen zeigten im gesunden Muskel die Beschränkung der Nervenendplatten auf ein distinktes Areal in der Mitte des Muskelbauches und nach dem Trauma eine Neubildung von myoneuronalen Verbindungen im Bereich des gesamten Muskels. Dies ist ein Hinweis auf eine Re-Konnektion der durch das Trauma separierten

regenerierenden Muskelfasern mit dem versorgenden Nerven. Myotendinöse Verbindungen von regenerierenden Muskelfasern mit dem umgebenden, fibrosierten interstitiellen Gewebe konnten ebenfalls nach Trauma im Bereich des gesamten Muskels beobachtet werden. Dies zeigt einerseits die homogene Schädigung des M. soleus nach Trauma, andererseits den mechanischen Anschluss der kontraktilen Elemente an das zugfeste Bindegewebe.

2.2 Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN

Autologe Knochenmarks-assoziierte Zellen verbessern die Muskelkraft nach einer Crush-Verletzung der Skelettmuskulatur in Ratten

Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats

Tissue Eng. 2006 Feb;12(2):361-7

Die Hypothese unserer ersten Arbeit zur Zelltherapie nach Muskeltrauma war, dass die lokale Transplantation von autologen mesenchymalen Knochenmarkszellen zu einer Verbesserung der Muskelfunktion führt. Der Ansatz der Transplantation zusätzlicher regenerationsfördernder Zellen war darin begründet, dass in einem Skelettmuskel nach einem Trauma nachweislich mehr Vorläuferzellen akkumulieren als residente Stammzellen, z. B. Satellitenzellen, vorhanden sind. Somit migrieren bereits beim unbeeinflussten Heilungsprozess Zellen von außerhalb in den betroffenen Muskel. Auch bei chronischen Regenerationsprozessen, wie in Muskeln von Mäusen mit Dystrophindefizienz, sind extramuskuläre Stammzellen aus dem Knochenmark beteiligt. (51)

Zum Zeitpunkt der Arbeit 2.2 existierten keine weiteren Studien zum Effekt autologer knochenmarksassoziierter Zellen auf die Muskelfunktion nach Trauma.

Basierend auf dem in der Arbeit 2.1 beschriebenen neuen Muskeltraumamodell, das gegenüber den existierenden die Vorteile der Selektivität und der Involvierung des gesamten Muskels bei Schonung der Innervation und Blutversorgung bot, führten wir unseren Initialversuch zur zellulär unterstützten Muskelregeneration durch.

Wir isolierten hierfür Zellen aus dem Knochenmark von Sprague Dawley Ratten und führten eine Woche nach oben beschriebenem Muskeltrauma eine lokale autologe Transplantation durch. Drei Wochen nach Transplantation führten wir eine biomechanische Analyse mit Messung der twitch und tetanischen Muskelkraft unter Stimulation des Nervus ischiadicus durch.

Die Wahl der mesenchymalen Knochenmarkszellen als Kandidaten für einen zelltherapeutischen Ansatz trafen wir zum einen aus diesen Überlegungen. Zum anderen erschien uns der Einsatz einer Zelle, die ein Differenzierungspotential in verschiedene

Zelltypen besitzt, im Falle der Muskelverletzung, die auch bei hoher Selektivität immer eine Mischverletzung von Muskelfasern, intramuskulären Gefäßen, Nerven und Bindegewebe darstellt, für sinnvoller als der Einsatz einer reinen muskulären Vorläuferzelle.

2.3 Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Mehta M, Perka C, Duda GN

Dosis-Wirkungsbeziehung mesenchymaler Stammzelltransplantation und funktioneller Regeneration nach schwerem Skelettmuskeltrauma in Ratten

Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats

Tissue Eng Part A. 2009 Mar;15(3):487-92;

<http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0426>

In Arbeit **2.2**, unserer ersten Publikation zur unterstützten Regeneration von verletzter Skelettmuskulatur mittels der Transplantation von mesenchymalen Knochenmarkszellen (BMDSCs), konnten zwei Erkenntnisse herausgearbeitet werden. Einmal konnten wir die Eignung des 2011 detailliert charakterisierten Tiermodells für die experimentelle Analyse einer neuen Therapie zeigen. Zum anderen wurde ein Proof of Concept erzielt mit dem Nachweis der Effizienz der Transplantation nicht-matrixassoziierter mesenchymaler Stromazellen in der funktionellen Regeneration traumatisierter Skelettmuskulatur.

Die Stärke der Studie lag vor allem in der funktionellen Auswertung der Soleusmuskeln *in vivo*. Der Vorteil der BMDSCs als Kandidaten der Zelltherapie z. B. gegenüber Myoblasten liegt in ihrer Pluripotenz, ihrer sekretorischen Aktivität und in ihren immunmodulatorischen Qualitäten. Außerdem ist die Donor Site Morbidity, also der körperliche Schaden, welcher durch die Gewinnung der Zellen entsteht, wesentlich geringer als bspw. bei einer Muskelbiopsie, welche für die Isolierung transplantierbarer Myoblasten notwendig ist.

Die Anzahl der Zellen, welche in der Arbeit **2.2** in den Muskel appliziert wurde, legten wir auf eine Million fest. Dies entsprach der Anzahl der mesenchymalen Stromazellen, die wir sicher nach 14 Tagen Kultivierung und Selektion über Plastikadhärenz generieren konnten. Außerdem ging die Anzahl konform mit der Menge der Myoblasten, welche auch in Experimenten anderer Gruppen in entweder Verletzungs- oder Dystrophie-modellen verwendet wurde. (105) Die Erkenntnislage zur idealen Anzahl der zu transplantierenden Zellen war selbst im Bereich der Studien zu mesenchymaler Stromazelltherapie bei Myokardischämien, welche im Feld der zellulär unterstützten Muskelregeneration sicherlich die bisher am tiefsten analysierte darstellt, unzureichend. Es existierten nur Vergleiche verschiedener Studien mit völlig unterschiedlichen experimentellen Set-Ups. Bei der Regeneration verletzter Skelettmuskulatur durch mesenchymale Stromazellen existierten wie oben beschrieben keine Daten bis auf eine Studie, in der BMDSCs in einer Fibrinmatrix in

einem Modell eines Schnitttraumas eingesetzt wurden. (106) Hier wurden $0,35 \times 10^6$ Zellen verwendet. Allerdings war die Regeneration der Tibialis anterior Muskeln durch das Trauma selbst nur zu einem geringen Ausmaß eingeschränkt, was die Aussagekraft der Studie reduziert.

Vor diesem Hintergrund konnte die ideale Zellzahl nicht auf Literaturbasis rekonstruiert werden. Auch war nicht ersichtlich, ob der Effekt der Zellen einem reinen Switch-on/Switch-off Prinzip folgt, oder mit der Menge der applizierten Zellen zunimmt.

Unsere Hypothese war, dass die funktionelle Regeneration der verletzten Muskeln mit der Anzahl der transplantierten Zellen korreliert. Wir führten deshalb folgende Studie durch, in der wir basierend auf dem oben beschriebenen Traumamodell ansteigende Mengen BMDSCs transplantierten und die Soleusmuskeln biomechanisch auswerteten.

2.4 Winkler T, von Roth P, Schumann MR, Sieland K, Stoltenburg-Didinger G, Taupitz M, Perka C, Duda GN, Matziolis G

In vivo Visualisierung lokal transplanteder mesenchymaler Stammzellen im schwer traumatisierten Skelettmuskel der Ratte

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;

<http://dx.doi.org/10.1089/tea.2007.0179>

Die Ergebnisse der Arbeit **2.3** bestätigten unsere Hypothese, dass eine größere Anzahl BMDSCs auch tatsächlich zu einer verbesserten Regeneration der posttraumatischen Muskelkraft führt. Wir sahen weiterhin, dass der Effektzuwachs bei einer über eine Million steigenden Zellzahl geringer wurde und auf einen Plateau-effekt zulief. Wir interpretierten dies mit der limitierten Nährstoffsituation im verletzten Muskel mit der Folge der Apoptose einer zunehmenden Anzahl transplanteder Zellen bei der Applikation höherer Zellzahlen.

Weiters analysierten wir die BMDSCs auf typische MSC-Marker und fanden, dass über 90% der Zellen CD44+, CD73+, CD90+ und CD45- waren. Differenzierungsassays zeigten die Differenzierbarkeit der Zellen in osteogene und adipogene Zelltypen.

Nach dem Proof of Concept der BMDSC Transplantation bei Skelettmuskelverletzungen sowie der Beschreibung der Dosis-Wirkungsbeziehung wandten wir uns der Analyse des Verbleibs der Zellen im Muskel zu. Für die Detektion transplanteder Zellen unterschiedlicher Herkunft existiert eine Anzahl verschiedener Methoden, die sich prinzipiell in die Kategorie eines ex vivo und in vivo Trackings unterteilen lassen. Allen Methoden gemein ist die Markierung der Zellen prae transplantationem. Der Nachteil der ex vivo Methoden, unter ihnen die Markierung der Zellen durch instabile, temporäre Marker wie bspw. Membranfarbstoffe oder stabile Marker wie bspw. durch Transduktion ins Genom integriertes Green Fluorescent Protein (GFP), liegt in der auf den Moment der Explantation des Muskels limitierten Beobachtung. Der Vorteil ist die exakte topographische Zuordenbarkeit des Markers und der Zelle. Bezüglich der GFP-Markierung siehe auch weiter unten in der Arbeit 2.5. (107) Unter den in vivo Methoden kommt z. B. die Transduktion der Zellen mit Luciferase und die Detektion der durch die Zellen abgegebenen Photonen nach Oxidierung von injiziertem Luciferin in Frage, welche allerdings dem Problem des Summationseffektes

des Signals unterworfen ist. Eine Möglichkeit der Zelldetektion, welche eine hohe dreidimensionale räumliche Auflösung bietet, ist die Markierung der Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln und die Analyse der Muskeln per MRT. Erste sehr vielversprechende Arbeiten zu dieser Methodik hatten gezeigt, dass ein echtes Tracking transplantierte Zellen im Zentralnervensystem möglich ist. Eine Arbeit zeigte einen Nachweis neuronaler Progenitorzellen über sechs Wochen im Gehirn sowie deren Wanderung vom Injektionsort zum Läsionsort. (108) Die Grundlage der Methodik besteht in einer Störung des in einem MRT angelegten Magnetfeldes durch den Eisenkern der paramagnetischen Nanopartikel. Die Relaxationszeit wird dadurch verkürzt und die Partikel können durch eine Verminderung des Signals detektiert werden. Ein weiterer Vorteil der Methodik besteht darin, dass im Anschluss an die *in vivo* Beobachtung die Partikel *ex vivo* mit einer Berliner Blau Färbung histologisch detektiert werden können.

In der folgenden Arbeit untersuchten wir die Hypothese, dass sich die von uns verwendeten Ratten BMDSCs mit Eisenoxidnanopartikeln markieren und nach Transplantation in einen traumatisierten Skelettmuskel mittels MRT im Zeitverlauf detektieren lassen.

Wir verwendeten für diesen Versuchsaufbau VSOPs (very small iron oxid particles), welche durch eine dünne Citrathülle eine Größe von nur 9 nm besitzen und eine sehr gute biologische Verträglichkeit aufweisen. Eine Aufnahme in verschiedene Zellen gelingt bei diesen Partikeln ohne additive Substanzen und die toxikologischen Eigenschaften der Partikel sind sehr gut. Des Weiteren konnten wir mittels eines 7-Tesla Kleintier-MRTs die Versuche mit einer hochauflösenden Messung durchführen.

2.5 Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda GN, Perka C.

Sofortige und späte Transplantation von mesenchymalen Stammzellen führt zu einer Verbesserung der Kontraktionskraft nach Skelettmuskelverletzung in Ratten

Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats.

J Tissue Eng Regen Med. 2012 Dec;6 Suppl 3:s60-7;

<http://dx.doi.org/10.1002/term.1542>

Arbeit **2.4** brachte uns mehrere interessante Erkenntnisse. Eine der einfachsten aber pragmatischsten Punkte war die erstmalig mögliche Ergebniskontrolle der Transplantation. Wir führten alle Transplantationen zwar offen über einen kurzen Hautschnitt durch und konnten dadurch eine bessere Kontrolle gewährleisten als bei einer perkutan durchgeführten Injektion, allerdings konnten wir bis zum Zeitpunkt dieses Experiments keine Aussage über die genaue Lokalisation der Zellen im Muskel post transplantationem treffen. Der Fall der fälschlicherweise in die Peronealmuskulatur injizierten Zellen zeigte uns auf, dass selbst das offene Vorgehen nicht unfehlbar ist und führte uns zu einer noch exakteren Präparation des Muskels bei der Transplantation in späteren Versuchen. Interessant war weiter, dass die Zellen einen distinkten Pool nach der Transplantation bildeten und eine Verteilung im Muskel nur entlang des Nadelkanals stattfand.

Eine Detektion der MSCs gelang auch in der Langzeitbeobachtung über sechs Wochen – eine Migration der Zellen fanden wir auch in diesem Zeitraum nicht, was wir unter anderem auf den fibrotischen Umbau der Muskeln sieben Tage nach Trauma zurückführten. In den Muskeln fanden wir einzelne Fusionsereignisse der transplantierten MSCs mit regenerierenden Muskelfasern als Hinweis darauf, dass ein Beitrag der transplantierten Zellen zu kontraktile Muskelsubstanz zumindest teilweise an ihrem Effekt beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend waren alle diese Erkenntnisse wegbereitend für folgende Arbeiten. Die Limitation der Nanopartikeln liegt sicherlich vor allem in der Tatsache, dass die Markierung unspezifisch ist und eine exakte Identifikation der Zellen nur mittels einer Doppelmarkierung möglich ist. Deshalb etablierten wir für den nächsten Versuchsaufbau eine lentivirale Transduktion der autologen Ratten MSCs mit Green Fluorescent Protein (GFP), welches durch die Zellen stabil exprimiert wird und eine Detektion in histologischen Schnitten erlaubt.

In den bisherigen Versuchen transplantierten wir die MSCs sieben Tage nach Verletzung, weil wir davon ausgegangen waren, dass das unmittelbar posttraumatische Milieu dem Effekt der Zellen abträglich wäre. Neben den Abräumvorgängen des nekrotischen Materials in der frühen inflammatorischen Phase werden zu diesem Zeitpunkt jedoch auch wesentliche Schritte der Regeneration der verletzten Muskulatur, wie Gefäßneubildung, Reinnervation und Bildung neuer Muskelfasern eingeleitet. Außerdem ist für einen möglichen klinischen Einsatz der Zelltherapie eine Applikation der Zellen unmittelbar nach der Verletzung wünschenswert. Dies gilt bspw. für elektive Operationen, die mit einer zugangsbedingten Muskelverletzung einhergehen und in einem Eingriff behandelt werden könnten. Im Falle des Einsatzes allogener Zellen könnte das Spektrum auch auf akute Verletzungen ausgedehnt werden. Vor dem Hintergrund, dass zum idealen Transplantationszeitpunkt keine Studien in der Literatur existierten, die Kenntnis desselben aber für die klinische Translation, wie oben beschrieben, unabdingbar ist, planten wir folgenden Versuchsaufbau, in dem wir die funktionelle Regeneration nach unmittelbarer und später Transplantation untersuchten.

Unsere Hypothese war, dass die unmittelbare Transplantation der späten aufgrund des inflammatorischen intramuskulären Milieus in der Frühphase nach Traumatisierung unterlegen ist.

Gemäß unserer Vorarbeiten zur Dosis-Wirkungsbeziehung verwendeten wir in den folgenden Versuchen 2 bis $2,5 \times 10^6$ MSCs pro Transplantation. Die MSCs wurden lentiviral mit GFP transduziert und vier Wochen nach Verletzung in den Schnitten detektiert.

2.6 von Roth P, Duda GN, Radojewski P, Preininger B, Perka C, Winkler T

Mesenchymale Stammzelltherapie nach Skelettmuskeltrauma führt zu einer verbesserten Regeneration in männlichen und weiblichen Ratten

Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats

Gend Med. 2012 Apr;9(2):129-36

<http://dx.doi.org/10.1016/j.genm.2012.01.007>

Überraschenderweise stellten wir in der Studie **2.5** fest, dass auch eine unmittelbare Transplantation autologer MSCs zu einem Kraftzuwachs im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Trauma führte. In unserer initialen Hypothese waren wir davon ausgegangen, dass das frühe posttraumatische Milieu dem Effekt der Zellen entgegenstehen würde. Dass dies offenbar nicht der Fall ist, führten wir zumindest anteilig auf die bekannten immunmodulatorischen Eigenschaften der MSCs zurück. Interessant war hierbei auch, dass wir in den unmittelbar transplantierten Muskeln mehr GFP+ MSCs vorfanden als in den spät transplantierten, sodass man sogar ein dem Zell-Engraftment zugeneigtes Mikromilieu im frühen posttraumatischen Stadium diskutieren kann. Die Tatsache, dass die MSCs nur im Interstitium nahe regenerierenden Muskelfasern, Nerven und Blutgefäßen beobachtet wurden, unterstützte unsere bisherigen Erkenntnisse aus den Versuchen zum Nanopartikel-Labeling und weist erneut in die Richtung einer vorwiegend durch das Sekretom der MSCs verursachten Wirkung der Zellen. Wir analysierten des Weiteren die relativen Muskelfaserdurchmesser nach Regeneration und fanden, gemäß der natürlichen Heilung verletzter Skelettmuskulatur, eine Verschiebung zu kleineren Fasern. Die Therapie führte allerdings zu keiner Beeinflussung der Faserdicke. Als weitere mögliche Einflussfaktoren hinsichtlich der verbesserten funktionellen Regeneration wurden das Ausmaß der intramuskulären Fibrose sowie die Gefäßneubildung untersucht, da auf anderen Gebieten der experimentellen MSC Therapie wie z. B. bei chronischen Nierenerkrankungen diese Prozesse als Basis von Wirkmechanismen beschrieben worden waren (109, 110). Die charakteristischen Veränderungen der Muskulatur nach Verletzung konnten hierbei in allen Gruppen beobachten werden, ein Einfluss der transplantierten Zellen auf diese Faktoren fand sich jedoch nicht.

Nach der Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung sowie des Transplantationszeitpunktes wandten wir uns einem weiteren Aspekt der Zelltherapie zu, der Untersuchung des Effektes des Geschlechts auf die Wirkung der transplantierten Zellen. Basis dieser Studie waren Ergebnisse einer amerikanischen Arbeitsgruppe, welche einen Vorteil weiblicher Muscle-derived Stem Cells bei weiblichen mdx-Mäusen, also Tieren mit einem Modell der Muskeldystrophie Typ Duchenne, gezeigt hatten. (111) In Arbeiten unseres Labors wurde die Knochenheilung geschlechtsspezifisch untersucht und eine verbesserte Heilung bei männlichen Tieren beobachtet. (112) Im Bereich der MSC-Therapie bei Muskelverletzungen existierten keine Daten zu dieser Fragestellung, sodass wir das folgende Experiment planten, in dem wir die autologen Transplantationspaare $MSCs_{\text{männlich}}/\text{Tier}_{\text{männlich}}$ sowie $MSCs_{\text{weiblich}}/\text{Tier}_{\text{weiblich}}$ miteinander verglichen.

Unsere Hypothese war, dass die MSC-Therapie bei den weiblichen Tieren zu einem vermehrten Kraftzuwachs gegenüber der Kontrollgruppe im Vergleich zu den männlichen Tieren führen würde.

Die Ergebnisse zeigten, dass im Falle der MSC-Therapie im Crushtrauma kein Vorteil eines Geschlechts im Sinne einer verbesserten Muskelfunktion vorhanden ist. In den männlichen Tieren fanden sich zwar beim intergeschlechtlichen Vergleich der therapierten Gruppen eine größere Muskelfläche pro histologischem Schnitt und weniger Fibrose, eine Beeinflussung dieser Parameter durch die Zellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein deutlicher Effekt der Therapie auf die Kontraktionskraft der transplantierten Muskeln fand sich in beiden Versuchsgruppen.

Diskussion

Skelettmuskelverletzungen spielen in der klinischen Praxis eine überragende Rolle. Dies liegt zum einen an ihrer Häufigkeit, zum anderen an ihren Folgeerscheinungen mit ausgeprägten und oft auch schmerzhaften Funktionsstörungen. Die häufigsten Ursachen von Muskeltraumata sind unfallbedingte Schädigungen, hier allen voran Sportverletzungen, und iatrogene, zugangsbedingte Schädigungen der periartikulären Muskulatur bei Operationen am Bewegungsapparat. Das wesentliche Problem ist die in der Klinik nicht existente Therapiemöglichkeit zur Regeneration kontraktile Muskelgewebes.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, das klinische Problem durch die Etablierung eines neuen Traumamodells am Skelettmuskel der Ratte in ein experimentelles Set-Up zu übertragen. In den folgenden Studien konnte die Effizienz einer autologen Therapie mit Knochenmarks-assoziierten Zellen bei der funktionellen Regeneration verletzter Muskulatur nachgewiesen werden. Es wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung der applizierten Zellzahl mit der resultierenden Kontraktionskraft beschrieben, und die Zellen nach Markierung sowohl *in vivo* mittels MRT als auch *ex vivo* in histologischen Schnitten detektiert. Auf Basis eines in der Klinik wünschenswerten möglichst frühen Transplantationszeitpunktes wurde eine sofortige mit einer späten Transplantation verglichen und eine Gleichwertigkeit beider Anwendungsformen beobachtet. Ein Einfluss des Geschlechtes auf den Therapieeffekt konnte in einer weiteren experimentellen Studie ausgeschlossen werden.

Die Entwicklung neuer Therapieformen ist abhängig von Traumamodellen, welche die klinische Situation möglichst genau widerspiegeln. Gerade auch vor dem Hintergrund der zunehmenden stumpfen Muskeltraumata durch die vermehrte Anwendung vermeintlich minimalinvasiver operativer Verfahren wie in der Einleitung beschrieben, erfüllen Modelle mit den Charakteristika einer Quetschungsverletzung dieses Kriterium exzellent, jedoch in Abhängigkeit ihrer genauen Ausführung. *In vitro* Modelle sind in der Regel für die Darstellung der komplexen Situation vollkommen ungeeignet, da das Zusammenspiel von lokalen Regenerationsvorgängen, Inflammation sowie entscheidenden Faktoren wie Innervation und Durchblutung nicht *ex vivo* nachgeahmt werden können. (113) Da bisherige Tiermodelle entweder rein segmentale Quetschungen mit unterschiedlich großem Einfluss der verbleibenden Muskelfasern auf die Regeneration (80) oder Quetschungen des gesamten Muskels inklusive seiner Gefäß-/Nervenversorgung (81) beschrieben hatten, entschlossen wir uns, diese Schwächen zu adressieren. In der Arbeit **2.1** gelang uns dies, indem wir ein offenes

Crushtrauma des M. soleus etablierten - ein Muskel, der die für diesen Zweck optimale Eigenschaft besitzt, dass sich die myoneuralen Endplatten des innervierenden Nerven in einer umschriebenen Region im Bereich des mittleren Muskelbauches befinden und somit bei der Quetschung ausgespart werden konnten. Durch die Schonung der Hauptäste der zuführenden Gefäße sowie des Soleusnerven inklusive seiner Endplatten wurde verhindert, dass die Regeneration durch Denervierung oder globale Ischämie beeinträchtigt wurde. (82, 83) Ein weiterer Vorteil in der Schonung der Innervation war die Möglichkeit der Messung der Kontraktionskraft *in vivo*, die unter einer bipolaren Stimulation des N. ischiadicus durchgeführt wurde. Eine zusätzliche Crush-Verletzung des Nerven, welche zu intraneuraler Vernarbung und reduzierter Reizweiterleitung führt, hätte die Auswertung ebenfalls beeinträchtigt. (114) Die Schonung der Muskelfaszie durch die kontrollierte, stumpfe Traumatisierung erlaubte zudem die geplanten Versuche mit der lokalen Zelltransplantation, ohne dass das Outcome der Therapie durch ein Austreten der Zellsuspension verfälscht worden wäre.

Die exakten Mechanismen der Muskelfaserverletzung konnten in den histologischen Analysen als einerseits *Shearing-Type of Injury* (mechanische Separation), andererseits als *in-Situ-Necrosis-Type of Injury* (Nekrose nach Quetschung), identifiziert werden. Das durch die Verletzung stattfindende Aufsplitten der Muskelfasern und die Separation der Fasern aus ihrer Einbettung ins Endomysium konnten durch den Nachweis neuer myoneuraler Verbindungen dieser von der Nervenversorgung getrennten Fasern bzw. neu gebildeter myotendinöser Verbindungen beobachtet werden. Somit konnten wir histologisch zeigen, dass erstens das Traumamodell die wesentlichen Parameter einer Muskelfaserregeneration aufbot und zweitens eine Regeneration im gesamten Muskel getriggert wurde, welche auch den primär vom Trauma ausgesparten Bereich betraf. Dies konnte auch in den MR-tomographischen Aufnahmen bestätigt werden, die eine homogene Signalanhebung sowohl in der T1- als auch in der T2-Wichtung in den traumatisierten Muskeln zeigten.

Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf das Trauma sagen, dass ein maximales Trauma unter Erhalt der muskulären Kontinuität erzielt worden ist. Dies ist auch vor dem Hintergrund wesentlich, dass die Stärke des Traumas bestimmend für die Ausprägung und die Dauer der Regeneration ist. (115)

Die Pionierarbeiten der Arbeitsgruppen von Ferrari und Bittner zur Transplantation von Knochenmarkszellen in entweder toxisch geschädigte oder in chronischem Regenerationsprozess befindliche Muskulatur zeigten die Möglichkeiten des Einsatzes dieser

Zellen in der Muskelheilung auf, waren aber rein deskriptive Studien ohne Analyse der funktionellen Konsequenz der Beobachtungen. Gerade Skelettmuskulatur muss aber immer auch auf der Ebene der Funktion beschrieben werden, da im Gegensatz z. B. zum Knochen die Mikro- und Makromorphologie nicht unmittelbar auf den funktionellen Outcome schließen lässt. Ein Knochen, dessen Mineralsalzgehalt vermindert ist, kann, so andere morphologische Parameter, wie die Kollagenstruktur, nicht grob pathologisch sind, bezüglich seiner statischen Fähigkeiten und auch seines statischen Versagens sehr gut eingeschätzt werden. Dies gilt für erkrankten Muskel nicht. Multiple Faktoren, wie bspw. die Ankopplung separierter Muskelfasern an die kraftübertragenden Elemente und die Reizleitung, die Ausrichtung neu gebildeter Fasern, die Art und das Ausmaß der Fibrose und der Zustand der Energiespeicher des Muskels spielen hier wesentliche Rollen (116-118), die kaum in ein mathematisches Modell zur Berechnung der Kraft verletzter Muskulatur eingeordnet werden können. Dies spiegelt sich auch in zahlreichen Finite-Elemente-Modellen der Knochenheilung in allen Ausprägungen wider bei gleichzeitiger Abwesenheit solcher Modelle für pathologisch veränderte Muskulatur.

Dies führt dazu, dass eine Evaluation postuliert überlegener Therapieformen im Muskel nur über eine funktionelle Analyse laufen kann, und die morphologische Beschreibung allenfalls eine Unterstützung derselben liefern sollte, im Sinne der Aufdeckung von Mechanismen eines gegebenenfalls vorgefundenen Effektes.

Zur Therapie eines verletzten Skelettmuskels mittels Knochenmarkszellen war zum Zeitpunkt unserer initialen Arbeit **2.2** nur eine Studie publiziert, welche auch eine funktionelle Auswertung in die Evaluation miteinbezog. In dieser Studie transplantierten Natsu et al. mesenchymale Knochenmarkszellen in einen Defekt im M. tibialis anterior der Ratte. Die transgenen GFP-positiven Zellen wurden dabei in einer Fibrinmatrix transplantiert. Trotz der umfangreichen Analyse der Muskeln muss an dieser Studie vor allem kritisiert werden, dass auch die nicht oder nur mit Fibrinmatrix behandelten Gruppen eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Kontraktionskraft zeigten. Auch die Applikation der Zellen in einer Fibrinmatrix, welche aus einem herkömmlichen Fibrinkleber bestand, ohne einer in vitro Testung der Zellvitalität in dem Konstrukt, scheint problematisch. Tatsächlich konnten vitale Zellen post transplantationem nur im Randbereich der Matrix vorgefunden werden.

Somit wiesen wir in unserer Arbeit **2.2** erstmalig nach, dass die lokale Transplantation von Knochenmarkszellen nach einem Skelettmuskeltrauma tatsächlich zu einer Verbesserung der Kontraktionskraft in beiden verwendeten Stimulationsmodi, sowohl bei kurzem Zucken (fast

twitch) als auch bei einer tetanischen Stimulation über 3 Sekunden, führt. Effekte durch eine Matrix konnten durch die Applikation der Zellen in einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung ausgeschlossen werden.

In einer Arbeit, die als Basis ein Kryotrauma am Skelettmuskel von Mäusen verwendete, waren wie in den in der Einleitung diskutierten Myopathiemodellen Myoblasten, also Muskelvorläuferzellen injiziert worden und ein Kraftzuwachs detektiert worden. (105) Irintchev et al. fanden heraus, dass dies nur bei einem schweren Trauma der Fall war. Wenn die Zellen in einen leicht verletzten Muskel injiziert worden waren, war kein Effekt zu beobachten. Sie schlussfolgerten daraus, dass nur, wenn – wie beim schweren Kryotrauma – der Satellitenzellpool depletiert ist, die Myoblasten auch deren Position einnehmen können und zu regenerierenden Muskelfasern beitragen können. Ob dies auch bei der Therapie mit Knochenmarkszellen der Fall ist, haben wir nicht untersucht. Theoretisch ist es daher auch möglich, dass eine leichtere Ausprägung des Traumas zu einem verringerten Effekt der Zellen führt. Dass transplantierte Zellen einen wie auch immer gearteten Regenerationsreiz im Muskel (wie auch in anderen Geweben) brauchen, konnte durch mehrere Arbeiten bestätigt werden. (50, 119, 120) Die Applikation der Zellen in einen gesunden Muskel führt zu keinem Therapieeffekt. Dass auch der natürliche Turn-Over einen Regenerationsreiz darstellt, wenn auch in geringem Ausmaß, zeigte eine Arbeit, in der bei Mäusen eine transgene GFP-positive Knochenmarkstransplantation durchgeführt wurde und Muskeln nach 16 Monaten einen geringen Anteil an Engraftment von Knochenmarkszellen ubiquitär in der Muskulatur zeigten.

Bezüglich der idealen Anzahl von Knochenmarkszellen, welche den größten funktionellen Benefit nach Skelettmuskeltrauma und lokaler Transplantation aufwies, existierten keinerlei Studien. Auch im Bereich der zellulär unterstützten Regeneration von Myokard, der bereits mehrere klinische Studien mit verschiedenen Zelltypen hervorgebracht hatte, waren nur wenige experimentellen Dosisfindungsstudien durchgeführt worden. Eine Studie, welche hierbei die Transplantation von Myoblasten in einem Infarktmodell in Ratten untersuchte, fand eine ähnliche Korrelation der applizierten Zellzahl mit Funktionsparametern der myokardialen Pumpfunktion wie des Fractional Area Change (FAC) als Surrogat der Ejektionsfraktion. (121) Die Gruppe injizierte von 5×10^5 bis 5×10^7 Myoblasten in ischämisches Myokard und erhielt die größte postinterventionelle Steigerung der FAC mit der höchsten applizierten Zellzahl, allerdings, wie in unserem Versuchsansatz, bereits auf einen Plateaueffekt hinstuernd. Dazu muss jedoch gesagt werden, dass die Situation im ischämischen Herzen nur sehr eingeschränkt auf diejenige im traumatisierten Skelettmuskel

übertragen werden kann, und auch der Mechanismus der Regeneration mit determinierten Vorläuferzellen, die vorwiegend durch Differenzierungsprozesse wirken, nach unseren Ergebnissen und der Literaturlage ein sehr unterschiedlicher zum Wirkmechanismus mesenchymaler Stammzellen ist. Deshalb war es umso wesentlicher, im eigenen Modell die ideale Zellzahl zu determinieren. Wir legten diese in den der Dosisfindungsstudie folgenden Experimenten bei 2 bis $2,5 \times 10^6$ fest. Die Ratio war der über dieser Zellzahl beobachtete nur mehr geringe Zuwachs an Kontraktionskraft in Relation zur Zellzahlsteigerung. Wir schlossen aus unseren Ergebnissen, dass dieser auf eine relative Unterversorgung der Zellen bei größerer Anzahl zurückzuführen war. Dies war auch gestützt auf Erkenntnisse aus Experimenten mit Myoblasten, bei denen gezeigt werden konnte, dass es in der Mitte großer Poole transplantiertes Zellen zu ischämischen Nekrosen kommt. (122)

Als weitere mögliche Ursache der biologischen Sättigung der Dosis-Wirkungskurve muss die auch in der Arbeit **2.1** beschriebene interstitielle sowie fokale Fibrosierung diskutiert werden, welche durch die Transplantation mesenchymaler Stammzellen keine Verringerung erfährt. Dies konnten wir in den Arbeiten **2.5** und **2.6** zeigen.

Bei der Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung im kleineren Zellzahlbereich zeigte sich, dass unterhalb von 1×10^6 MSCs der Effekt der Transplantation stark abnimmt, sodass wir die im ersten Versuch verwendete Zellzahl als unterste sinnvolle Grenze im verwendeten Modell ansehen.

Bei der Untersuchung der möglichen Mechanismen der Wirkung der mesenchymalen Stammzelltherapie im Skelettmuskeltrauma steht an erster Stelle die Frage nach dem Verhalten der Zellen nach Transplantation im Muskel. Wir konnten für diese Fragestellung eine Markierung der Ratten-MSCs mit Eisenoxid-Nanopartikeln (very small iron oxide nanoparticles, VSOP) etablieren und die Zellen in vivo bis zu einem Zeitraum von sechs Wochen verfolgen.

Eine Migration der Zellen im Muskel konnten wir in dieser Arbeit (**2.4**) nicht detektieren. Dies steht im vordergründigen Widerspruch zu einer rezenten Publikation von de la Garza-Rodea et al., die humane MSCs in einen Cardiotoxin-geschädigten M. tibialis anterior von immundefizienten Mäusen transplantierten und zum einen einen bis zu 5 %-igen Anteil an hybriden (human-murin) Muskelfasern nach vier Monaten nachwies, zum anderen eine Migration der Zellen im Muskel postulierten. (123) Bei Letzterem muss gesagt werden, dass die Analyse rein ex vivo auf histologischen Schnitten durchgeführt wurde und somit eine

Aussage bezüglich der Migration von Zellen vorsichtig zu bewerten ist. Allerdings wäre eine bessere primäre intramuskuläre Verteilung der Zellen bei Injektion 24 Stunden nach Cardiotoxinschädigung im Vergleich zu einer Injektion eine Woche nach einem Crushtrauma auch schlüssig, da Cardiotoxin zu einer Myolyse, also einer Nekrose der Muskelfasern unter Erhalt der Satellitenzellen, Blutgefäße und myoneuralen Verbindungen führt und es mit der Zeit zu einer Restitutio ad Integrum kommt. Die Zellen wurden hier also in einen nekrotischen Muskel mit „aufgelöster“ Struktur injiziert, was einer Verbreitung der Zellen entgegenkommt. Bei einem mechanischen Muskeltrauma kommt es hingegen immer schon in frühen Phasen zur Ausbildung von kollagenem Bindegewebe, das sich über die Zeit verdichtet und, wie in 2.2 beschrieben, im Crushtrauma auch noch nach acht Wochen ein Viertel der Muskulatur einnimmt. Diese Fibrose stellt für regenerierende Muskelfasern und Nervenendigungen eine manchmal unüberwindliche Barriere dar (124) und ist damit auch sicherlich für transplantierte Zellen ein Umstand, der eine Migration der Zellen im Muskel verhindern kann.

Durch eine Berliner Blau (Eisen-Hexacyanoferrat) Färbung, die es erlaubte, die Nanopartikel zu detektieren, konnten wir die MSCs in den explantierten Muskeln nachweisen und die Lokalisation der Zellen mit dem MRT Signal korrelieren. Hierbei gelang es uns auch, Fusionen der Zellen mit regenerierenden Muskelfasern zu beobachten. Dass in geschädigte Muskulatur transplantierte MSCs auch durch Differenzierung und Fusion mit Muskelfasern zur Regeneration beitragen können wurde auch in anderen Arbeiten bestätigt, unter anderem für MSCs aus der Synovialmembran (125) oder, wie oben diskutiert, aus dem Knochenmark (123). Allerdings muss angeführt werden, dass wir diese Fusionen nur in sehr geringer Anzahl beobachten konnten. Auch nachfolgende Experimente mit GFP-positiven MSCs, welche in 2.5 beschrieben wurden, mit der Detektion transplantiertter Zellen im Interstitium der traumatisierten Muskeln ohne direkte Hinweise auf Fusionen, ließen uns schließen, dass dieser Mechanismus im untersuchten Traumamodell nur zu einem geringen Teil zur Wirkung der MSCs in der funktionellen Regeneration beiträgt. Dies wird auch durch eine rezente Studie gestützt, in welcher nach einem Schnitttrauma im Soleusmuskel der Ratte aus dem Fettgewebe isolierte MSCs transplantiert wurden. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Kontraktionskraft gegenüber der Kontrollgruppe, war allerdings nicht von einer Beteiligung der Zellen an regenerierenden Fasern begleitet. (126)

Parallel zu diesen Beobachtungen fanden wir über die Zeit ein rasches Abnehmen des Volumens der Zellpools in der MRT, welches auch mit der Detektion einer nur geringen

Anzahl an Zellen ex vivo korrelierte. Wir werteten dies als einen Hinweis auf die auch bei der autologen Transplantation stattfindenden inflammatorischen Prozesse, welche neben der bei Zelltransplantationen immer initial vorhandenen Nekrose und Apoptose eines Teils der Zellen (127) zu einer Reduktion der injizierten Zellen führten.

Auch auf Basis mehrerer starker Hinweise, dass Inflammation nicht nur deletär für das Zelltransplantat ist, sondern im Gegenteil einen wesentlichen Partner bei regenerativen Prozessen darstellt (128, 129), analysierten wir in der Arbeit **2.5** die Wirksamkeit einer sofortigen Transplantation autologer MSCs gegenüber der späten nach muskulärem Crushtrauma. Dies bedeutete in ersterem Fall die Transplantation der Zellen in eine Umgebung, die von Abräumvorgängen und dem Einstrom inflammatorischer Zellen geprägt war. (54) Überraschenderweise kamen wir zu dem Ergebnis einer Gleichwertigkeit beider Therapiemodi.

Die Erkenntnis, dass auch eine Transplantation unmittelbar nach Trauma zu einer funktionellen Verbesserung führt, ist von eminenter Wichtigkeit für perspektivische klinische Anwendungen. Dies gilt sowohl für unfallbedingte Verletzungen als auch für iatrogene Muskeltraumata, die beide von einer sofortigen Therapie profitieren würden. Im Falle der unfallbedingten Verletzungen würde diese Therapiemöglichkeit natürlich nur durch die Verwendung allogener Zellen in Frage kommen, da die Selektion körpereigener, also autologer Zellen zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde.

Bei beiden Transplantationsmodi, also unmittelbar und spät, konnten wir durch eine lentivirale Transduktion GFP exprimierende MSCs nachweisen. Wie bereits im oberen Abschnitt diskutiert, fanden wir die Zellen vor allem im Interstitium des Muskels. Für die Rekrutierung von Zellen zur Integration in regenerierende Muskelfasern ist die Phase unmittelbar nach der Schädigung der Faser vor dem Hintergrund der Literatur als zuträglich zu bewerten. Dies zeigen Arbeiten, die die Fusion von Myoblasten mit im Stichkanal verletzten Muskelfasern nachwiesen (130), sowie die oben erwähnten Arbeiten mit der Beschreibung der Integration von MSCs bei Transplantation 24 Stunden nach Cardiotoxin-Myolyse (123, 125). Selbst in diesen Publikationen erreichte der Beitrag transplanteder MSCs kein Ausmaß, das eine Verbesserung der funktionellen Regeneration, wie in unseren Arbeiten beobachtet, erklären würde. Wir gehen davon aus, dass der Hauptmechanismus des Effektes mesenchymaler Stammzelltherapie in der lokalen Interaktion der Zellen mit Muskel-, Bindegewebs- und Immunzellen vor allem über ihre sekretorische Leistung zu suchen ist. Die

Rolle der MSCs als Modulatoren von regenerativen Vorgängen wurde erst im Laufe der Zeit erkannt und wissenschaftlich aufgearbeitet. Neueste immunologische Erkenntnisse dazu sehen die mesenchymale Stammzelle sogar in einer zweistufigen Funktion, mit dem Potential, als Reaktion auf einen pathogenen Stimulus zunächst die Immunreaktion selektiv zu fördern, um das Aufräumen des Pathogens zu unterstützen und die daraufhin folgende Immunreaktion zu supprimieren und damit den Sekundärschaden zu vermindern. (92) Weitere Arbeiten, welche die Wirkmechanismen der MSC-Transplantation in ischämischem Myokard untersuchten, unterstützen ebenfalls die Hypothese des vorwiegend parakrinen Effektes der Zellen im Zielgewebe. (131, 132) MSCs greifen hierbei neben der Immunmodulation auf mehreren Ebenen in das regenerative Geschehen ein. Hinweise existieren auf die Beeinflussung der lokalen Bindegewebsbildung (133, 134), der Angiogenese (135), der Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit sowie der Apoptose von Zellen im Zielgewebe. (136)

Besonders Arbeiten, die die regenerative Potenz von durch MSCs konditioniertem Medium nachwiesen, unterstreichen die Bedeutung des Mechanismus der Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren in der Wirkung von MSCs. (135, 137)

Bei der histologischen und histomorphometrischen Analyse unserer Muskelschnitte aus der Arbeit **2.5** konzentrierten wir uns auf die Parameter Fibrose und Gefäßdichte. Hierbei konnten wir in beiden Fällen keinen Einfluss der MSC-Therapie nachweisen.

Die Gefäßneubildung ist sicherlich in der Entität der Skelettmuskelverletzung verglichen mit ischämischen Schädigungsmechanismen von untergeordneterer Bedeutung. Von MSCs wissen wir, dass sie auf Hypoxie mit der Sekretion proangiogener Proteine, wie VEGF, reagieren. (138, 139) Vermutlich ist das völlig differente und hypoxische Milieu, in das die Zellen bei Gewebeischämien transplantiert werden, auch die unmittelbare Ursache für die dort getriggerte Angiogenese.

In Arbeit **2.6**, in der wir untersuchten, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der MSC-unterstützten Muskelregeneration gibt, konnten wir bestätigen, dass bei Effizienz der Therapie in beiden Geschlechtern kein Einfluss auf die Fibroseentwicklung vorliegt. Das Ergebnis, dass ein mechanisches Trauma bei männlichen Tieren zu einer signifikant geringer ausgeprägten Fibrose führt, war bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Die sich nach einem extensiven Muskeltrauma entwickelnde Fibrose hat für die

Muskelfunktion zweierlei Bedeutung. Zum einen füllt sie als Ersatzgewebe die Lücken, die durch den Untergang von Muskelfasern entstanden sind und erlaubt eine wenigstens passive Übertragung der generierten Kontraktionskräfte, zum anderen bleibt sie als Bindegewebsnarbe stabil und verhindert in ihrem Bereich die Neubildung von kontraktilem Muskelgewebe. Eine „ideale“ Therapie bei Skelettmuskelverletzungen in Bezug auf die Fibrosierung würde also in der Frühphase die Bildung von kollagenem Bindegewebe fördern, um die rasche Belastbarkeit des Muskels wiederherzustellen und danach einen Umbau der Fibroseareale in kontraktiles Gewebe unterstützen. Perspektivisch wird die Behandlung der Fibrose bei Skelettmuskelverletzungen sicherlich eine Schlüsselrolle weiterer experimenteller Arbeiten spielen. Bisherige Ansätze konnten mit TGF-beta Antagonisten wie Suramin (140) oder indirekt auch Decorin (141) zu einer leichten Reduktion der posttraumatischen Fibrose, z. B. im Schnittmodell führen, ein Durchbruch ist hierbei jedoch sicherlich noch nicht erreicht. Vielleicht kann die Transplantation gentechnisch veränderter Zellen hier in Zukunft einen Lösungsansatz darstellen. (142) Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz findet sich in der Entwicklung intelligenter Matrices, welche einerseits eine optimale Umgebung für transplantierte Zellen bereitet, andererseits Wachstumsfaktoren oder z. B. antifibrotische Substanzen bindet und durch eine kontrollierte Freisetzungskinetik an die Zielumgebung abgibt. (143)

4 Zusammenfassung und Ausblick

Vor dem Hintergrund, dass wir im klinischen Bereich derzeit über keine Therapie verfügen, die es uns erlaubt, geschädigte Skelettmuskulatur wiederherzustellen, ist die Entwicklung neuer regenerativer Therapieformen von eminenter Bedeutung.

Die Konsequenz von Skelettmuskelverletzungen für die betroffenen Patienten kann in Abhängigkeit des Ausmaßes und der geschädigten Muskelgruppe viele Formen annehmen, beginnend von einer temporären Funktionseinschränkung bis hin zu lebenslanger Invalidität. Die Ursachen finden sich am Anfang dieses Spektrums vor allem im Bereich der Sportunfälle und am Ende in den schwerwiegenden Weichteilschäden bei Komplexverletzungen nach Hochrasanztraumata. Eine in ihrer klinischen Bedeutung bislang unterschätzte Problematik liegt in der iatrogenen Traumatisierung periartikulärer Muskulatur bei operativen Eingriffen am Bewegungsapparat. Diese limitiert den Operationserfolg durch die Beeinträchtigung der muskulären Stabilisierung, Koordination und Protektion betroffener Gelenke. Die Entwicklung minimalinvasiver Zugänge konnte in einigen Bereichen, wie der Wirbelsäulen Chirurgie, die postoperativen Funktionsstörungen mildern, oft wurde der Schaden an der periartikulären Muskulatur jedoch nur maskiert und auf andere Schädigungsmechanismen oder Muskelgruppen verschoben. Aktuelle Therapiemöglichkeiten bei Skelettmuskelverletzungen beschränken sich auf rein schadensbegrenzende Maßnahmen und bei schwerer Ausprägung auf umfangreiche Rekonstruktionen mittels Lappenplastiken, welche selten zu funktionellen Verbesserungen führen. Was in der klinischen Praxis dringend benötigt wird, ist ein Therapieansatz, der es erlaubt, die intrinsische Regeneration verletzter Skelettmuskulatur zu unterstützen und damit posttraumatische Funktionsstörungen zu verhindern und zu therapieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmalig den Nachweis einer verbesserten funktionellen Regeneration durch die Transplantation autologer mesenchymaler Stammzellen nach einem Skelettmuskeltrauma erbringen. Für die Untersuchung dieser neuen Therapieform mussten wir zunächst ein kliniknahes, möglichst selektives Muskeltrauma etablieren. Dies konnten wir in einem Crushtraumamodell des Musculus soleus der Ratte realisieren. Hochinteressant war die Tatsache, dass die Kontraktionskraft des traumatisierten Soleusmuskels mit der Transplantation einer steigenden Anzahl von MSCs im Sinne einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung zunahm. Das in allen Transplantations- und Therapiemodi residuelle Kraftdefizit, das sich auch unabhängig vom Geschlecht zeigte, führen wir vor allem

auf die posttraumatische Fibrose zurück, die durch die MSCs nicht beeinflusst wurde. Die in vivo-Detektion von Nanopartikel-markierten MSCs mittels 7-Tesla MRT zeigte, dass die Zellen nach Transplantation in den Muskel nicht migrieren. Als Hinweis für einen Anteil am Wirkmechanismus fanden wir Fusionen der transplantierten Zellen mit regenerierenden Muskelfasern. Dass der Hauptmechanismus allerdings vor allem in der sekretorischen Potenz der MSCs und ihrer Interaktion mit dem Zielgewebe liegt, wurde in einer Arbeit bestätigt, in der wir GFP-transduzierte Zellen unmittelbar und sieben Tage nach dem Trauma transplantierten. Trotz des unterschiedlichen Mikromilieus im Muskel zum jeweiligen Zeitpunkt führten beide Transplantationsmodi zu einer vergleichbaren Verbesserung der Kontraktionskraft bei einer vorwiegend interstitiellen Lage der Zellen in den entnommenen Muskeln.

Die Mechanismen hinter der Wirkung der MSCs dürften multifaktorieller Natur sein und ihren Ausgang in der direkten und indirekten Interaktion der Zellen mit ihrer Zielumgebung haben. Dies analysieren wir gegenwärtig in einem experimentellen Ansatz, in dem wir das interstitielle Milieu des Muskels vor und nach MSC Transplantation mit Hilfe der Mikrodialyse untersuchen. In Kombination mit der MALDI- (Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation) Massenspektrometrie, die eine genaue örtliche Auflösung der im Muskel nach Trauma exprimierten Proteine erlaubt, erwarten wir uns hierbei Aussagen über die durch die MSCs ausgelösten Veränderungen im Mikromilieu.

Zusammenfassend stellt die Transplantation von MSCs im Skelettmuskeltrauma ein sehr vielversprechendes neues Therapiekonzept dar, das das Potential hat, die momentanen Behandlungsstrategien zu ergänzen oder zu ersetzen. Schon jetzt zeichnet sich ab, dass zukünftige therapeutische Ansätze in der operativen Orthopädie und Traumatologie vermehrt „biologisiert“ sein werden. Das heißt, dass aufgrund des besseren Verständnisses der natürlichen Heilungsvorgänge sowie deren Beeinflussbarkeit Therapeutika wie Zellen oder Wachstumsfaktoren als Additiva zu konventionellen Verfahren eingesetzt werden. Ein bereits gängiges Konzept ist hierbei z. B. der Einsatz von BMP (Bone Morphogenetic Protein) in der Pseudarthrosenchirurgie.

Im Falle der zugangsbedingten iatrogenen Muskelverletzung ist ein additiver Einsatz der Zelltherapie zur Prävention postoperativer Muskelfunktionsstörungen zusätzlich zu Indexoperationen wie Endoprothesenimplantationen oder Osteosynthesen denkbar. Bei traumatischen Muskelverletzungen kann der Einsatz von Zellen perspektivisch sowohl konservative als auch operative Maßnahmen begleiten oder ersetzen und erstmals die

intrinsische Muskelheilung endogen unterstützen.

Bei der Behandlung von Muskeldefekten, welche als Residuen posttraumatisch oder postoperativ verbleiben, kann vor allem die matrixassoziierte Zelltherapie zukünftig einen wichtigen Platz einnehmen. Eine Idealvorstellung wären hierbei Komposits, die initial eine rasche Lastübertragung gewährleisten und die Narbenbildung im Defekt verhindern und sekundär den Umbau zu kontraktiver Muskelsubstanz erlauben. In einem aktuellen Versuch analysieren wir diesbezüglich die therapeutische Einsetzbarkeit eines Komposits aus Alginatmatrix, MSCs und den Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1.

Der Benefit der nicht-matrixassoziierten Zelltherapie liegt vor allem in der Prävention der Defektheilung. Hierbei werden autologe Zellen eher in den Hintergrund treten, da die Qualität der Zellen, wie bei alten Patienten, oft schlecht ist, ihre Menge limitiert ist und ihre Kultivierung Zeit braucht, was bei den meisten Therapieformen ihren Einsatz vereitelt.

Aus diesen Überlegungen führten wir einen noch nicht publizierten Versuch mit dem Einsatz allogener mesenchymaler Zellen mit den Charakteristika von MSCs, welche aus dem maternalen Anteil von Plazenten isoliert wurden, in unserem Traumamodell durch und konnten eine den autologen MSCs äquivalente Wirkung in Bezug auf die Kontraktionskraft der therapierten Muskeln beobachten. Wie in einer rezenten histologischen Analyse der autolog therapierten Muskeln, fanden wir Hinweise auf eine Verschiebung des Verhältnisses der Muskelfasertypen zugunsten der schnellen Fasern als einen möglichen Wirkmechanismus.

Nachdem dieser allogene Zelltyp auch überzeugende in vitro-Eigenschaften, ähnlich derer von MSCs, aufweist und bereits umfangreiche Daten aus Studien zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit vorlagen, planten wir eine Humanstudie der Phase I/II zur allogenen Transplantation der Plazentazellen in den bei der Implantation einer Hüftendoprothese geschädigten M. gluteus medius. Diese Studie wurde nach Prüfung durch das Paul Ehrlich Institut und die Ethikkommission des Landes bewilligt und befindet sich aktuell in der Durchführung. Ziel ist hierbei die Prävention der funktionellen Einschränkungen der Beckenstabilisierung und damit des Gangbildes sowie der Destabilisierung des Gelenkes durch den iatrogenen Muskelschaden. Sollte eine Translation der experimentellen Ergebnisse mit einer Verbesserung der Muskelfunktion im Patienten gelingen, so kann dies als ein Durchbruch in der Therapie von Skelettmuskelverletzungen angesehen werden.

Somit konnten wir die mesenchymale Zelltherapie im Skelettmuskeltrauma vom experimentellen Ansatz in die Klinik überführen. Wir sind uns im Klaren darüber, dass noch wesentliche Punkte gerade in Bezug auf den Wirkmechanismus der Zellen aufgearbeitet werden müssen. Aber es steht zu hoffen, dass wir einen entscheidenden Schritt in Richtung einer echten Prävention der deletären Folgen von Skelettmuskelverletzungen getan haben.

5 Abkürzungsverzeichnis

ACP	autolog konditioniertes Plasma
BMDSCs	Bone Marrow-derived Stromal cells, knochenmarksassoziierte Stromazellen
BMP	Bone Morphogenetic Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
LISS	Less Invasive Stabilisation System
M.	Musculus
MALDI-MS	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie
MDSCs	Muscle-derived Stem Cells, Muskel-assoziierte Stammzellen
Mm.	Musculi
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PRP	Plättchen-reiches Plasma
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

6 Literaturverzeichnis

1. Ekstrand J, Hagglund M, Walden M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *The American journal of sports medicine*. 2011;39(6):1226-32. Epub 2011/02/22.
2. Stevenson MR, Hamer P, Finch CF, Elliot B, Kresnow M. Sport, age, and sex specific incidence of sports injuries in Western Australia. *British journal of sports medicine*. 2000;34(3):188-94. Epub 2000/06/15.
3. Sell K, Hainline B, Yorio M, Kovacs M. Injury trend analysis from the US Open Tennis Championships between 1994 and 2009. *British journal of sports medicine*. 2012. Epub 2012/08/28.
4. Jancosko JJ, Kazanjian JE. Shoulder injuries in the throwing athlete. *The Physician and sportsmedicine*. 2012;40(1):84-90. Epub 2012/04/18.
5. Garrett WE, Jr. Muscle strain injuries. *The American journal of sports medicine*. 1996;24(6 Suppl):S2-8. Epub 1996/01/01.
6. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine*. 2005;33(5):745-64. Epub 2005/04/27.
7. Lopez V, Jr., Galano GJ, Black CM, Gupta AT, James DE, Kelleher KM, et al. Profile of an American amateur rugby union sevens series. *The American journal of sports medicine*. 2012;40(1):179-84. Epub 2011/11/22.
8. Feeley BT, Kennelly S, Barnes RP, Muller MS, Kelly BT, Rodeo SA, et al. Epidemiology of National Football League training camp injuries from 1998 to 2007. *The American journal of sports medicine*. 2008;36(8):1597-603. Epub 2008/04/30.
9. Schwabe P, Haas NP, Schaser KD. [Fractures of the extremities with severe open soft tissue damage. Initial management and reconstructive treatment strategies]. *Unfallchirurg*. 2010;113(8):647-70; quiz 71-2. Extremitätenfrakturen mit schwerem offenem Weichteilschaden. Initiales Management und rekonstruktive Versorgungsstrategien.
10. Mittlmeier T, Krapohl BD, Schaser KD. [Management of severe soft-tissue trauma in the upper extremity - shoulder, upper and lower arm]. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. 2010;22(2):196-211. Management Weichteilschaden an der oberen Extremität - Schulter, Ober- und Unterarm.
11. Goff BJ, Castillo R, Raja SN. Painful sequelae following limb salvage: etiology and management. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2011;19 Suppl 1:S23-7.
12. Patzakis MJ, Wilkins J. Factors influencing infection rate in open fracture wounds. *Clin Orthop Relat Res*. 1989(243):36-40.
13. Jager C, Zeichen J. [Acute lower leg compartment syndrome]. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. 2011;23(1):5-14. Das akute Kompartmentsyndrom des Unterschenkels.
14. McQueen MM, Gaston P, Court-Brown CM. Acute compartment syndrome. Who is at risk? *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(2):200-3.
15. Hartwig T, Streitparth F, Gross C, Muller M, Perka C, Putzier M, et al. Digital 3-dimensional analysis of the paravertebral lumbar muscles after circumferential single-level fusion. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2011;24(7):451-4. Epub 2011/02/22.
16. Motosuneya T, Asazuma T, Tsuji T, Watanabe H, Nakayama Y, Nemoto K. Postoperative change of the cross-sectional area of back musculature after 5 surgical procedures as assessed by magnetic resonance imaging. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2006;19(5):318-22. Epub 2006/07/11.
17. Robertsson O, Bizjajeva S, Fenstad AM, Furnes O, Lidgren L, Mehnert F, et al. Knee arthroplasty in Denmark, Norway and Sweden. *Acta orthopaedica*. 2010;81(1):82-9. Epub 2010/02/26.

18. Hailer NP, Garellick G, Karrholm J. Uncemented and cemented primary total hip arthroplasty in the Swedish Hip Arthroplasty Register. *Acta orthopaedica*. 2010;81(1):34-41. Epub 2010/02/26.
19. Berman AT, Bosacco SJ, Israelite C. Evaluation of total knee arthroplasty using isokinetic testing. *Clin Orthop Relat Res*. 1991(271):106-13. Epub 1991/10/01.
20. Masonis JL, Bourne RB. Surgical approach, abductor function, and total hip arthroplasty dislocation. *Clin Orthop Relat Res*. 2002(405):46-53. Epub 2002/12/04.
21. Demos HA, Rorabeck CH, Bourne RB, MacDonald SJ, McCalden RW. Instability in primary total hip arthroplasty with the direct lateral approach. *Clin Orthop Relat Res*. 2001(393):168-80. Epub 2002/01/05.
22. Archdeacon M, Ford KR, Wyrick J, Paterno MV, Hampton S, Ludwig MB, et al. A prospective functional outcome and motion analysis evaluation of the hip abductors after femur fracture and antegrade nailing. *J Orthop Trauma*. 2008;22(1):3-9. Epub 2008/01/08.
23. Helmy N, Jando VT, Lu T, Chan H, O'Brien PJ. Muscle function and functional outcome following standard antegrade reamed intramedullary nailing of isolated femoral shaft fractures. *J Orthop Trauma*. 2008;22(1):10-5. Epub 2008/01/08.
24. Schutz M, Muller M, Kaab M, Haas N. Less invasive stabilization system (LISS) in the treatment of distal femoral fractures. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2003;70(2):74-82.
25. Anand N, Baron EM, Thaiyananthan G, Khalsa K, Goldstein TB. Minimally invasive multilevel percutaneous correction and fusion for adult lumbar degenerative scoliosis: a technique and feasibility study. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2008;21(7):459-67.
26. Kim DY, Lee SH, Chung SK, Lee HY. Comparison of multifidus muscle atrophy and trunk extension muscle strength: percutaneous versus open pedicle screw fixation. *Spine*. 2005;30(1):123-9.
27. Tsutsumimoto T, Shimogata M, Ohta H, Misawa H. Mini-open versus conventional open posterior lumbar interbody fusion for the treatment of lumbar degenerative spondylolisthesis: comparison of paraspinal muscle damage and slip reduction. *Spine*. 2009;34(18):1923-8.
28. Lee KH, Yue WM, Yeo W, Soeharno H, Tan SB. Clinical and radiological outcomes of open versus minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2012;21(11):2265-70.
29. Meneghini RM, Smits SA, Swinford RR, Bahamonde RE. A randomized, prospective study of 3 minimally invasive surgical approaches in total hip arthroplasty: comprehensive gait analysis. *The Journal of arthroplasty*. 2008;23(6 Suppl 1):68-73. Epub 2008/09/09.
30. Parratte S, Pagnano MW. Muscle damage during minimally invasive total hip arthroplasty: cadaver-based evidence that it is significant. *Instructional course lectures*. 2008;57:231-4. Epub 2008/04/11.
31. Muller M, Tohtz S, Winkler T, Dewey M, Springer I, Perka C. MRI findings of gluteus minimus muscle damage in primary total hip arthroplasty and the influence on clinical outcome. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2010;130(7):927-35.
32. Niki Y, Mochizuki T, Momohara S, Saito S, Toyama Y, Matsumoto H. Is minimally invasive surgery in total knee arthroplasty really minimally invasive surgery? *The Journal of arthroplasty*. 2009;24(4):499-504. Epub 2008/09/02.
33. Stevens-Lapsley JE, Bade MJ, Shulman BC, Kohrt WM, Dayton MR. Minimally invasive total knee arthroplasty improves early knee strength but not functional performance: a randomized controlled trial. *The Journal of arthroplasty*. 2012;27(10):1812-9 e2. Epub 2012/03/31.

34. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011;138(17):3647-56. Epub 2011/08/11.
35. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;9:493-5. Epub 1961/02/01.
36. Wernig A. [Regeneration capacity of skeletal muscle]. *Therapeutische Umschau Revue therapeutique*. 2003;60(7):383-9. Epub 2003/09/06. Die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur.
37. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental biology*. 1998;194(1):114-28. Epub 1998/03/14.
38. Cook DR, Doumit ME, Merkel RA. Transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor-BB interact to affect proliferation of clonally derived porcine satellite cells. *Journal of cellular physiology*. 1993;157(2):307-12. Epub 1993/11/01.
39. 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. Epub 1993/11/01.
40. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev*. 2009;37(1):18-22. Epub 2008/12/23.
41. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):534-51. Epub 2001/07/18.
42. Tanaka S, Miyata T, Fujita T, Kawahara E, Tachino K, Funakoshi H, et al. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal muscle. *Journal of Physical Therapy Science*. 2009;21(2):141-5.
43. Darr KC, Schultz E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1987;63(5):1816-21. Epub 1987/11/01.
44. Mackey AL, Kjaer M, Dandanell S, Mikkelsen KH, Holm L, Dossing S, et al. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J Appl Physiol*. 2007;103(2):425-31. Epub 2007/04/28.
45. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006;444(7119):574-9. Epub 2006/11/17.
46. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology*. 2007;9(3):255-67. Epub 2007/02/13.
47. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, et al. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nature biotechnology*. 2007;25(9):1025-34. Epub 2007/09/04.
48. Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, et al. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells*. 2004;22(7):1305-20. Epub 2004/12/08.
49. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant immunology*. 2004;12(3-4):311-9. Epub 2004/05/26.
50. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30.

51. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and embryology*. 1999;199(5):391-6. Epub 1999/04/30.
52. 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. Epub 2003/09/27.
53. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84-A(5):822-32. Epub 2002/05/11.
54. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53. Epub 2005/01/08.
55. Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *The American journal of pathology*. 2005;167(4):1105-17. Epub 2005/09/30.
56. Mishra DK, Friden J, Schmitz MC, Lieber RL. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(10):1510-9. Epub 1995/10/01.
57. Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise*. 1992;24(2):197-205. Epub 1992/02/01.
58. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1995;72(3):341-7. Epub 1995/03/01.
59. Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, et al. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1999;9(2):72-80. Epub 1999/04/30.
60. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, et al. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta orthopaedica*. 2011;82(1):102-11. Epub 2010/12/15.
61. Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA, Jarvinen M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scand J Med Sci Sports*. 2003;13(3):150-4.
62. Jarvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med*. 1993;15(2):78-89. Epub 1993/02/01.
63. Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *International journal of sports medicine*. 2004;25(8):588-93. Epub 2004/11/09.
64. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *The American journal of sports medicine*. 2009;37(6):1135-42. Epub 2009/03/14.
65. Kieb M, Lorbach O, Engelhardt M. [Muscle injuries: diagnostics and treatments]. *Der Orthopade*. 2010;39(12):1098-107. Epub 2010/11/26. Muskelverletzungen: Diagnostik und Behandlungen.
66. 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. *The American journal of sports medicine*. 1999;27(2):222-9.
67. Kragh JF, Jr., Svoboda SJ, Wenke JC, Ward JA, Walters TJ. Suturing of lacerations of skeletal muscle. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(9):1303-5.
68. Masquelet AC. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch Surg*. 2003;388(5):344-6.

69. Piovesan RF, Fernandes KP, Alves AN, Teixeira VP, Silva Junior JA, Martins MD, et al. Effect of Nandrolone Decanoate on Skeletal Muscle Repair. *International journal of sports medicine*. 2012. Epub 2012/07/14.
70. Borselli C, Storrle H, Benesch-Lee F, Shvartsman D, Cezar C, Lichtman JW, et al. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.107(8):3287-92. Epub 2009/12/08.
71. 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;16(2):197-206.
72. Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH, Jiang MS. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1996;34(11-12):1301-11.
73. Duchen LW, Excell BJ, Patel R, Smith B. Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. A light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. *Journal of the neurological sciences*. 1974;21(4):391-417.
74. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. *Biomechanics, physiology, and histology. The American journal of sports medicine*. 1994;22(5):702-10.
75. Rushton JL, Davies I, Horan MA, Mahon M, Williams R. Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. *J Anat*. 1997;190 (Pt 3):417-22.
76. Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve*. 1985;8(3):217-22.
77. Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):815-22.
78. 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. *J Orthop Res*. 2004;22(6):1336-44.
79. Jarvinen M, Sorvari T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1975;83(2):259-65.
80. Schmalbruch H. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue Cell*. 1976;8(4):673-92.
81. 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.
82. 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. *Anat Rec*. 2001;263(2):139-54.
83. 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;24(1):102-11.
84. 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. *The American journal of sports medicine*. 2007;35(1):93-102.
85. Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1976;142(1):47-56.

86. Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *The American journal of sports medicine*. 1999;27(1):2-9.
87. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *The American journal of sports medicine*. 1998;26(2):172-6.
88. Almekinders LC, Gilbert JA. Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *The American journal of sports medicine*. 1986;14(4):303-8.
89. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 2003;28(3):365-72.
90. Nozaki M, Ota S, Terada S, Li Y, Uehara K, Gharaibeh B, et al. Timing of the administration of suramin treatment after muscle injury. *Muscle Nerve*. 2012;46(1):70-9.
91. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(1):131-7.
92. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology*. 2012.
93. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*. 2007;25(7):1737-45.
94. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *Journal of immunology*. 2010;185(11):6617-23.
95. Subramony SD, Dargis BR, Castillo M, Azeloglu EU, Tracey MS, Su A, et al. The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation. *Biomaterials*. 2012.
96. Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R, Tremblay JP. Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve*. 1994;17(12):1407-15.
97. Partridge TA. Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve*. 1991;14(3):197-212.
98. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989;337(6203):176-9.
99. Miller RG, Sharma KR, Pavlath GK, Gussoni E, Mynhier M, Lanctot AM, et al. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve*. 1997;20(4):469-78.
100. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nature medicine*. 2003;9(9):1195-201.
101. Pak HN, Qayyum M, Kim DT, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill MC, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2003;14(8):841-8.
102. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regulatory peptides*. 2004;117(1):3-10.
103. Saunders JH, Sissons HA. The effect of denervation on the regeneration of skeletal muscle after injury. *J Bone Joint Surg Br*. 1953;35-B(1):113-24.

104. 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;202(3):244-54.
105. Irintchev A, Langer M, Zweyer M, Theisen R, Wernig A. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *The Journal of physiology.* 1997;500 (Pt 3):775-85.
106. Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng.* 2004;10(7-8):1093-112.
107. Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, et al. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6 Suppl 3:s60-7. Epub 2012/07/05.
108. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature biotechnology.* 2001;19(12):1141-7.
109. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells.* 2009;27(11):2734-43. Epub 2009/07/11.
110. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells.* 2009;27(12):3063-73. Epub 2009/09/15.
111. Deasy BM, Lu A, Tebbets JC, Feduska JM, Schugar RC, Pollett JB, et al. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *The Journal of cell biology.* 2007;177(1):73-86.
112. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone.* 2009;45(6):1065-72.
113. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol.* 2011;769:25-30.
114. Bauder AR, Ferguson TA. Reproducible mouse sciatic nerve crush and subsequent assessment of regeneration by whole mount muscle analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2012(60).
115. 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. *J Orthop Res.* 2010;28(7):950-7.
116. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 1999;18(5):417-26.
117. Aarimaa V, Kaariainen M, Vaittinen S, Tanner J, Jarvinen T, Best T, et al. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscular disorders : NMD.* 2004;14(7):421-8.
118. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):332-7.
119. Cantini M, Massimino ML, Catani C, Rizzuto R, Brini M, Carraro U. Gene transfer into satellite cell from regenerating muscle: bupivacaine allows beta-Gal transfection and expression in vitro and in vivo. *In vitro cellular & developmental biology Animal.* 1994;30A(2):131-3.

120. Vilquin JT, Asselin I, Guerette B, Kinoshita I, Roy R, Tremblay JP. Successful myoblast allotransplantation in mdx mice using rapamycin. *Transplantation*. 1995;59(3):422-6.
121. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation*. 2003;108 Suppl 1:II259-63.
122. Skuk D, Paradis M, Goulet M, Tremblay JP. Ischemic central necrosis in pockets of transplanted myoblasts in nonhuman primates: implications for cell-transplantation strategies. *Transplantation*. 2007;84(10):1307-15.
123. de la Garza-Rodea AS, van der Velde I, Boersma H, Goncalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, et al. Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant*. 2011;20(2):217-31.
124. Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002;12(6):584-7.
125. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of cell biology*. 2003;160(6):909-18.
126. Pecanha R, Bagno LL, Ribeiro MB, Robottom Ferreira AB, Moraes MO, Zapata-Sudo G, et al. Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(7):609-17.
127. Skuk D, Caron NJ, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(9):951-67.
128. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, et al. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;286(5):C1031-6.
129. Yahiaoui L, Gvozdic D, Danialou G, Mack M, Petrof BJ. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. *The Journal of physiology*. 2008;586(16):3991-4004.
130. Skuk D, Tremblay JP. Intramuscular cell transplantation as a potential treatment of myopathies: clinical and preclinical relevant data. *Expert Opin Biol Ther*. 11(3):359-74. Epub 2011/01/06.
131. Gnecci M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature medicine*. 2005;11(4):367-8.
132. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9.
133. Asanuma H, Vanderbrink BA, Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Meldrum DR, et al. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. *The Journal of surgical research*. 2011;168(1):e51-9.
134. Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *International journal of hematology*. 2007;86(1):17-21.
135. Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem cell research*. 2011;6(3):206-14.
136. Wang SP, Wang ZH, Peng DY, Li SM, Wang H, Wang XH. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Molecular medicine reports*. 2012;6(4):848-54.
137. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted

heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H886-93.

138. Hoffmann J, Glassford AJ, Doyle TC, Robbins RC, Schrepfer S, Pelletier MP. Angiogenic effects despite limited cell survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg*. 58(3):136-42. Epub 2010/04/10.

139. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*. 2007;40(4):1078-87. Epub 2007/02/06.

140. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *The American journal of sports medicine*. 2005;33(1):43-51.

141. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, et al. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(35):25852-63.

142. Li Y, Li J, Zhu J, Sun B, Branca M, Tang Y, et al. Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. *Mol Ther*. 2007;15(9):1616-22.

143. Wang L, Shansky J, Borselli C, Mooney D, Vandenburgh H. Design and fabrication of a biodegradable, covalently crosslinked shape-memory alginate scaffold for cell and growth factor delivery. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(19-20):2000-7.

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Perka für seine Unterstützung in all den Jahren im klinischen wie auch im wissenschaftlichen Bereich. Er war immer für meine zahlreichen Fragen offen und nahm sich die Zeit, Problemstellungen bis zur Lösung zu besprechen. Gerade sein pragmatischer Ansatz erwies sich oft als der beste. Ich danke ihm vor allem auch für das Schaffen der Voraussetzungen für die hier vorgestellte Arbeit.

Herrn Prof. Duda möchte ich als meinem wissenschaftlichen Mentor danken für die zahlreichen konzeptionellen Gespräche, welche wir über und auch neben meinen Arbeiten führen und die Unterstützung auf allen Ebenen. Er hat die Etablierung der Zelltherapie bei Muskelverletzungen begleitet und uns wo es ging immer unter die Arme gegriffen.

Herrn Prof. Haas danke ich für seine fortwährende Unterstützung und die hochwertige, konzeptorientierte akademische und klinische Ausbildung. Einen besonderen Dank möchte ich ihm aussprechen für die Möglichkeit mit seinem CMSC an einem Ort zu arbeiten, an dem es selbstverständlich und vor allem auch durchführbar ist, klinische Fragestellungen in den wissenschaftlichen Bereich zu tragen und Erkenntnisse aus der Forschung in die Klinik zu überführen.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an Dr. Philipp von Roth richten, der die Arbeitsgruppe Muskelregeneration mit mir aufgebaut hat, mit dem ich viele der experimentellen Arbeiten durchgeführt habe und auf dessen Freundschaft und Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, ohne deren unermüdlichen Einsatz die gesamte Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern, Dr. Elisabeth und Dr. Erwin Winkler, möchte ich dafür danken, dass sie mir dies alles ermöglicht haben und mich in all meinen Entscheidungen und Lebenssituationen immer voll unterstützt haben.

Meine immerwährende Dankbarkeit gilt meiner Frau Katharina und meinem Sohn Felix Konstantin.

8 Erklärung § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde.

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

14.07.2013

Datum

Unterschrift