

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

DISSERTATION

**Einfluss von CD3+ T-Zellen auf die Muskelregeneration nach
einem schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Manuela Hoffmann

aus Mainz

Datum der Promotion: 26. Juni 2022

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS.....	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
ABSTRAKT	10
1 Einleitung.....	13
1.1 Die Bedeutung der Skelettmuskulatur	13
1.2 Folgen von muskulären Verletzungen	14
1.2.1 Die Bedeutung iatrogenen Muskelschäden	14
1.2.2 Minimalinvasive Zugänge als Lösung (?).....	15
1.3 Intrinsische regenerative Kapazität der Skelettmuskulatur und konventionelle Therapieoptionen	16
1.3.1 Konservative Behandlungsmethoden.....	16
1.3.2 Operative Therapieansätze.....	18
1.4 Prozesse der Muskelregeneration.....	19
1.4.1 Entzündungsreaktion.....	19
1.4.2 Regeneration und Remodelling.....	21
1.5 Die Bedeutung der T-Zellen im Kontext der Muskelregeneration	23
1.6 Innovative therapeutische Ansätze zur Behandlung von Skelettmuskelverletzungen	26
1.6.1 Neue molekulare Therapiekonzepte.....	26
1.6.2 Neue zelluläre Therapiekonzepte.....	26
1.7 Traumamodelle im gegenwärtigen Forschungskontext	28
1.8 „Clinical need“ und Zielsetzung dieser Arbeit	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Studiendesign.....	29
2.2 In vitro.....	30
2.2.1 Bezug der Alginat-Scaffolds.....	30
2.3 In vivo	30
2.3.1 Versuchstiere.....	30

2.3.2	Einteilung in Versuchstiergruppen.....	31
2.3.3	Antikörper-Applikation zur gezielten Zelldepletion.....	32
2.3.4	Blutentnahme	32
2.3.5	Muskeltrauma (Quetschtrauma-Modell).....	33
2.3.6	Biomechanische Auswertung.....	37
2.3.7	Euthanasie und Muskelexplantation	39
2.4	Ex vivo	39
2.4.1	Muskeldissoziation	39
2.4.2	MACS, Antikörper-Färbung und Durchflusszytometrie (Muskel).....	40
2.4.3	Gating-Strategie	43
2.4.4	Statistische Evaluation	44
3	Ergebnisse	45
3.1	T-Zellen akkumulieren in verletzter Skelettmuskulatur	45
3.2	Geringeres Verhältnis aus CD4+/CD8+ Zellen in verletzter Muskulatur als im peripheren Blut.....	49
3.3	Depletion von CD8+ und CD4+ T-Zellen und ihre Auswirkungen auf die Muskelheilung.....	53
3.4	Funktionale Ergebnisse anhand Muskelkraftmessung.....	56
3.4.1	Verbesserte Regeneration der relativen Muskelkraft durch CD8-Depletion ...	56
4	Diskussion	58
4.1	Kinetik des adaptiven Immunsystems im Verletzungsgebiet	59
4.2	Regulatorische CD4+ T-Zellen kontrollieren die Art der Immunantwort.....	61
4.3	CD8+ T-Zellen als Hemmschuh der Muskelregeneration	63
4.4	CD4/CD8-Ratio mit möglicher prädiktiver Funktion.....	65
4.5	Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Untersuchungen.....	67
4.6	Ausblick und Schlussfolgerung	68
	LITERATURVERZEICHNIS	71
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	84
	LEBENS LAUF	85
	PUBLIKATIONS LISTE.....	86
	DANKSAGUNG.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Behandlungsablauf der Versuchstiergruppen mit entsprechend definiertem primären Endpunkt und anschließendem Analyseverfahren	31
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse	40
Tabelle 3:	Antikörper, Konzentrationen und Hinweise zum methodischen Vorgehen bei der Färbung von Muskelzellsuspensionen mittels markierter Antikörper	41
Tabelle 4:	Relativer Anteil der CD45+ Zellen in Bezug auf alle vitalen Zellen (in %) in peripherem Blut und in der verletzten Muskulatur im zeitlichen Verlauf ab Quetschtrauma an Tag 0.	46
Tabelle 5:	Relativer Anteil der CD3+ Zellen in Bezug auf alle vitalen CD45+ Zellen (in %) in peripherem Blut und in der verletzten Muskulatur im zeitlichen Verlauf ab Quetschtrauma an Tag 0.	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mobilisierter M. soleus (Pfeil) des linken Hinterlaufes einer Ratte nach stumpfer Präparation. (eigene Darstellung).....	34
Abbildung 2:	Muskeltrauma beginnend mit proximaler (a), mittlerer und distaler (b) Quetschung mittels isolierter Arterienklemme distal des Gefäß-Nerven-Bündels. Anschließendes Crush-Trauma durch Nadelhalter proximal des Gefäß-Nerven-Bündels (c). Sichtbares Quetschtrauma mit beginnendem Muskelhämatom (Pfeil). (eigene Darstellung).....	35
Abbildung 3:	Transplantation des Alginat-Scaffolds (Pfeil) in die taschenförmig präparierte Muskelfaszienloge zwischen M. soleus und M. gastrocnemius. (eigene Darstellung).....	36
Abbildung 4:	Darstellung des Versuchsaufbaus/der Messanlage zur biomechanischen Bestimmung der muskulären Kontraktionskraft (modifiziert aus Winkler et al.[131]).....	38
Abbildung 5:	Standardisierte Abfolge der durchflusszytometrischen Analysen („Gating-Strategie“) dargestellt als Flussdiagramm.....	43
Abbildung 6:	Es zeigte sich ein relatives Maximum an Tag 7 im verletzten Muskel, wobei der relative Anteil an CD45+ Zellen im peripheren Blut weitestgehend konstant bleibt, sowie eine signifikante Erhöhung der CD45+ Zellkonzentration im verletzten Muskel im Vergleich zur unverletzten Muskulatur der Gegenseite ($p < 0,05$; Bonferroni).....	46
Abbildung 7:	Es zeigte sich eine vermehrte Anreicherung von CD45+CD3+ T-Zellen im verletzten Muskel an Tag 7.....	48
Abbildung 8:	Es zeigte sich eine vermehrte Anreicherung der CD3+CD4+ T-Zellfraktion im verletzten Muskel an Tag 7.....	50
Abbildung 9:	Es zeigte sich eine statistisch signifikant vermehrte Anreicherung der CD4+ T-Zellfraktion (regulatorische T-Zellen) im verletzten Muskel an Tag 7 im Vergleich zur Konzentration im Blut zum selben Zeitpunkt ($p < 0,05$; Bonferroni).....	51
Abbildung 10:	Es zeigte sich eine statistisch signifikant vermehrte Anreicherung der CD3+ CD8+ T-Zellfraktion im verletzten Muskel an Tag 7 im Vergleich zur Konzentration im Blut zum selben Zeitpunkt ($p < 0,05$; Bonferroni).....	52

Abbildung 11:	Es zeigte sich ein statistisch signifikantes Verhältnis aus CD4+ Zellen zu CD8+ T-Zellen anhand des jeweils relativen Anteils aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und verletztem Muskelgewebe beispielhaft an Tag 7 (n = 11) (p <0,05; Bonferroni).....	53
Abbildung 12:	Es zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl der CD8b+ Subpopulation (p <0,05; Bonferroni) als Darstellung einer erfolgreichen CD8-Depletion.	54
Abbildung 13:	Es zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl der CD4+ Subpopulation (p <0,05; Bonferroni) als Darstellung einer erfolgreichen CD4-Depletion. ...	55
Abbildung 14:	Bei der funktionalen Auswertung mittels biomechanischer Muskelkraftmessung zeigte sich ein statistisch signifikant geringerer relativer Kraftverlust der Versuchstiere nach CD8-Depletion im Vergleich zur Kontrollgruppe und Isotyp-Gruppe bezogen auf schnell-zuckende (a) und tetanische Muskelkraft (b) (p <0,05; Dunnett T3).....	57

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AlgTx	Alginat-Transplantation
AMP	Adenosinmonophosphat
BCRT	Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien
BE	Blutentnahme
bHLH	Basic helix-loop-helix (Transkriptionsfaktoren)
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CIITA	Class II Major Histocompatibility Complex (MHC-II) Transactivator
d	Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting (= Durchflusszytometrie)
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FKN	Fraktalkin
G	Gauge
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HO	Hämoxygenase

Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
JWI	Julius Wolff Institut
KG	Körpergewicht
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
M	Musculus (Sg.)
M1	Makrophagen Typ 1
M2	Makrophagen Typ 2
mA	Milliampere
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (=CCL2)
MDSC	Myeloide Supressorzelle(n)
MFM	muscle force measurement (=Muskelkraftmessung)
MHC	Hautphistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
Mm	Musculi (Pl.)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomographie

MSC	Mesenchymale Stammzelle(n)
MyoD	Myoblast determination protein 1 (Myogener Faktor 3)
N	Newton (Einheit); Nerv
NaCl	Natriumchlorid-Lösung (Kochsalz-Lösung)
natural T	natürliche T-Zellen
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
O ₂	Sauerstoff
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PRP	Platelet-rich-Plasma
s	Sekunden
s.c.	subkutan
SC	Satellitenzelle(n)
T _{EMRA}	Terminal differenzierte T-Effektorgedächtniszelle
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzellen
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
µg	Mikrogramm

Abstrakt

Deutsche Version

Einleitung: Schwere Verletzungen der Skelettmuskulatur sind aufgrund fettiger Degeneration und Fibrosierung mit einem wesentlichen Kraft- und Funktionsverlust verbunden. Für die Entwicklung neuer Therapieoptionen ist es essenziell, die zellulären und molekularen Mechanismen, welche die Muskelregeneration einschränken, besser zu verstehen. Diese Arbeit untersucht den Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Regeneration schwerer Muskelverletzungen und inwieweit gezielte Immunmodulation die Heilung beeinflussen können.

Methodik: In vivo erfolgte bei 58 weiblichen Sprague-Dawley Ratten ein standardisiertes Quetschtrauma des linken Musculus soleus. Zur longitudinalen Betrachtung der zellulären Kinetik des adaptiven Immunsystems wurden am Trauma-Tag sowie am ersten (n=3), dritten (n=3), siebten (n=11) und 14. (n=3) postoperativen Tag durchflusszytometrische Analysen zur Zellquantifizierung in peripherem Blut und Muskelgewebe durchgeführt. Zudem wurden am 28. postoperativen Tag Muskelkraftmessungen der Mm. solei im Seitenvergleich durchgeführt. Neben einer Kontrollgruppe ohne Antikörpergabe (n=13) erfolgten dafür interventionell jeweils 24 und 48 h vor Trauma die Gabe von anti-CD4-Antikörpern (n=9) oder anti-CD8-Antikörpern (n=10). Ergänzend erfolgte eine Isoytpkontrolle mit Gabe von anti-IgG1-Antikörpern (n=6).

Ergebnisse: Die longitudinale Betrachtung der lokalen Zellzusammensetzung zeigte eine progressive Anreicherung von CD45+ Zellen im Verletzungsgebiet, welche ihr Maximum am siebten posttraumatischen Tag erreichte. Diese Anreicherung war mit einer Akkumulation von CD45+CD3+ T-Zellen verbunden, welche an Tag sieben die Konzentrationen des peripheren Blutes überstieg. Innerhalb der CD3+ T-Zell-Subpopulationen waren vor allem CD45+CD3+CD4+CD25^{high} und CD45+CD3+CD8+ T-Zellen lokal signifikant erhöht ($p < 0,05$). Zusätzlich zeigte sich hier ein geringeres Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen im verletzten Muskel als im peripheren Blut. Bezogen auf die Muskelkraftmessungen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen CD4-Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe. Einen signifikant geringeren Kraftverlust zeigte jedoch die CD8-Depletionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Verlust der schnell-zuckenden Kraft mit 7% zu 35% und der tetanischen Kraft mit 9% zu 52% ($p < 0,05$).

Schlussfolgerung: Nach einem schwere Skelettmuskeltrauma kommt es innerhalb der ersten 14 Tage zu einer dynamischen Anreicherung von T-Zellen im Verletzungsgebiet. Insbesondere das Verhältnis aus CD4+ zu CD8+ T-Zellen scheint bei der Muskelregeneration eine entscheidende Rolle zu spielen, da es durch eine Depletion der zytotoxischer CD8+ T-Zellen zu einer signifikant verbesserten Regeneration der Muskelkraft kommt.

English version

Introduction: Severe muscle injuries are associated with a substantial loss of muscle force and functionality because of fatty degeneration and fibrosis during the healing process. To create new therapeutic approaches there is an essential need to understand cellular and molecular mechanisms that impair muscle regeneration. This study is supposed to investigate the role of the adaptive immune system in muscle regeneration after a severe skeletal muscle trauma as well as to explore the influence of a targeted immune modulation on the regenerative process.

Methods: In vivo 58 female Sprague-Dawley rats underwent a standardized crush injury in the left soleus muscle. To consider longitudinal cellular kinetics of the adaptive immune system flow, cytometric cell quantification analyzes in peripheral blood and muscle tissue at the day of trauma and after one (n=3), three (n=3), seven (n=11) and 14 (n=3) days were performed. Also, muscle force measurements for soleus muscles in a direct comparison of both sides on day 28 were accomplished. In addition to a control group without intervention (n=13) applications of anti-CD4-antibodies (n=9) and anti-CD8-antibodies (n=10) 24 and 48 hours prior to the trauma were performed. Additionally, there was an isotype control group that received anti-IgG1-antibodies (n=6).

Results: The longitudinal cellular composition of the adaptive immune system revealed a progressive enrichment of CD45+cells at the injury site with a local peak on the seventh day. This accumulation was attached to a local enrichment of CD45+CD3+T cells that exceeded peripheral blood levels on the seventh day. Within CD3+T cell subpopulations there were significantly higher concentrations of CD45+CD3+CD25^{high} and CD45+CD3+CD8+T cells at the injury site at this point ($p<0,05$). Additionally, there was a lesser CD4/CD8-ratio in injured muscle tissue than in peripheral blood. Based on the muscle force measurements the loss of strength in the control group and CD4-depletion group did not differ significantly. In contrast there was a significant difference in the CD8-depletion group compared to the control group with 7% to 35% for fast-twitch force and with 9% to 52% for tetanic force ($p<0,05$).

Conclusion: During the first 14 days after a severe skeletal muscle injury there is a dynamic enrichment of T cells at the injury site. Especially the CD4/CD8-ratio seems to have a crucial function in muscle regeneration. In the absence of cytotoxic CD8+T cells there is a significant improvement of muscle force regeneration.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Skelettmuskulatur

Jede einzelne Körperbewegung ist von einem konzertanten Zusammenspiel des muskuloskelettalen Systems abhängig. Zur Ausübung von Stütz- und Bewegungsfunktionen benötigt dieses System Knochen, Bänder, Sehnen und natürlich die Skelettmuskulatur. Die Funktionen der Skelettmuskulatur sind vielseitig: Zum einen garantieren diese kontraktile Einheiten Mobilität bei erhaltener Gelenkstabilität. Zum anderen erfüllt die Skelettmuskulatur auch metabolische Funktionen wie Thermoregulation und Energiespeicherung [1].

Es ist bekannt, dass die Skelettmuskulatur als funktionelles Synzytium einer strengen hierarchischen Ordnung unterworfen ist. Sobald nur eine einzelne Komponente der Muskelfasern oder ihrer Nachbarstrukturen aus Laminin, Kollagen oder anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix beeinträchtigt ist, wird das empfindliche Gleichgewicht gestört [2]. Die regenerative Kapazität der Skelettmuskulatur ist jedoch begrenzt. Während es bei Knochenschäden zu einer narbenfreien Heilung kommt, können schwerere Verletzungen der Skelettmuskulatur die eigenen Regenerationskapazitäten übersteigen. Ihre Funktion kann aufgrund von verringerter Kontraktilität, fettiger Degeneration, Narbenbildung durch exzessive Fibrose und letztlich resultierendem Kraftverlust nachhaltig beeinträchtigt werden [3]. Dies ist assoziiert mit Schmerzen, psychischer Belastung und einer starken Einschränkung der Lebensqualität. Aktuelle Therapieoptionen dienen der Förderung des intrinsischen Heilungspotenzials, sind jedoch bei ausgedehnten Traumata nicht ausreichend wirksam. Somit stellen Muskeltraumata jeglicher Ätiologie bis heute eine Herausforderung der medizinischen Versorgung dar. Unter anderem aus diesem Grund wächst das Feld der regenerativen Forschung zur Entwicklung effektiver Therapien weiter.

1.2 Folgen von muskulären Verletzungen

Verletzungen im Bereich der Skelettmuskulatur stellen ein ökonomisch relevantes Problem für das Gesundheitswesen dar [4]. Millionenfach kommt es weltweit pro Jahr zu Muskelverletzungen als Resultat von Autounfällen [5]. Am häufigsten sind jedoch Muskelschäden, die auf direkte oder indirekte Gewalteinwirkung im Sportbereich zurückzuführen sind. Im Bereich des Profifußballs konnte eine europäische Kohortenstudie zeigen, dass Trainings- und Turnieraussfälle nahezu zu einem Drittel auf muskuläre Probleme insbesondere der unteren Extremität zurückzuführen waren [6].

Aber nicht nur offensichtlich direkte Traumamechanismen tragen zu einer wachsenden Bedeutung von Muskelverletzungen bei. Bei der Betrachtung von Verletzungsursachen müssen auch stets iatrogene Vorgänge berücksichtigt werden. Operationen bringen zugangsbedingt stets ein Weichteiltrauma mit sich.

1.2.1 Die Bedeutung iatrogenen Muskelschäden

Im Bereich der Endoprothetik wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2016 ca. 230.000 Primärimplantationen von Hüfttotalendoprothesen beschrieben. Bis 2040 wird ein weiterer Inzidenzanstieg der Primäreingriffe von 23 % erwartet [7]. Die Bereitschaft der Patienten zur endoprothetischen Versorgung ist am ehesten auf eine verbesserte Lebensqualität nach erfolgreichem Eingriff zurückzuführen [8]. Auch aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung mit gewachsenem Mobilitätsanspruch im Rahmen des demographischen Wandels werden immer häufiger endoprothetische Eingriffe indiziert sein.

Implantierte Totalendoprothesen haben in skandinavischen Ländern durch hohe Primärstabilität und zunächst stabile ossäre Integration der Prothesenelemente eine revisionsfreie Standzeit von über 80 % im 15-Jahres-Follow-up erreicht [9]. Dennoch sind septische oder aseptische Lockerungen mit resultierender Instabilität im Verlauf häufige Revisionsindikationen [10].

Zudem werden, um Zugang zum Gelenk zu erhalten, konsekutiv bei jeder dieser Operationen Traktions-, Kontusions- und Lazerationstraumata gesetzt. Im Rahmen der verschiedenen möglichen Zugangswege werden teilweise gezielte muskuläre Inzisionen gesetzt. Hierdurch kann es zu Insuffizienzen der Glutealmuskulatur, Hüftabduktoren und -adduktoren kommen. Die resultiert in einem schlechten postoperativen Outcome assoziiert mit Muskelatrophie, (Trendelenburg-) Hinken und Luxationsneigung [11].

1.2.2 Minimalinvasive Zugänge als Lösung (?)

Auf diese Komplikationen wurde mit der Modifizierung der Zugangswege hin zu minimalinvasivem Vorgehen reagiert. Ziel der minimalinvasiven Chirurgie ist es nicht, kosmetisch ansprechendere Ergebnisse zu erhalten, sondern die subkutanen Weichteile zu schonen [12]. Eine Überlegenheit des minimalinvasiven anterolateralen Zuganges im Vergleich zu konventionellen Zugängen in Bezug auf postoperative Funktionalität und MRT-morphologischer Darstellung des M. gluteus medius konnte in mehreren Studien belegt werden [13, 14]. Vorteile der minimalinvasiven Chirurgie sind zudem kürzere Krankenhausaufenthalte und schnellere Mobilisation [15]. Dennoch kann es weiterhin zu Funktionsbeeinträchtigungen durch Muskelverletzungen kommen [16]. Als potenzielle Komplikationen können Implantatfehlagen oder neuronale Läsionen aufgrund mangelnder Übersichtlichkeit des Operationsgebietes sowie durch vermehrten Hautkontakt der Instrumente bzw. Implantate höhere Raten an postoperativen Wundinfektionen auftreten [17, 18].

Diese kontroversen Darstellungen haben stets zu Diskussion im Bereich der orthopädischen Chirurgie über die Bedeutung der minimalinvasiven Chirurgie geführt. Fest steht, dass muskuläre Läsionen und deren sekundäre Beeinträchtigungen dadurch nicht vollends verhindert werden.

Insbesondere bei Revisionseingriffen ist der Erhalt des minimalinvasiven Zuganges nicht möglich, was häufig eine Erweiterung des ursprünglichen Zugangsweges oder Wechsel des Zugangsweges nötig macht. Hierdurch kommt es zu einer erneuten Traumatisierung der Muskulatur mit dem Risiko einer signifikanten Muskelatrophie, sodass trotz einer Regeneration und Rehabilitation die Muskelfunktion nachhaltig vermindert sein kann [19, 20]. Ferner wird das funktionale Outcome ebenfalls durch die (Ko-) Morbiditäten des Patienten entscheidend beeinflusst [8].

1.3 Intrinsische regenerative Kapazität der Skelettmuskulatur und konventionelle Therapieoptionen

Die Skelettmuskulatur besitzt ein intrinsisches Regenerationspotenzial. Durch diese Reparaturmechanismen können kleinere Läsionen ungehindert ausheilen [21]. Dies betrifft insbesondere lokal begrenzte Zellschäden oder Belastungsreaktionen nach körperlicher Beanspruchung [22]. Wenn Muskeltraumata jedoch die regenerative Kapazität aufgrund der Schwere der Verletzung übersteigen, kommt es zu einer Defektheilung, welche sich in einer Vernarbung des Läsionsareals durch exzessive Fibrose mit Kontraktilitätsverlust äußert. Insbesondere Verletzungen im Muskel-Sehnen-Übergang stellen eine Herausforderung dar. Bei (Partial-) Rupturen der Rotatorenmanschette zeigen sich häufig neben fettiger Degeneration und Funktionseinschränkung eine anhaltende Gelenkinstabilität mit sekundären Schäden [23]. Ausgedehnte Verletzungen fordern daher eine effiziente Therapieansätze, welche jedoch aktuell fehlen.

Konventionelle Therapieansätze beschränken sich auf die primäre Unterstützung der intrinsischen Regeneration oder versuchen sekundär die Folgen der Defektheilung zu korrigieren. Grob werden diese Therapieoptionen in konservative und operative Ansätze gegliedert.

1.3.1 Konservative Behandlungsmethoden

Das wohl bekannteste Konzept der primären konservativen Therapie von Skelettmuskelverletzungen stellt das PECH-Schema (engl. „RICE“ stehend für „rest, ice, compression, elevation“) dar. Dieses Therapieschema zeichnet sich durch eine unmittelbare Schonung (P = Pause) mit lokaler Kryotherapie (E = Eis), Kompression (C = Compression) und gegebenenfalls Hochlagerung der betroffenen Extremität (H = Hochlagerung) aus. Trotz fehlender Evidenz findet es bei nahezu jeglicher muskulären Verletzung Anwendung. Ziel dieser Therapie ist es, unmittelbar nach Verletzung den Blutzuffluss zur Verletzungsregion zu reduzieren und so ein entstehendes Hämatom bzw. Ödem begrenzt zu halten. Hierdurch sollen benachbarte Strukturen, welche durch Druck durch die Expansion des Hämatoms/Ödems bzw. durch dessen Abbauprodukte geschädigt werden können, geschützt werden.

Trotzdem sind die einzelnen Maßnahmen umstritten. In Bezug auf die Immobilisation gibt es einerseits Empfehlungen zur kurzzeitigen Dauer, da auch eine frische Narbe moderate Kontraktionen aushält, jedoch bei verführter Mobilisation eine Reruptur bzw. sekundäre Rupturgefahr besteht [24]. Andererseits kann eine längere Anwendung zu exzessiver Fibrose und Muskelatrophie führen [25]. Dasselbe gilt ebenfalls für die Kryotherapie. Während eine lokale Kälteapplikation zum einen zu einer geringeren Ödem-Ausdehnung durch verringerte Leukozyteninvasion führen kann, zeigte sich ebenfalls eine verzögerte Muskelregeneration mit vermehrter Bildung von Extrazellulärmatrix [26]. Empfohlen ist daher am ehesten ein Mittelweg aus kurzer Immobilisierung und Kryotherapie mit anschließend langsamer, schmerzadaptierter Leistungssteigerung, um die Wiederherstellung der geschädigten Muskelfasern durch mikrovaskuläre und biomechanische Vorgänge zu unterstützen [27].

Ein weiterer etablierter Therapieansatz ist die medikamentöse Behandlung mittels nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). NSAR dienen primär der symptomatischen Schmerzreduktion und werden daher häufig in der Frühphase eingenommen, um so nach kleineren Verletzungen eine frühzeitige Mobilisation möglich zu machen und findet daher regen Einsatz bei Sportlern [28]. Wie beim PECH-Schema besteht hier jedoch die Gefahr sekundärer Schäden durch verfrühte Mobilisierung [29]. Eine frühe und kurze Einnahme von wenigen Tagen nach einem Muskeltrauma wird jedoch wegen resultierender Reduktion des Schadensausmaßes und der Hemmung entzündlicher Prozesse empfohlen [30]. Von einer dauerhaften Einnahme von NSAR wird jedoch aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen, breiter Effekte auf inflammatorische Zellen der frühen Entzündungsreaktion mit resultierend verringertem Regenerationspotenzial und somit sekundär verringerter Muskelkontraktilität abgesehen [31, 32].

Ein neuerer Therapieansatz ist die intramuskuläre oder intravenöse Gabe von Platelet-Rich-Plasma (PRP) . Hierbei handelt es sich um die Thrombozyten-reiche Fraktion des zentrifugierten Vollblutes. Diese Fraktion enthält neben den Thrombozyten auch Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor β (TGF β), Fibroblastic Growth Factor (FGF), Insulin-like Growth Factor (IGF) und Angiogenese-fördernde Faktoren wie Platelet-Derived Angiogenesis Factor. Durch diese Faktoren können zytokinabhängige Wundheilungsprozesse wie Angiogenese, Zelldifferenzierung und -proliferation gefördert werden [33]. Im Rattenmodell konnte anhand der biomechanischen Funktion eine verkürzte Regenerationsdauer gemessen werden und ein signifikanter Anstieg der Anzahl an regenerativen Muskelfasern, von Pax7+ Satellitenzellen im Verletzungsareal sowie eine vermehrte Angiogenese beobachtet werden [34].

1.3.2 Operative Therapieansätze

Bei ausgedehnten Verletzungen, welche mit einem primären oder sekundär durch umfassendes Debridement verursachten Volumenverlust des Muskels einhergehen, machen operative Therapie notwendig. Hier finden sich verschiedene Ansätze der Weichteilrekonstruktion beispielsweise mittels Lappentransfer. Nachteilig ist hier wiederum der iatrogene Muskelschaden durch die Operation, aber auch durch Funktionsverluste an der Entnahmestelle. Ferner kann die ursprüngliche Funktion zumeist auch durch aufwendige Rekonstruktionsversuche nicht wiederhergestellt werden [35, 36].

Die bisher gängigen Therapieoptionen sind für die Therapie von ausgedehnteren Muskeltraumata als mangelhaft zu bewerten. Keine der benannten Ansätze liefert eine zielgerichtete Therapiemöglichkeit, um Vernarbung und Funktionsverlust unmittelbar entgegen zu wirken. Daher ist es wichtig, die Phasen der Muskelregeneration auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen, um daraus neue Therapieansätze ableiten zu können. Im Rahmen der Grundlagenforschung wird dies seit Jahren forciert, sodass bereits einige vielversprechende Zielstrukturen identifiziert werden konnten.

1.4 Prozesse der Muskelregeneration

Der Prozess der Skelettmuskelheilung ist ein komplexer zellulärer und subzellulärer Vorgang, welcher unmittelbar nach dem Trauma beginnt und sich grob in drei Phasen gliedern lässt: Degeneration mit Inflammation, Regeneration und Remodelling. Diese Phasen gehen auf zeitlicher und molekularer Ebene unmittelbar ineinander über [37, 38].

1.4.1 Entzündungsreaktion

In Folge des Traumas kommt es neben direkten Zellschäden auch zu Gefäßrupturen und der Formierung eines Hämatoms. Dies löst eine starke pro-inflammatorische Reaktion aus [39]. Durch das Hämatom kommen über das Extravasat einerseits Zellen aus der Peripherie wie Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in den Verletzungsbereich, andererseits führt die mangelnde Blutversorgung zu einer Gewebhypoxie, was in einer zusätzlichen Nekrose der umliegenden Muskelzellen und Endothelzellen resultiert [40]. Die Gewebhypoxie bewirkt eine Senkung des pH-Wertes in der Läsionsloge und zwingt die ansässigen Zellen zu einem anaeroben Stoffwechsel. Endothelzellen können dies nicht kompensieren, sodass die zunehmende Zellnekrose eine Vasodilatation mit zusätzlicher Störung der Blut-Muskel-Barriere verursacht und die Leukozyteninfiltration verstärkt wird [39]. Durch den Release von Hypoxie-induzierten Faktoren wird einerseits die Revaskularisierung angeregt, jedoch resultiert die Hypoxie zunächst in der Anhäufung von Debris und triggert dadurch andererseits eine inflammatorische Antwort [41]. Die zum anaeroben Metabolismus fähigen Zellen – Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten – prägen zunächst das Bild der Frühphase der Inflammation. Ferner aktivieren freigesetzte Anaphylatoxine Mastzellen aus der Peripherie und im Läsionsgebiet angrenzende Zellen [42].

Neutrophile Granulozyten reagieren auf den durch Zelluntergang entstandenen Debris mit einer Proteolyse dieser Zellen. Hierdurch kommt es jedoch zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche zum sekundären Zellschäden führen können [43]. Durch die Freisetzung von Zytokinen wie TNF α , Stickstoffmonoxid, IL-2, IL-12 und IL-6 wird die pro-inflammatorische Reaktion verstärkt und induziert die folgenden Phasen des Regenerationsprozesses [44].

Die Phagozytose von Debris und neutrophile Granulozyten erfolgt durch die Makrophagen, um die Menge an nekrotischem Gewebe zu reduzieren. Diese invadieren über die Blutgefäße oder aus dem umgebenden Bindegewebe und werden durch Gewebeläsionen aus ihrem Ruhezustand aktiviert [45]. Sie präsentieren sich in verschiedenen Subtypen. Die Benennung der Subtypen orientiert sich an ihrem Expressionsmuster in Reflexion der Subtypen der T-Helferzellen. Im Rahmen der Muskelregeneration sind vorrangig die Subtypen 1 und 2a + c relevant. Die Einteilung in zwei Haupttypen spiegelt jedoch nicht Plastizität und Diversität der Makrophagen wider [46]. In jedem Makrophagentyp finden sich zeitgleich beide – pro- und anti-inflammatorische – Expressionen statt, sodass stets eine Mischung aller Phänotypen im Leukozyteninfiltrat besteht [47]. Je nach Zeitpunkt der Inflammation überwiegt jedoch ein Phänotyp. In der Frühphase bis zum zweiten Tag nach Trauma finden sich vorrangig Typ 1-Phänotypen [48]. Die Typ 1-Makrophagen (CD68+ CD163-) wirken vorrangig pro-inflammatorisch [49]. Sie stehen daher in engem Kontakt mit T-Helferzellen Typ 1 (Th1) und fördern eine Typ 1-Immunreaktion [50].

Eine Typ 1-Immunreaktion wird durch Interferon- γ gefördert, welches zwischen erstem und fünften Tag ansteigt [51]. Im mdx-Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass IFN- γ ebenfalls den Makrophagen-Phänotyp reguliert. Beim Anstieg von IFN- γ verschiebt sich das Expressionsmuster der Makrophagen hin zu Typ 1 [52]. Die dadurch promovierte phagozytotische Funktion der Makrophagen zum Debridement des Gewebes hemmt wiederum die TNF-Expression und erhöht die TGF β -Sekretion durch die Makrophagen. Dadurch werden wiederum folgende anti-inflammatorische Phasen eingeleitet. Eine Inhibition von mit resultierender M1-Expressionsreduktion bzw. eine Reduktion des Debridements führte in diversen Untersuchungen zu einer verzögerten Muskelregeneration [53, 54]. Über einen CIITA-Signalweg über MHC-II-Komplexe reguliert IFN- γ außerdem die Genexpression von Myogenin durch eine mögliche Inhibition der Differenzierung von mesenchymaler Vorläuferzellen wie beispielsweise Satellitenzellen [55].

Zusammenfassend bewirkt ein überwiegendes M1-Expressionsmuster eine Förderung der pro-inflammatorischen Reaktion. Käme es zu einer M1-Persistenz, wären Heilungsverzögerung und vermehrte Fibrosierung mit resultierendem Funktionsverlust die Folge [56]. Im Rahmen einer unbeeinflussten Entzündungsreaktion kommt es zu einer vermehrten Sekretion von IL-10 durch Monozyten und Th2-Lymphozyten. Dadurch wird etwa am dritten Tag nach Trauma ein Phänotyp-Switch zu den anti-inflammatorischen Expressionsmustern der Makrophagen des Typ 2 (CD68-CD163+) über einen AMP-Kinase-Weg unter vermehrter Expression von CD163 induziert [57, 58]. CD163 ist ein transmembranständiges Protein der Makrophagen, dessen Expression durch die hohen TNF-Level der Frühphase supprimiert wird [59]. Zum anti-inflammatorischen Prozess trägt durch Bindung von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen bei, was durch Toxinreduktion sekundäre (Ischämie-) Schäden reduziert [60].

Durch den Phänotypwechsel der Makrophagen wird einerseits die Spätphase der Inflammation eingeleitet, aber auch die Myoblastendifferenzierung zu Myozyten gefördert [52, 53]. Während der Makrophagen Typ 2a erst spät bei der Geweberegeneration auftritt und eine Fibrosierung stimulieren kann, trägt der Typ 2c außerdem zur Angiogenese, Expression von EZM-Proteinen und zur Aktivierung von Satellitenzellen bei [61, 62]. Die Typ 2 Makrophagen dominieren das Zellbild zwischen vierten und siebten Tag nach Trauma [48, 53]. Dies determiniert den Beginn der Muskelregeneration.

1.4.2 Regeneration und Remodelling

Die Einleitung der Regenerationsphase erfolgt bereits durch die Aktivität der Typ 1-Makrophagen durch Aktivierung der myogenen Vorläuferzellen – den Satellitenzellen [63]. Satellitenzellen wurden bereits 1961 durch Mauro et al. beschrieben und stellen ca. 2-7% der Zellen der Muskulatur dar [64]. Sie liegen in ihrem Ruhezustand zwischen Sarkolemm und Basallamina. Von ihnen geht die regenerative Kapazität der Muskulatur aus [65]. Eine Depletion der Satellitenzellen führte zu einer ausbleibenden Regeneration [66, 67]. Im Alter sinkt die Anzahl der residierenden Satellitenzellen, wodurch die regenerative Kapazität verringert wird [68]. Daher wird ihnen bei der Muskelregeneration eine Schlüsselrolle zugesprochen [69].

Sie entstammen der mesenchymalen Zellreihe und sind Pax7+ [70]. Im Ruhezustand exprimieren sie wenig bHLH (MyoD-). Ein Muskeltrauma triggert über Komplementfaktoren und diverse Wachstumsfaktoren sowie Zytokine (PDGFP-BB, EGF, IL-6, TGF β , FGF, IGF, HGF) den Wiedereinstieg in den Zellzyklus (MyoD +)[71-73]. Durch diese Aktivierung während der Frühphase der Inflammation beginnen die Satellitenzellen zu proliferieren. Ihre Proliferationszeit beträgt etwa drei bis sieben Tage. Durch asymmetrische Zellteilung kann die Satellitenzellreserve aufrechterhalten werden. Diese Reservezellen verlassen den Zellzyklus und residieren in im Ruhezustand [74]. Die übrigen Tochterzellen können Myogenin exprimieren und schließlich über Differenzierung zu Myoblasten sowie Zellfusion mit bereits bestehenden Muskelzellen oder anderen myogenen Vorläuferzellen zu multinukleären Muskelzellen – sogenannten Synzytien – wachsen [21, 75]. Dabei interagieren sie über Sekretion von MCP-1, FKN und VEGF mit Monozyten, wodurch die Interaktion der Makrophagen mit den Myoblasten via Zelladhäsion gesteigert wird [76]. Dies stimuliert die Zellfusionen der Myoblasten [53].

Reguliert werden die Satellitenzellen durch Fibroblasten. Ihre Anzahl im Bereich der Muskelläsion steigt nach dem Trauma ebenfalls stark an. Eine Depletion der Fibroblasten führte zu einer verfrühten Satellitenzellendifferenzierung mit resultierend kleineren Muskelfasern [77]. Sie tragen zur Formation und Differenzierung von Myofibroblasten bei [78]. Daher sind sie durch Synthese und Modulation des Gewebes der EZM ebenfalls an einer Fibrosierung beteiligt. Je nach Balance von Typ 1 und Typ 2-Immunantwort trägt ihr Metabolismus zur Regeneration oder Fibrosierung mit Narbenbildung bei [13, 77].

An einer Fibroseentstehung sind weiterhin interstitielle Zellen beteiligt. Hier sind vorrangig fibroadipogene Vorläuferzellen aus Adipozyten zu nennen [79]. Diese liegen vorrangig im Fettgewebe zwischen den Muskeln. Zusammen mit Makrophagen können sie Produktion und Abbau der Extrazellulärmatrix und damit den Umfang der Fibrose regulieren. Die Kontrolle erfolgt hier vorrangig durch TGF β aus M2a-Makrophagen [80]. TGF β wirkt dabei insbesondere auf MMPs und TIMP [81]. Inhibiert werden kann TGF β dabei durch Interferon, Relaxin und Suramin, was wiederum die Muskelregeneration fördert [82-84]. Auch der Einsatz von PRP, wie oben bereits beschrieben, kann die Wirkung von TGF β inhibieren [85]. Entscheidend für den Ausgang der regenerativen Prozesse ist das Verhältnis der drei Isotypen [86]. Während ein erhöhter Level an TGF β 3 zu einer verbesserten Wundheilung beitragen kann, kann TGF β 1 in der Spätphase der Inflammation eine Fibrose durch Anhäufung von Kollagen I fördern und die Differenzierung der Satellitenzellen bzw. die Fusion der Myoblasten hemmen [87].

Das Remodelling führt die Prozesse der Regeneration zu einer abschließenden Reorganisation des Bindegewebes. Es finden Umbauprozesse des Bindegewebes im Bereich der Extrazellulärmatrix, aber auch der Myofibrillen statt [88]. Die Myofibrillen fusionieren weiter zu kontraktiven Muskelfasern. Durch Verknüpfung von neuromuskulären Verbindungen kann so zum Abschluss der Muskelregeneration eine wieder funktionsfähige Einheit entstehen. Notwendig hierfür ist weiterhin eine funktionierende Blutversorgung, welche eine Rückkehr zum aeroben Metabolismus der Zellen und das Wachstum der Muskelfasern ermöglicht. Winkler et al. konnten im Rahmen eines Quetsch-Traumamodells der Ratte eine Rekapillarisation des Gewebes bereits zum Beginn des Remodellings beobachten [89].

Das Ende der Muskelregeneration ist gekennzeichnet durch einen Rückgang der lokalen Zellinfiltration mit Wiedererlangen einer Gewebemöostase. Der gesamte Regenerationsprozess bis zur abgeschlossenen Restrukturierung dauert circa vier Wochen [79].

1.5 Die Bedeutung der T-Zellen im Kontext der Muskelregeneration

Im Rahmen der Leukozyteninfiltration zu Beginn der inflammatorischen Reaktion gelangen auch Lymphozyten an den Ort der Muskelläsion. Es ist bekannt, dass sowohl T- als auch B-Zellen an Regenerationsprozessen in muskuloskelettalen Geweben beteiligt sind. So konnte in mehreren Studien eine Beteiligung der Lymphozyten an der Knochenheilung nachgewiesen werden [90, 91]. Im Rahmen dieser Arbeit soll vorrangig die Dynamik und der Einfluss von T-Zellen beleuchtet werden, sodass im Folgenden insbesondere bereits bekannte Funktionen und Regulationsmechanismen der T-Lymphozyten, welchen in Bezug auf die Muskelregeneration eine wichtige Rolle zugesprochen wird, dargelegt werden sollen [92].

Im Rahmen eines Muskeltraumas kann sich die lokale Anzahl der CD4+ und CD8+ T-Zellen um 30-60 % der normalen Level erhöhen [93, 94]. Sie sind über viele Regulationsmechanismen an muskulären Regenerationsprozessen beteiligt. Bereits zu Beginn der inflammatorischen Reaktion können T-Zellen beispielsweise CCL2 freisetzen, um so über die CCL2/CCR2-Achse die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen an den Läsionsort zu unterstützen [54]. Nach Ablation von CCL2 im Mausmodell oder CD8-Depletion mit resultierendem CCL2-Mangel konnte umgekehrt eine reduzierte Regenerationsfähigkeit, verringerte Anzahl an Satellitenzellen und erhöhte Fibrosierung gezeigt werden [95, 96].

Übrige Funktionen der T-Zellen im Rahmen der Immunhomöostase des Muskels sind bisher insbesondere für regulatorische T-Zellen (Treg) untersucht. Inaktiv residieren T-Zellen auch in unverletzter Muskulatur [97]. Muskuläre T-Zellen entstammen einer Subpopulation der natürlichen regulatorischen T-Zellen (natural Treg) welche im Thymus durch Expression des Master-Kontrollgens FoxP3+ reifen [98]. Im Muskel machen sie 50-60 % der CD4+ T-Zellen aus [93, 99]. Sie sind in ihrer aktivierten Form überwiegend CD3+CD4+CD25+ und exprimieren FoxP3 an ihrer Oberfläche. Durch ihre Gewebsspezifität ist eine bessere Anpassung an die muskuläre Nische gegeben, wodurch ihre Überlebensrate erhöht werden kann [100].

Ihre bisher bekannten Funktionen sind vielseitig: Durch ihre Beteiligung an der Rekrutierung myeloischer Zellen und der Sekretion von IL-10 sowie der Inhibition von IFN- γ regulieren sie die Art der Immunantwort ab Beginn der Inflammation [101]. Wie oben beschrieben, führt die Erhöhung der lokalen IL-10-Level zu einem Phänotyp-Wechsel der Makrophagen. Durch zusätzliche Inhibition von Interferon γ aus konventionellen T-Zellen kann so die inflammatorische Reaktion zu einer Typ 2-Immunantwort verändert werden. Regulatorische T-Zellen wirken so anti-inflammatorisch und immunsuppressiv.

Durch zusätzliche Sekretion von Amphiregulin (= EGF) wirken Treg zusätzlich gewebeprotectiv und fördern die Differenzierung von Satellitenzellen [102]. Dadurch sind regulatorische T-Zellen unmittelbar an der Muskelregeneration beteiligt. Ex vivo konnte unter Einfluss von regulatorischen T-Zellen eine klonale Expansion von Satellitenzellen beobachtet werden, sodass Treg ebenfalls am Erhalt der myogenen Potenz beteiligt sind [103]. Im Einklang zu diesen Beobachtungen steht ebenfalls, dass im Alter neben der reduzierten Anzahl der Satellitenzellreserve auch die Anzahl der im Muskel ansässigen regulatorischen T-Zellen verringert ist [52].

Eine CD25-Depletion im mdx-Mausmodell zeigte eine Exazerbation der inflammatorischen Reaktion bei verstärkter Typ1-Immunantwort mit reduzierter M2-Expressionsmuster, Entwicklung kleinerer Muskelfasern und vermehrter Fibrosierung des Gewebes [93]. Im Gegensatz dazu konnten Vetrone et al. bei Osteopontin-defizienten mdx-Mäusen eine verstärkte Typ 2-Immunantwort beobachten. Hier zeigte sich eine anti-fibrotische Wirkung von FoxP3+ T-Zellen durch vermehrte Sekretion von Relaxin-3 und verringerten TGF β 1-Level [104].

Ferner schützen Treg über HO-1 endotheliale Zellen durch Häm-Degradierung. Dadurch wird die Angiogenese und Revaskularisierung des verletzten Gewebes unterstützt [105]. Durch Inhibition von Aktivierung und Proliferation konventioneller T-Zellen sowie der Expression von Granzym B und des dadurch katalysierten Perforin-abhängigen Zellabbaus wird die Anzahl der sogenannten „Responder-Cells“ und damit das Ausmaß der Immunantwort ebenfalls limitiert [106].

Im Gegensatz zur Funktion der (CD4+) regulatorischen T-Zellen ist wenig über die Funktion der CD8+ T-zellen im Rahmen der Muskelregeneration bekannt. Marklund et al. konnten ein erhöhtes Verhältnis von CD8+ zu CD4+ Zellen bei andauernder gleichförmiger Belastung nachweisen [107]. Parallel zeigten sich eine erhöhte Anzahl an MHC-I, welche sonst in unverletztem Muskel oder nur kleineren Muskelläsionen nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können [108]. Die konkrete Funktion der CD8+ T-Zellen im Rahmen der Muskelregeneration ist bisher nicht bekannt. Jedoch konnte nach rezidivierenden Muskelzerrungen, wie sie bei regelmäßigem Training häufig vorkommen, neben einer muskulären Hypertrophie und einer vermehrten Satellitenzellreserve auch eine T-Zell-Akkumulation im Sinne eines Memory-Effektes mit erhöhten CD8+ T-Zell-Level nachgewiesen werden [109].

Insgesamt ist jedoch über die Funktion der Lymphozyten in Bezug auf die Muskelregeneration nicht ausreichend bekannt, um daraus neue praktikable Therapieansätze zu generieren, welche translational eingesetzt werden könnten. Bezogen auf andere zelluläre oder molekulare Akteure des regenerativen Prozesses gibt es bereits einige innovative therapeutische Konzepte.

1.6 Innovative therapeutische Ansätze zur Behandlung von Skelettmuskelverletzungen

1.6.1 Neue molekulare Therapiekonzepte

Auf molekularer Ebene erscheinen insbesondere Wachstumsfaktoren wie HGF, VEGF oder IGF einen entscheidenden Einfluss auf das Outcome der Muskelheilung zu haben [110]. Dabei können sie je nach Regenerationsphase positive oder negative Wirkung haben [111]. So konnten Grasman et al. nach Gabe von HGF eine vermehrte Satellitenzellaktivierung und -differenzierung beobachten. Eine verbesserte Funktionalität konnte jedoch erst nach prolongierter Gabe erzielt werden [112]. Pumberger et al. beschrieben zuletzt eine verbesserte Regeneration der Muskelkraft nach lokaler Transplantation von mehreren Wachstumsfaktoren auf eine Alginat-Trägerscaffold zur konstanten und kontinuierlichen Freisetzung [113]. Daher erscheint eine Kombination aus Wachstumsfaktoren und der Anwendung von Biomaterialien durchaus vielversprechend. Alternativ erscheint es sinnvoll, sich jene Zellen als Therapeutikum nutzbar zu machen, von welchen die Wachstumsfaktoren bzw. para- und autokrinen Effekte ausgehen, um die Muskelregeneration zu fördern. Tissue Engineering soll daher neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

1.6.2 Neue zelluläre Therapiekonzepte

Als einfacher und logischer Ansatz erscheint die lokale Transplantation von Satellitenzellen, da sie die regenerative Potenz der Muskulatur darstellen. So zeigte sich schon nach Transplantation einer einzelnen Satellitenzelle histologisch ein positiver Effekt mit Proliferation, Differenzierung und gleichzeitigem Erhalt der Stammzellreserve [114]. Eine Dosisabhängigkeit konnte dabei nachgewiesen werden [115]. Nach lokaler Transplantation zeigte sich durch vermehrte SC-Differenzierung eine verbesserte Kontraktilität nach abgeschlossener Heilung [116, 117]. Problematisch zeigte sich jedoch die kulturelle Anzucht der Zellen, da sie durch eine spontane Differenzierung zu Myoblasten schließlich ein geringeres myogenes Potenzial zeigten [118]. Darüber hinaus erscheint die autologe Transplantation nicht sinnvoll, da die Isolation der Zellen bei geringer Konzentration im Muskel erschwert ist und der Donor einem zusätzlichen Trauma ausgesetzt wird. Beeinflussbar ist der Transplantationserfolg aber auch hier durch den Einsatz von Hydrogelen oder andere Substrate [119, 120].

Ebenfalls positive Effekte auf die Muskelregeneration hatte die Transplantation von Perizyten [121]. Insbesondere der Einsatz von MDSC, welche dem mesenchymalen Keimblatt entstammen und sich so selbst zu Myoblasten, aber auch anderen Geweben ausdifferenzieren können [122], scheinen in Kombination mit Trägermaterial aus EZM und Wachstumsfaktoren bei Verletzungen an Grenzschichten, wie beispielsweise dem Muskel-Sehnen-Übergang, förderlich zu wirken [123]. Aber auch Mesangioblasten können noch zu multinukleären Muskelsynzytien differenzieren. In einem Mausmodell mit Kryoverletzung zeigte sich hier zudem ein Wiederaufbau des Satellitenzell-Pools, sodass möglicherweise auch erneute oder sekundär verletzte Muskulatur ein verbessertes Regenerationspotenzial besitzen können [124].

In den letzten Jahren zeigten sich außerdem mesenchymale Stammzellen als potenzielle Kandidaten für ein erfolgreiches Tissue Engineering. Diese besitzen ein hohes regeneratives Potenzial [125]. Sie können ebenfalls in mesenchymale Gewebe wie Fett, Knorpel, Muskel oder Knochen differenzieren [126]. Zusätzlich lassen sie sich verhältnismäßig einfach aus Fettgewebe, Tonsillen, Nabelschnurblut oder Knochenmark isolieren [127], in einer Kultur expandieren [128] und sind sogar noch nach einer Woche erfolgreich transplantierbar [129], sodass autologe und allogene Anwendungen denkbar sind. Ihnen werden endokrine und parakrine Wirkmechanismen zugeschrieben [126, 130], welche sich auf Zellmigration, -entwicklung und auch Angiogenese auswirken können. So ist eine lokale Immunmodulation mit Einfluss auf die Funktionen von Myoblasten möglich. Die Arbeitsgruppe von Winkler et al. konnte im Rattenmodell nach Quetschtrauma eine erhöhte isometrische Kontraktionskraft sowohl bei früher und später Transplantation von MSC nachweisen [129]. Dabei konnte eine Geschlechterunabhängigkeit bei gleichzeitiger Dosisabhängigkeit dargestellt werden [131, 132]. Im Rahmen einer klinischen Studie zeigte sich eine Regeneration sowohl bei intramuskulärer als auch intra-arterieller Gabe von autologen MSC aus dem Knochenmark [131, 133, 134]. Pumberger et al. und Winkler et al. konnten nach Transplantation die Entstehung von Regeneratfasern darstellen [113, 135]. Parallel dazu zeigte sich eine deutlich verbesserte Funktionalität der MSC durch Zusatz von IGF und VEGF [113, 136].

Insgesamt erscheinen zell- und molekularbasierte Therapieansätze vielversprechend in Tiermodellen. Jedoch sind einige Modell klinisch nur schwer umsetzbar. Aktuell finden sich daher im Bereich der orthopädisch-unfallchirurgischen Klinik nur vereinzelt Studien, die bereits einen translationalen Ansatz verfolgen [137]. Ergebnisse dieser klinischen Studie sind derzeit noch ausstehend.

1.7 Traumamodelle im gegenwärtigen Forschungskontext

Relevant für die Übertragbarkeit der therapeutischen Ansätze auf klinisch relevante Muskeltraumata erscheint ebenfalls die Darstellung der Muskeltraumas in experimentellen Grunduntersuchungen. Hierzu kommen insbesondere Modelle, welche klinische Krankheitsbilder wie Muskelzerrungen, -kontusionen, Lazerationen oder Muskelquetschungen imitieren eher in Frage als Injektionen mit Kardiotoxin, Kryo-Verletzungen oder mdx-Mausmodelle, da sich toxische oder ischämische Läsionen durchaus spontan zurückbilden können oder besondere Pathomechanismen generieren, welche mechanischen Verletzungsmustern nicht zugrunde liegen [138].

Relevant erscheint daher insbesondere das durch Matziolis et al. etablierte Quetschtrauma des Musculus soleus im Rattenmodell [133], welche zu ausgeprägten Muskelläsionen führt, jedoch die Versorgungsstrukturen unter Wahrung der Gefäß-Nerven-Strukturen intakt lassen. So lassen sich auch reproduzierbare biomechanische Veränderungen darstellen. Diese Arbeit entlehnt sich dieses Traumamodells, da es ein Abbild iatrogenen Verletzungsmuster darstellen kann.

1.8 „Clinical need“ und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Notwendigkeit dieser Arbeit ergibt sich, wie oben bereits ausführlich beschrieben, aus dem mangelnden Wissen über den Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Regeneration schwer verletzter Skelettmuskulatur. Insbesondere für die Prävention und Therapie iatrogenen Muskelläsionen sind diese Informationen essentiell, um daraus neue Therapiestrategien entwickeln zu können. Vorherige Studien haben nur wenige Informationen über die zeitliche Präsenz von T-Zellen und deren Verhältnis aus CD4+ und CD8+ T-Zellen geliefert. Zudem fehlt bisher eine Darstellung der direkten Wirkung von CD4+ und CD8+ T-Zellen auf die Regeneration der Muskelkraft.

Die Zielsetzungen dieser Arbeit sind

- (1) eine longitudinale Betrachtung des T-Zellvorkommens in schwer verletzter Skelettmuskulatur unter Berücksichtigung des CD4+/CD8+ Verhältnisses zum Zeitpunkt ihres maximalen Vorkommens sowie
- (2) eine Darstellung der Regenerationsfähigkeit der Muskelkraft schwer verletzter Skelettmuskulatur unter isolierter Depletion von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss der adaptiven Immunität auf die Heilung schwereren Muskeltrauma (Quetschtrauma des linken M. soleus) im Rattenmodell untersucht. Zur quantitativen Beurteilung des Heilungsergebnisses wurde der relative Muskelkraftverlust zur unverletzten kontralateralen Seite nach 28 Tagen bestimmt. Veränderungen in Immunzellzusammensetzung im Zuge einer schweren Muskelverletzung im Gewebe und peripheren Blut wurden mittels Durchflusszytometrie longitudinal über 14 Tage analysiert. Hierbei wurde sich besonders auf verschiedenen T-Zellsubpopulationen fokussiert. Um eine Ursächlichkeit zwischen spezifischen Immunzellpopulation und dem Heilungsergebnis zu untersuchen, wurden gezielt CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen vor der Verletzung gezielt depletiert und der relative Muskelkraftverlustes nach 28 Tagen bestimmt.

Im Einklang mit den 3R-Prinzipien wurden für diese Studie Versuchstiere genutzt, welche Teil einer größeren Studie waren, welche das Ziel verfolgte Zell-basierte Therapien zur Verbesserung der Muskelheilung zu untersuchen. An allen Versuchstieren wurde daher mit einem zeitlichen Abstand von mindestens drei Wochen zur ersten Behandlung dieser Arbeit eine Knochenmarksbiopsie aus der rechtseitigen Tibia mit ventralem Zugang vorgenommen. Die anschließende Weiterbehandlung der Tiere erfolgte stets bei klinischer Symptomfreiheit bzw. unauffälligem Tierverhalten. Zudem wurde im Rahmen der Trauma-Operation jedem Tier ein Alginat-Scaffold transplantiert. Eine Scaffold-Muskel-Wechselwirkung durch Ergebnisse aus Voruntersuchungen ausgeschlossen werden [113].

2.2 In vitro

2.2.1 Bezug der Alginat-Scaffolds

Die Alginat-Scaffolds wurden von Timoor Qazi nach einem standardisierten und etablierten Protokoll hergestellt [113, 128]. und bestanden aus einem Gemisch aus hochreinem Alginat-Pulver (Pronova UP, Novamatrix, Oslo, Norwegen) mit hohem (250 kDa; MVG) und geringem (50 kDa, LVG) molekularem Gewicht im Verhältnis 1:2, welches im Herstellungsprozess lyophilisiert wurde. Die Alginat-Scaffolds waren quaderförmig und hatten eine Größe von 8 mm x 3 mm x 3 mm. Sie wurden stets innerhalb von 72 Stunden nach Herstellung in die Loge des verletzten Muskels exakt auf die Höhe der Gewebsverletzung transplantiert. Das genaue Vorgehen wird im Folgenden beschrieben.

2.3 In vivo

2.3.1 Versuchstiere

Für die nachfolgenden Versuche wurden 58 weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200 – 300 g (Charles River, Sulzfeld, BRD) eingesetzt. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei 20 °C Raumtemperatur (35 % Luftfeuchtigkeit) gehalten und waren an einen artgerechten Tag-Nacht-Rhythmus angepasst. Sie hatten freien Zugang zu Futter (Altromin Pellets, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, BRD) und Wasser. Als Eigewöhnungszeit vor Beginn der Versuche wurden mindestens sieben Tage gewährt. Die Versuchsdurchführung erfolgte in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin am Standort Campus Virchow-Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Allgemeinzustand der Tiere und Wundverhältnisse wurden mehrfach pro Woche kontrolliert. Um eine Unterscheidung der Tiere gewährleisten zu können, erfolgte vor Beginn jeder Behandlung eine farbliche (Nach-) Markierung des Rattenschwanzes. Jedem Beteiligten des Versuchsablaufes war die Bedeutung der Farbcodierungen bekannt.

Die Versuchsreihen unterlagen den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 2 und § 8 des Tierschutzgesetzes. Diese wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) in Berlin genehmigt (Tierversuchsantrag G 0119/12). Durchgeführt wurden die Versuche im Zeitraum von Januar 2016 bis Juli 2017.

2.3.2 Einteilung in Versuchstiergruppen

Eine Zuteilung der Versuchstiere in die Versuchsgruppen mit vorgegebenem Behandlungsschema und Festlegung des primären Endpunktes erfolgte bereits vor der ersten Behandlung (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Behandlungsablauf der Versuchstiergruppen mit entsprechend definiertem primären Endpunkt und anschließendem Analyseverfahren (DFZ von peripherem Blut und explantierter Muskulatur, MFM)

Versuchsgruppen		Tag -2	Tag -1	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 28
Kontrolle	1d			Trauma, AlgTx	DFZ				
	3d					DFZ			
	7d						DFZ		
	14d							DFZ	
	28d								MFM
Isotyp	28d	Isotyp AK	Isotyp AK					MFM	
CD4⁻	28d	CD4 Depletion	CD4 Depletion					MFM	
CD8⁻	28d	CD8 Depletion	CD8 Depletion					MFM	

Blutentnahmen fanden standardisiert bei allen Tieren an Tag 0 sowie bei den Tieren in den Versuchsgruppen mit Zelldepletionen zusätzlich an Tag -2 vor der ersten Depletion statt. Zudem wurden im Rahmen der Euthanasie ebenfalls Blutproben der Tiere asserviert. Die jeweiligen durchflusszytometrischen Analysen erfolgten stets am Folgetag der Probenasservierung.

2.3.3 Antikörper-Applikation zur gezielten Zelldepletion

Vorab wurden die Antikörper in eine Tuberkulin-Spritze (Omnifix-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) aufgezogen. Die Tiere wurden nicht sediert oder analgisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal mit Hilfe einer 27G Kanüle (Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD). Es wurden pro Tier und entsprechend der Versuchsgruppe je 300 µl CD8- (Mouse anti-rat CD8 A:Low Endotoxin MCA48EL, AbdSerotec, UK), CD4-Antikörper (mouse anti-rat CD4 NA/LE, BD Biosciences, USA) oder Isotyp-Antikörpern (Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (BALB/c) MG1-45, BioLegend, USA) 48 und 24 Stunden vor dem Muskeltrauma verabreicht. Eine Kontrolle der Depletion erfolgte mittels Durchflusszytometrie des peripheren Blutes, welches den Tieren am Tag der Verletzungsoperation präoperativ wie nachfolgend beschrieben abgenommen wurde.

2.3.4 Blutentnahme

Die Tiere wurden initial durch eine Inhalationsnarkose mit einem 5 %-igen Isoflurangemisch bei einem Fluss von 2 Litern O₂ narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde bei 2-2,5 % Isofluran und einem Fluss von 0,6-0,7 Litern O₂ erhalten. Dabei wurden regelmäßig Atmung, Puls, Hautdurchblutung und Narkosetiefe (durch Reflexprüfung und Setzen eines gezielten Schmerzreizes) kontrolliert. Es erfolgte eine Analgesie mittels eines Gemisches aus Carprofen (Rimadyl, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, BRD) und 0,9 %-iger NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) im Verhältnis 1:3 als s.c.-Injektion (finale Dosis ca. 5-10mg/kg KG Carprofen) mittels einer 27G Kanüle in die Nackenfalte. Das Fell der Hinterläufe wurden mit einem Handrasiergerät (Remington, Modell MB-320C, Ellwangen, BRD) gekürzt.

Für die präoperative Blutentnahme wurden die Tiere auf dem Bauch gelagert und die Venen des linken Hinterlaufs proximal des Knies mittels eines 3-0 Vicryl-Fadens (Ethicon, USA) gestaut. Eine hervortretende Vene wurde anschließend mit Hilfe einer 20G Kanüle perkutan punktiert. Durch eine Kombination aus Spritze und einer 23G Kanüle konnten dann einige Quelltropfen Blut ausgesogen werden. Spritze und Kanüle wurden zuvor mit Citrat gespült, um das gewonnene Blut an Aggregationsprozessen zu hindern. Anschließend wurde das Blut für jedes Tier in je einen EDTA-Vacutainer überführt und die Blutung an der Punktionsstelle nach Entstauung durch manuelle Kompression für ca. 30 Sekunden gestillt.

2.3.5 Muskeltrauma (*Quetschtrauma-Modell*)

Die Narkoseeinleitung und präoperative Vorbereitung erfolgte wie oben (siehe Kapitel „2.3.4 Blutentnahme“) beschrieben. Zum Schutz der Augen wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, BRD) auf die Hornhaut beider Augen aufgetragen. Anschließend wurden die Tiere auf dem Bauch gelagert und der linke Hinterlauf distal im Bereich direkt oberhalb des Fersenbeines mit Hilfe einer Fadenschlinge und einem damit verbundenen Klemmchen als Gewicht in axiale Traktion gebracht. Dadurch sollte der jeweilige Muskeltonus ausgeglichen werden. Zur Desinfektion des Operationsgebietes wurde ungefärbtes Softasept N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) verwendet und dieses anschließend zirkulär steril abgedeckt.

Der Hautschnitt erfolgte mittels einer 15er Skalpellklinge (Aesculap, Tuttlingen, BRD) entlang des posterolateralen Randes des M. gastrocnemius und der Achillessehne über eine Länge von 1,5-2 cm bis etwa 3 mm oberhalb des Calcaneus. Nach Durchtrennung der Haut wurde diese vom Hautmuskel gelöst. Anschließend wurde der Hautmuskel vorsichtig unterminiert, um keine darunterliegenden Strukturen zu verletzen, und in Längsrichtung durchtrennt. In stumpfer Präparation wurde der M. gastrocnemius freigelegt, von Verwachsungen gelöst und unter Wahrung des dortigen Gefäß-Neven-Bündels der M. soleus dargestellt sowie vorsichtig mobilisiert (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1: Mobilisierter M. soleus (Pfeil) des linken Hinterlaufes einer Ratte nach stumpfer Präparation. (eigene Darstellung)

Für das offene Quetschtrauma wurde der M. soleus direkt proximal der Achillessehne unterminiert und von medial eine krumme Arterienklemme (Aesculap, Tuttlingen, BRD) mit Polyethylenschläuchen-ummantelten Branchen eingeführt. Die Ummantelung der Branchen diente dem Schutz der Muskelfaszie. Durch Schließen der Klemme bis zum dritten Zahn wurde eine Kraft von $112 \text{ N} \pm 5,1 \text{ N}$ [Daten aus vorhergehenden Untersuchungen mittels eines Materialprüfgerätes Zwick 1455 (Zwick GmbH, Ulm, BRD) [89]] auf den Muskel ausgeübt. Jedes Trauma wurde für 20 Sekunden gesetzt. Das erste möglichst distal oberhalb des Muskel-Sehnen-Übergangs und zwei weitere jeweils in Richtung proximal versetzt ohne das Gefäß-Nerven-Bündel zu verletzen. Ein viertes Trauma wurde proximal des Gefäß-Nerven-Bündels mittels eines goldenen, nicht gebogenen Nadelhalters (Aesculap, Tuttlingen, BRD) ebenfalls für 20 s induziert. Jedoch wurde der Nadelhalter nur bis über den ersten Zahn geschlossen (siehe Abbildung 2). Anschließend wurde die Wunde gründlich mit NaCl gespült.

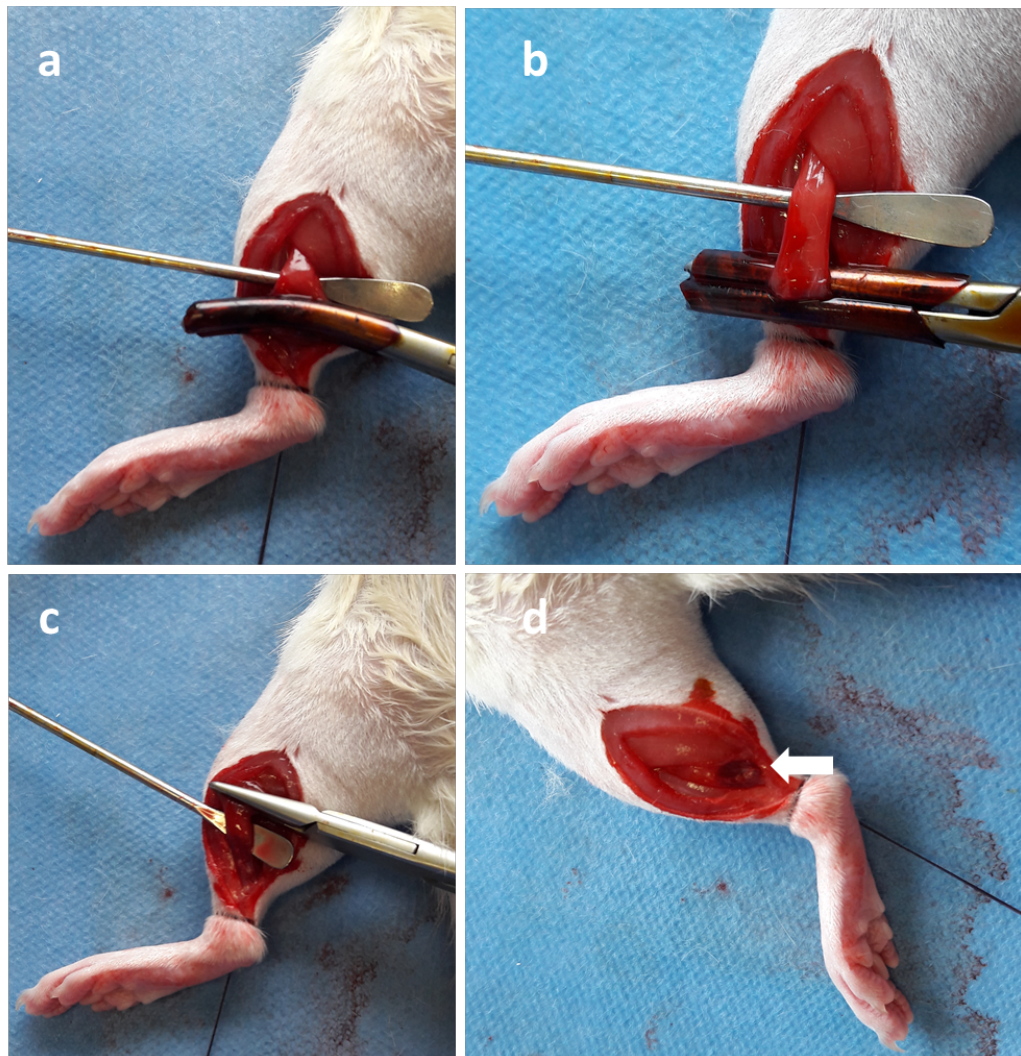


Abbildung 2: Muskeltrauma beginnend mit proximaler (a), mittlerer und distaler (b) Quetschung mittels isolierter Arterienklemme distal des Gefäß-Nerven-Bündels. Anschließendes Crush-Trauma durch Nadelhalter proximal des Gefäß-Nerven-Bündels (c). Sichtbares Quetschtrauma mit beginnendem Muskelhämatom (Pfeil). (eigene Darstellung)

Vor dem Wundverschluss erfolgte die Transplantation des Trägerscaffolds in eine taschenförmig präparierte Aussackung der Muskelfaszie zwischen M. soleus und M. gastrocnemius (siehe Abbildung 3). Anschließend wurde der Hautmuskel durch 3 Einzelknopfnähte mit 3-0 Vicryl adaptiert und die Haut fortlaufend mit dem gleichen Nahtmaterial in 3-4 Stichen spannungsfrei vernäht. Zur Sicherung wurde eine weitere Einzelknopfnah über der Hautnaht angebracht. Die Tiere wurden vor dem Aufwachen von Blutanhaftungen an der betroffenen Extremität mittels NaCl gesäubert, um potenziellen Fremdmutilationen durch andere Tiere vorzubeugen.



Abbildung 3: Transplantation des Alginat-Scaffolds (Pfeil) in die taschenförmig präparierte Muskelfaszienloge zwischen M. soleus und M. gastrocnemius. (eigene Darstellung)

2.3.6 Biomechanische Auswertung

Für die biomechanische Auswertung in Form einer Muskelkraftmessung (MFM) wurden die Tiere zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit 5 % Isofluran bei einem Fluss von 2 Litern O₂ narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde bei 2-2,5 % Isofluran und einem Fluss von 0,6-0,7 Litern O₂ während der Muskel- und Nervenpräparation erhalten. Dabei wurden regelmäßig Atmung, Puls, Hautdurchblutung und Narkosetiefe (durch Reflexprüfung und Setzen eines gezielten Schmerzreizes) kontrolliert. Das Fell der Hinterläufe wurde bis oberhalb des Os sacrum mit einem Handrasiergerät gekürzt. Anschließend wurden die Tiere auf dem Bauch gelagert und der jeweils zu operierende Hinterlauf möglichst distal mit Hilfe einer Fadenschlinge und einem Klemmchen als Gewicht der Länge nach ausgestreckt. Zur Desinfektion des Operationsgebietes wurde ungefärbtes Softasept N verwendet.

Zur beidseitigen Muskelpräparation wurde mit einer 15er Skalpellklinge linksseitig die Narbe der Traumatisierungs-OP ausgeschnitten bzw. rechtsseitig ein gleich verlaufender Hautschnitt gesetzt und der M. soleus analog des Vorgehens entsprechend der Traumatisierung stumpf mobilisiert. Die Achillessehne wurde direkt über dem Calcaneus abgesetzt und der M. gastrocnemius anschließend an seinem Insertionspunkt von der Achillessehne getrennt. Mittels 3-0 Vicryl-Fäden wurden die Mm. solei beidseits innerhalb der Achillessehne durch zweifache Durchstechung angeschlossen. Eine Läsion des Gefäß-Nerven-Bündels wurde dabei vermieden.

Zur beidseitigen Präparation des N. ischiadicus wurde der Hautschnitt nach proximal bis zum Os sacrum über der Ischiocruralen Muskulatur verlängert. Der darunterliegende Hautmuskel wurde unterminiert und mit einer Schere unter Schonung des darunterliegenden Gewebes scharf durchtrennt. Die Darstellung des N. ischiadicus erfolgte beidseits in stumpfer Präparation.

Im Verlauf der operativen Vorbereitung auf die Muskelkraftmessung erfolgte der Wechsel der Narkosestrategie auf eine gewichtsangepasste Injektionsnarkose mit 0,09 ml/100 g KG Ketamin (Ketamin 10%, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, BRD) und 0,07 ml/100 g KG Xylazin (Xylavet, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, BRD) als i.p.-Injektion mittels einer 23G Kanüle. Bei Bedarf wurde Injektionsnarkotikum nachgegeben. Die Inhalationsnarkose wurde nach intraperitonealer Gabe der Medikamente ausgeschlichen. Dadurch konnte eine ausreichende Analgosedierung erreicht werden. Es wurden regelmäßig Atmung, Puls, Hautdurchblutung und Narkosetiefe (durch Reflexprüfung und Setzen eines gezielten Schmerzreizes) kontrolliert.

Bei der biomechanischen Muskelkraftmessung wurden sowohl Kraftentwicklungen der schnell-zuckenden Muskelfasern (fast twitch) als auch der tetanischen Kraftentwicklung (tetanic force) des jeweiligen M. soleus gemessen und in Newton durch eine PC-gestützte Messanlage aufgezeichnet. Die Messanlage (Experimentia, Budapest, Ungarn) wurde durch einen angeschlossenen Laptop (Acer, Taipeh, Taiwan) gesteuert. Genutzt wurde eine für Muskelkraftmessungen programmierte Anwendung (Visual Basic, Version 8, Microsoft, Washington, USA).

Für die Durchführung der Messung wurden die Ratten auf dem Bauch in der Messanlage gelagert und nacheinander die Mm. solei beider Beine vermessen. Dazu wurde das jeweils zu messende Bein durch eine 20G Kanüle fixiert. Die Kanüle wurde dafür zwischen Knie und Hüfte ventral des Femurs durch die Muskulatur in eine Aufhängung geschoben. Der M. soleus wurde in Verlängerung der Beinachse mittels des angeschlungenen Vicryl-Fadens mit dem Kraftabnehmer verbunden. Zuletzt wurde eine Elektrode mit dem N. ischiadicus verbunden, ohne nebenliegende Strukturen zu berühren (siehe Abbildung 4).

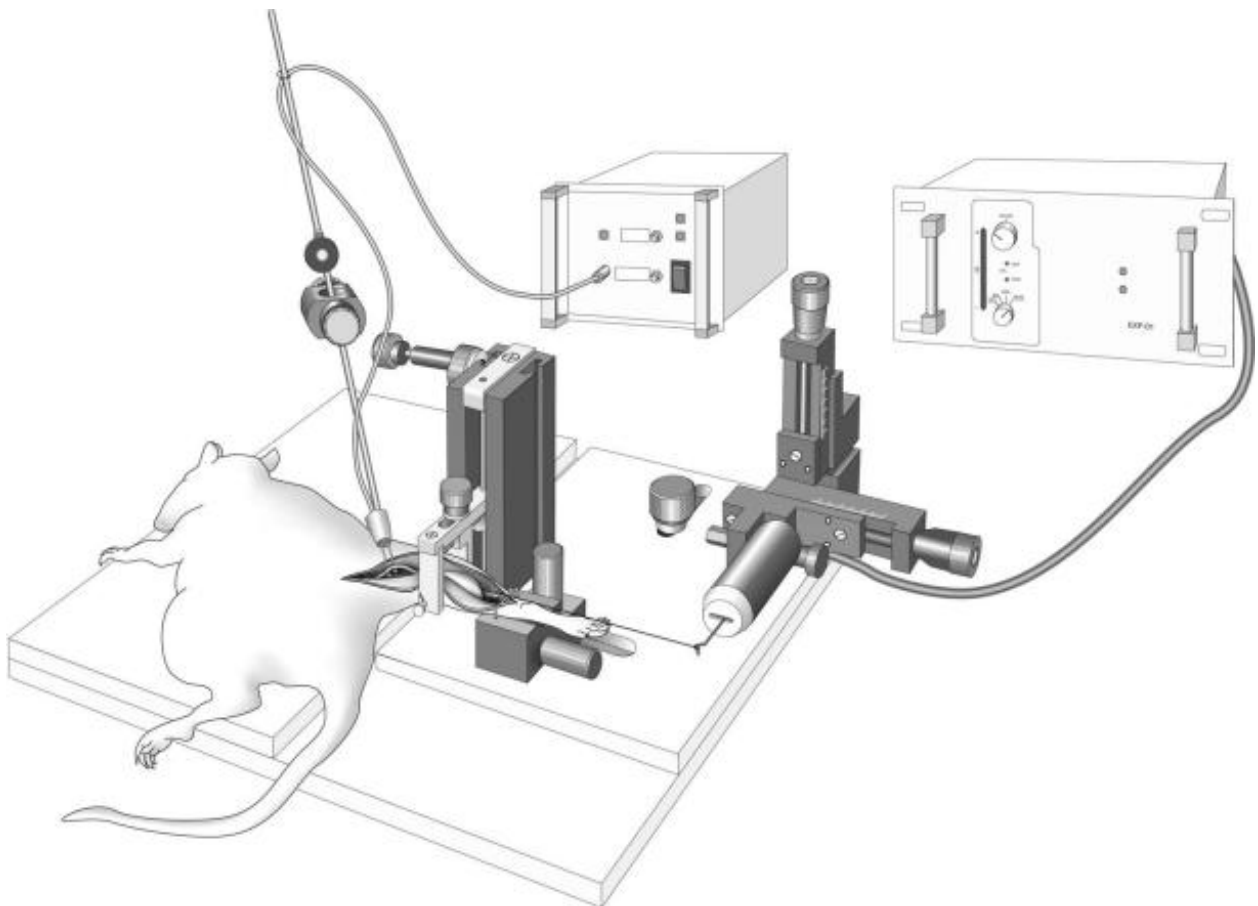


Abbildung 4: Darstellung des Versuchsaufbaus/der Messanlage zur biomechanischen Bestimmung der muskulären Kontraktionskraft (modifiziert aus Winkler et al.[131])

Während der Messphasen wurde der N. ischiadicus jeweils mit bipolarem Strom von 9 mA und 75 Hz gereizt. Das definierte Messprogramm beinhaltete sowohl fast twitch-Stimulationen von acht Durchgängen mit je fünf Kontraktionen und einer Reizdauer von je 0,1 s als auch tetanische Stimulationen von je fünf Kontraktionen mit einer Reizdauer von je 5 s. Zwischen den einzelnen elektrischen Reizen wurden Pausen von 5 s definiert.

2.3.7 Euthanasie und Muskelexplantation

Die Tiere wurden unmittelbar nach erfolgter Muskelkraftmessung durch Herzpunktion mit anschließender Entblutung euthanasiert. Zusätzlich wurde eine letale Dosis Ketamin intrakardial appliziert. Das gewonnene Blut wurde, wie oben beschrieben (siehe „2.3.4 Blutentnahme“), an Aggregationsprozessen gehindert und für weitere Untersuchungen gesammelt.

Post mortem erfolgte die Muskelexplantation durch vorsichtige Präparation der Mm. Solei nach proximal und Durchtrennung des Sehnenansatzes. Um selektiv nur Muskelgewebe zu erhalten, wurden an proximalem und distalem Ende makroskopisch definierbare Sehnenanteile vom Muskelbauch scharf abgetrennt. Die Muskeln wurden anschließend in mit PBS-Medium (ohne Calcium/Magnesium) gefüllte 50 ml Falcons gegeben und zur weiteren Analyse in die Labore des BCRT und JWI verbracht.

2.4 Ex vivo

Die Aufarbeitung der Blutproben und Muskeln erfolgte in den Laboren des BCRT und JWI (Charité Campus Virchow-Klinikum).

2.4.1 Muskeldissoziation

Die Dissoziation (Verdau) der explantierten Skelettmuskeln erfolgte mittels des etablierten „Skeletal Muscle Dissociation Kit – mouse and rat“ [139] der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, BRD) entsprechend des durch den Hersteller empfohlenen Protokolls.

Die Zellen wurden suspendiert in MACS-Pufferlösung in drei gleiche Anteile aufgeteilt. Jeweils einer der Anteile wurde nicht weiter prozessiert und diente als unmarkierte Kontrolle. Diese Anteile enthielten etwa 5×10^5 Zellen pro Probe und wurden durch Zugabe von Formalinlösung (in PBS-/-) fixiert. Eine Lagerung der nach Zugabe von FACS-Pufferlösung, Zentrifugation und Dekantierung erhaltenen Proben erfolgte bei 4 °C.

2.4.2 MACS, Antikörper-Färbung und Durchflusszytometrie (Muskel)

Die übrigen beiden Drittel der Proben wurden im Folgenden zunächst abermals zentrifugiert (350 xg für 6 min.) und die Zellen in FACS-Pufferlösung suspendiert, sowie in FACS-Tubes gegeben. Die Zugabe der verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 2) erfolgte in der Reihenfolge, wie in Tabelle 3 nachvollziehbar.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse

Zielstruktur	Antikörper-Bezeichnung	Hersteller
Live/Dead (L/D)	LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation (L10119)	life technologies, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, BRD
FC-Block	FC-Block (UltraComp eBeads)	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, BRD
CD45	Mouse Anti-Rat CD45 FITC (OX-1)	BD Bioscience, USA
CD3	BV605 Mouse Anti-Rat CD3 (1F4)	BD Bioscience, USA
CD8 α	Anti-Rat CD8a Monoclonal Antibody (OX-8) PE-Cy7	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, BRD
CD44	RPE CD44 Antibody (OX-50)	Bio-Rad (ehemals AbD Serotec), Puchheim, BRD
CD4	V450 Mouse Anti-Rat CD4 (OX-35)	BD Bioscience, USA
CD25	Anti-Rat CD25 PerCP-eFluor® 710 (OX-39)	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, BRD
CD62L/ L-Selectin	Anti-Rat CD62L (L-Selectin) eFluor® 660 (OX-85)	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, BRD

Tabelle 3: Antikörper, Konzentrationen und Hinweise zum methodischen Vorgehen bei der Färbung von Muskelzellsuspensionen mittels markierter Antikörper

Schritt	Antikörper	Volumen in $\mu\text{l/pro } 1 \times 10^6$ Zellen)	Endverdünnung (pro $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension)	Hinweise zum methodischen Vorgehen
0.	Fc-Block-Ak	2	1:50	<ul style="list-style-type: none"> • $1 \mu\text{g}$ pro 1×10^6 Zellen • nicht titriert
1.	Anti-CD45-Ak	2	1:50	<ul style="list-style-type: none"> • nach Zugabe 10 min. auf Eis und im Dunklen inkubiert
2.	Live/Dead-Ak	0,2	1:1000	<ul style="list-style-type: none"> • nach Zugabe 20 min. auf Eis und im Dunklen inkubiert
3.	Anti-CD3-Ak	4	1:25	<ul style="list-style-type: none"> • nach Zugabe 10 min. auf Eis und im Dunklen inkubiert
4.	Anti-CD8 α -Ak	2	1:50	<ul style="list-style-type: none"> • als Master-Mix vorbereitet • nach Zugabe 10 min. auf Eis und im Dunklen inkubiert
	Anti-CD44-Ak	10	1:10	
	Anti-CD4-Ak	2	1:50	
	Anti-CD25-Ak	3	1:33	
	Anti-CD62L/ Anti-L-Selectin-Ak	3	1:33	

Zunächst wurden F_c-Block- und anschließend direkt die anti-CD45-Antikörper zu der Muskelzellsuspension zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen mittels 1,5 ml MACS-Pufferlösung gewaschen und zentrifugiert (mit 350 xg bei 4 °C für 6 min.). Der Überstand wurde abgossen, sodass ca. 100 μl übrig blieben. Die Muskelzellsedimente wurde anschließend jeweils mit 90 μl MACS-Pufferlösung pro 1×10^7 Zellen wieder suspendiert. Nach Zugabe von 10 μl MicroBeads (BD Bioscience, USA) pro 1×10^7 Zellen wurden die Suspensionen gut durchmischt und bei 4 °C für 15 min. inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Pufferlösung ausgewaschen und anschließend erneut mit 300 xg für 10 min. zentrifugiert. Mittels einer Pipette konnte dann der Überstand vollständig abgetragen werden. Bevor mit der MACS begonnen werden konnte, wurden die Zellen erneut mit Pufferlösung auf ein Volumen von 500 μl mit 1×10^8 Zellen suspendiert und durch einen 30 μm starken Filter vorgefiltert.

Zur Vorbereitung der Muskelzell-Säulen eines MiniMACS (Miltneyi Biotec, BRD) wurden diese zunächst mit 500 µl MACS-Pufferlösung gespült, bevor die die Zellsuspensionen auf die Säulen aufgebracht wurden. Die unmarkierten Zellen, welche die Säule passieren, wurden aufgefangen (CD45⁻) und die Säule drei weitere Male mit Pufferlösung gespült. Die Flüssigkeit wurde auch dabei gesammelt, da sie ebenfalls die unmarkierte Zellfraktion enthielt (CD45⁻).

Die Säulen wurden danach aus dem MiniMACS entfernt und direkt in ein FACS-Tube gestellt. Durch Zugabe von je 1 ml MACS-Pufferlösung in die Säulen konnten so die magnetisch markierten Zellfraktionen in das FACS-Tube gespült werden. Eine Zentrifugation bei 350 xg für 6 min. sammelte die Zellen am Boden des Röhrchens. Nach erneuter Entfernung des Überstandes und Resuspendierung mit 500 µl MACS-Pufferlösung, konnte die CD45⁺-Zellfraktion mittels C-Chip-Zählkammern in fünf Feldern ausgezählt werden. Daraufhin erfolgte die weitere Färbung mittels Antikörpern.

Zunächst wurden im zweiten Arbeitsschritt LD-Antikörper entsprechend der Zellzahlen zu den Proben gegeben. Nach Inkubation wurden die Zellsuspensionen mit 2 ml FACS-Pufferlösung gewaschen, mit 350 xg für 6 min. zentrifugiert, der Überstand bis auf ein Restvolumen von etwa 100 µl abgegossen. Nun konnten die restlichen Antikörper entsprechend des dritten und vierten Schrittes in Tabelle 3 hinzugegeben werden. Anschließend wurden die Suspensionen erneut wie nach dem zweiten Schritt gewaschen, zentrifugiert und dekantiert. Zu den 100 µl Zellsuspension wurde anschließend zur Fixierung 2%ige Paraformaldehyd (PFA) gegeben, anschließend diese bei Raumtemperatur für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspension wurde gewaschen, zentrifugiert und auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Das zurückgebliebene Zellsediment wurde im letzten Schritt vor der FACS-Analyse mit 100 µl FACS-Pufferlösung gemischt und dadurch erneut suspendiert. Die Messung der Proben erfolgte in der Core Unit „Flow Cytometry“ des BCRT, Charité Universitätsmedizin Berlin an einem LSRFortessa™ Flow Cytometer (BD Bioscience). Die erhaltenen Daten wurden anschließend mittels FlowJo 7.6.5 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA) aufgearbeitet.

Die Antikörper-Färbung und Durchflusszytometrie der Blutproben erfolgte analog zur Aufarbeitung und Anfärbung des Muskels und dienten als interne Kontrolle.

2.4.3 Gating-Strategie

Entsprechend der in Abbildung 5 dargestellten standardisierten Abfolge erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der einzelnen Proben.

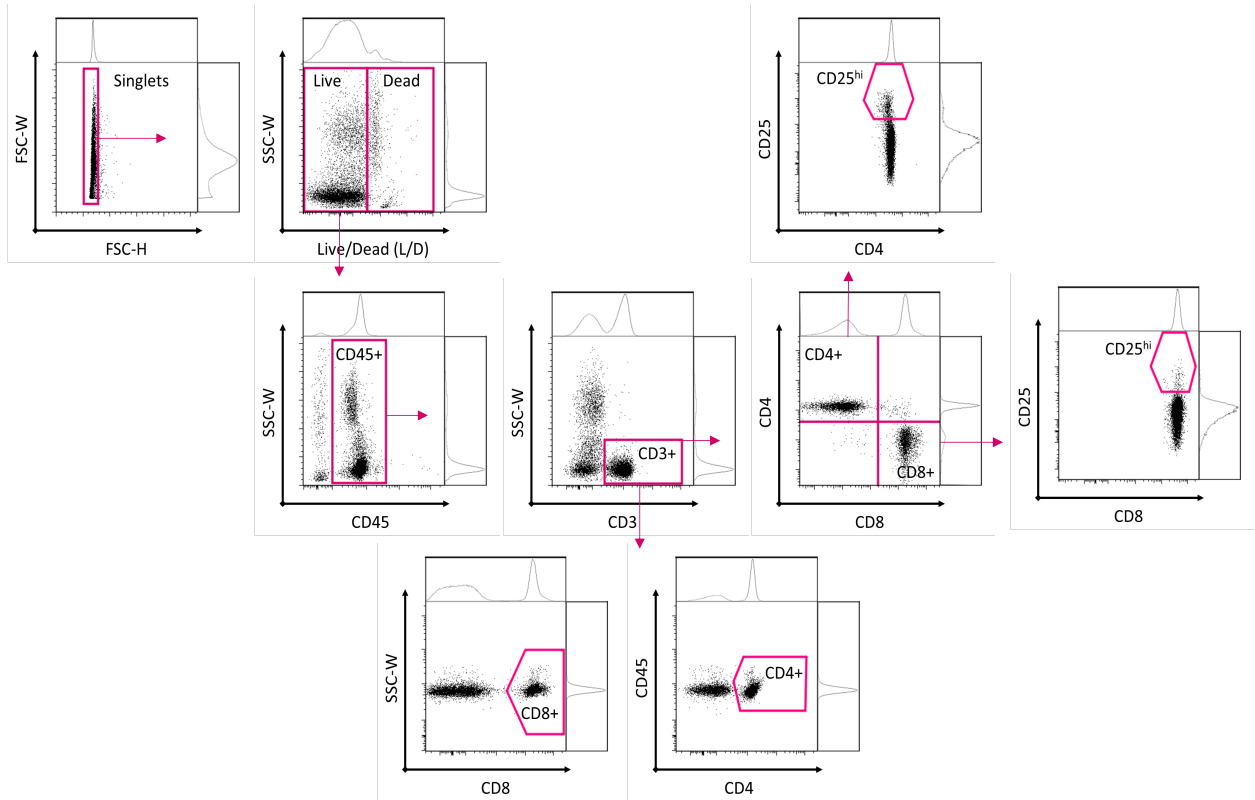


Abbildung 5: Standardisierte Abfolge der durchflusszytometrischen Analysen („Gating-Strategie“) dargestellt als Flussdiagramm.

2.4.4 Statistische Evaluation

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das IBM® SPSS® 27.0 Softwarepaket (IBM Corp., Chicago, Illinois, USA) und Excel Version 16.44 (Microsoft, USA) genutzt. Die Ergebnisse werden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden für den zeitlichen Verlauf je drei Tiere ($n = 3$) pro Versuchstag verwendet und für die Analysen an Versuchstag 7 und 28 mindestens 10 Versuchstiere pro Gruppe ($n = 10$) und Zeitpunkt (ausgenommen der Isotyp-Gruppe mit sechs Versuchstieren ($n = 6$)). Die Stichprobengröße wurde auf Grundlage vorheriger Untersuchungen [129, 131] ausgewählt, um die Anzahl der benötigten Tiere zu minimieren und sich dabei weiterhin die Möglichkeit auf valide, statistisch signifikante Ergebnisse (in Übereinstimmung mit den 3R-Prinzipien) zu erhalten. Der Shapiro-Wilk-Test wurde genutzt, um die Ergebnisse auf Normalverteilung zu untersuchen und der Levene-Test, um die Homogenität der Datenvarianz der betreffenden Gruppen zu beurteilen. Wenn eine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden ein ungepaarter T-Test (bei zwei Gruppen) oder die korrespondierende einfache Varianzanalyse (bei mehr als zwei Gruppen) ausgewählt, um eine statistische Signifikanz zu ermitteln. P-Werte wurden entsprechend des Bonferroni-Tests (bei gleicher Varianz) oder durch eine p-Wert-Adjustierung durch Mehrfachvergleich nach Dunnett T3 (bei ungleicher Varianz) angepasst. Alle Tests wurden zweiseitig analysiert und $p < 0,05$ als statistisches Signifikanzniveau festgelegt. Detaillierte Informationen über Fehlerbalken, Stichprobengrößen pro Versuchsgruppe und statistische Analyse sind in allen Legenden der Abbildungen bzw. im Fließtext enthalten. Alle Untersucher waren während der Experimente gegenüber der Stichprobe nicht verblindet, da die beschriebenen Behandlungsmethoden sich offensichtlich unterschieden.

3 ERGEBNISSE

3.1 T-Zellen akkumulieren in verletzter Skelettmuskulatur

Zunächst wurde die Konzentration an vitalen Leukozyten (CD45+ Zellen) im traumatisierten Muskelgewebe und peripheren Blut der Versuchstiere im Zeitverlauf von 14 Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für diese longitudinale Untersuchung wurden an jedem Untersuchungszeitpunkt (0, 1, 3, 7 und 14 Tage nach OP) Gewebe von je drei Versuchstieren analysiert.

Während nach der Aufarbeitung des Gewebes nur geringe Mengen an CD45+ Zellen im intakten Muskelgewebe (unverletzter M. soleus der Gegenseite) detektiert werden konnten, stieg deren Anzahl im verletzten Muskelgewebe nach dem Trauma progressiv an und erreichte ein Maximum sieben Tage nach dem Setzen des Quetschtraumas (siehe Abbildung 6a und Tabelle 4). Auf Basis dieser Beobachtung, wurde die Stichprobengröße an Tag 7 erhöht, um so eine statistische Bewertung und nähere quantitative Typisierung der Immunzell-Subpopulationen zu ermöglichen (mindestens $n = 10$ pro Versuchsgruppe).

Im Vergleich zum unverletzten Muskelgewebe wurde eine signifikante Akkumulation von CD45+ Zellen im verletzten Gewebe sieben Tage nach Trauma gefunden (CD45+ Zellen [intakt] = $5 \pm 0,69$ % ($n = 10$) versus CD45+ Zellen [verletzt] = $53,46 \pm 1,99$ % ($n = 11$); $p < 0,05$ (Bonferroni), siehe Abbildung 6b).

Im Gegensatz zum Muskelgewebe zeigten sich im Blut keine größeren Unterschiede im Anteil der CD45+ Zellen im zeitlichen Verlauf. Im Vergleich zu präoperativen Blutbiopsien (CD45+ Zellen: $97 \pm 0,59$ %, $n = 11$) wurde kein signifikanter Anstieg im peripheren Blut der Tiere an Tag 7 (CD45+ Zellen: $97,05 \pm 0,36$ %, $n = 12$) nach dem Quetschtrauma nachgewiesen (Abbildung 6b).

Tabelle 4: Relativer Anteil der CD45+ Zellen in Bezug auf alle vitalen Zellen (in %) in peripherem Blut und in der verletzten Muskulatur im zeitlichen Verlauf ab Quetschtrauma an Tag 0. Angaben als Mittelwerte mit SEM (in %) für n = 3.

CD45+	Peripheres Blut		Verletzter Muskel	
	Mittelwert (%)	SEM (%)	Mittelwert (%)	SEM (%)
Tag				
0	95,83	1,30	3,70	1,12
1	97,33	2,27	26,83	2,20
3	96,90	1,40	42,53	2,92
7	96,77	1,07	59,23	4,40
14	98,50	0,29	42,40	2,39

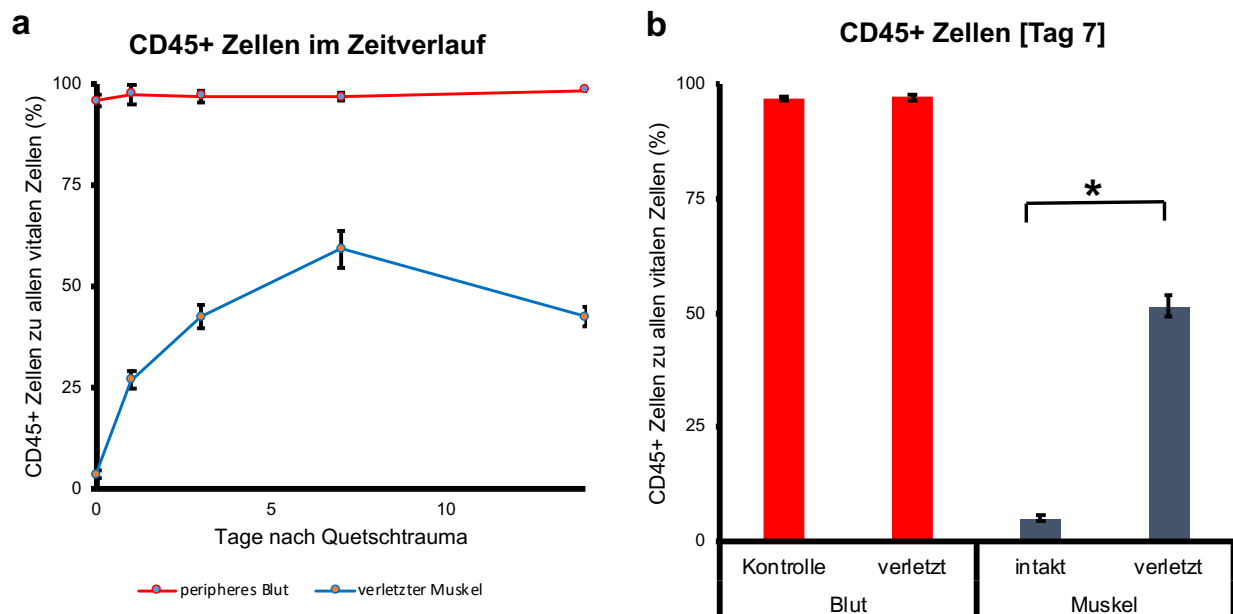


Abbildung 6: Es zeigte sich ein relatives Maximum an Tag 7 im verletzten Muskel, wobei der relative Anteil an CD45+ Zellen im peripheren Blut weitestgehend konstant bleibt, sowie eine signifikante Erhöhung der CD45+ Zellkonzentration im verletzten Muskel im Vergleich zur unverletzten Muskulatur der Gegenseite ($p < 0,05$; Bonferroni). Relativer Anteil der CD45+ Zellen in Bezug auf alle vitalen Zellen (in %) in peripherem Blut bzw. im Muskelgewebe im zeitlichen Verlauf ab dem Quetschtrauma an Tag 0 (n = 3) (a) sowie beispielhaft im peripheren Blut an den Tagen -2 (Kontrolle) (n = 11) und 7 (verletzt) (n = 12) und an Tag 7 in intakter (M. soleus der Gegenseite) (n = 10) und verletzter Muskulatur (n = 11) (b).

In der Folge wurde untersucht, ob der Anstieg der CD45+ Zellen im verletzten Muskelgewebe mit dem Einwandern von Zellen der adaptiven Immunität verbunden ist. Hierbei wurde sich auf die Gruppe der CD3+ T-Zellen und deren Subpopulationen fokussiert. Die longitudinale Untersuchung der CD3+ T-Zellen Konzentration im Muskelgewebe zeigte analog zur Gesamtheit der CD45+Zellen eine Akkumulation der CD3+ T-Zellen im verletzten Muskelgewebe über die Zeit mit Maximum an Tag 7 (siehe Abbildung 7a und Tabelle 5). Die lokale Konzentration an CD3+ T-Zellen war an Tag 7 qualitativ im verletzten Muskel ($59 \pm 3,35$ %; n = 11) sogar etwas höher als im entsprechenden peripheren Blut ($51 \pm 2,52$ %; n = 11) der Tiere, erreichte aber keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 7b).

Tabelle 5: Relativer Anteil der CD3+ Zellen in Bezug auf alle vitalen CD45+ Zellen (in %) in peripherem Blut und in der verletzten Muskulatur im zeitlichen Verlauf ab Quetschtrauma an Tag 0. Angaben als Mittelwerte mit SEM (in %) für n = 3.

CD3+	Peripheres Blut		Verletzter Muskel	
	Mittelwert (%)	SEM (%)	Mittelwert (%)	SEM (%)
0Tag				
0	52,33	4,81	2,31	0,40
1	63,17	6,97	6,68	1,17
3	52,20	1,62	25,40	4,09
7	57,23	4,84	52,80	6,42
14	54,63	4,59	26,10	0,47

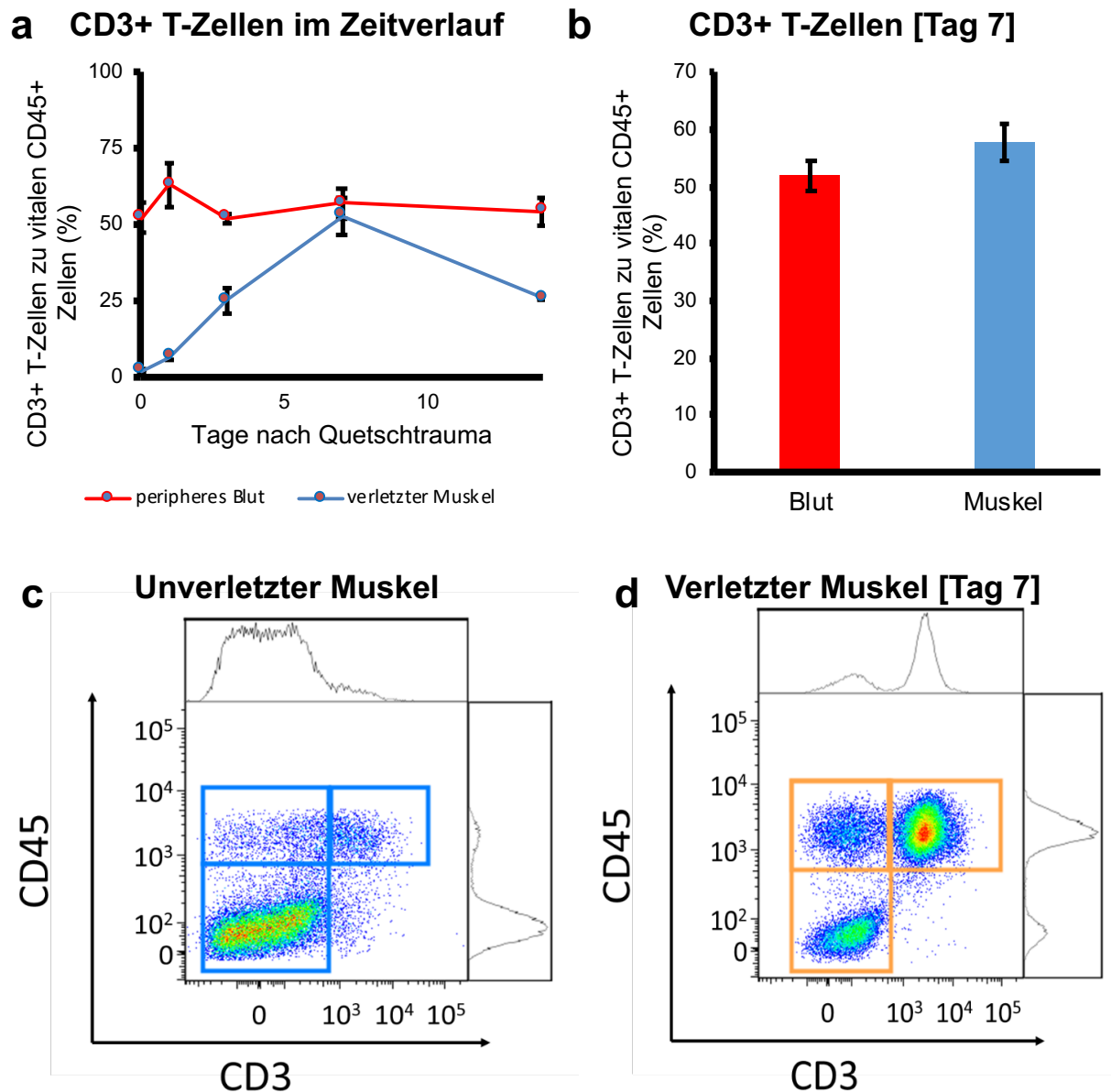


Abbildung 7:

Es zeigte sich eine vermehrte Anreicherung von CD45+CD3+ T-Zellen im verletzten Muskel an Tag 7. Durchschnittlich relativer Anteil der CD3+ Zellen aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen (in %) im zeitlichen Verlauf bis Tag 14 in peripherem Blut und verletzter Muskulatur (a). Während sich im Blut nahezu konstante Konzentrationslevel zeigen, bildet sich unter Betrachtung der Muskulatur ein lokaler Konzentrationshöhepunkt an Tag 7 ab (n = 3) (a). Relativer Anteil der CD3+ Zellen aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und lokal im Muskelgewebe an Tag 7 (n = 11) (b) sowie grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gated für CD45 und CD3 in unverletztem (c) und verletztem Muskel an Tag 7 (d).

3.2 Geringeres Verhältnis aus CD4+/CD8+ Zellen in verletzter Muskulatur als im peripheren Blut

Die Gruppe der CD3+ Zellen wurde anschließend in ihre Subpopulationen der CD8+ und CD4+ Zellen unterteilt und eingehender untersucht. Es war bekannt, dass CD4+ T-Zellen, welche auch die Subpopulation der regulatorische, T-Zell umfasst, vorrangig in geschädigtem Muskelgewebe akkumulieren. Im Einklang mit diesen Voruntersuchungen konnten auch in diesen Versuchen die entsprechende Akkumulation an CD4+ T-Zellen in der verletzten Muskulatur nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Die lokale Konzentration im verletzten Muskel erreichte an Tag 7 ($34 \pm 1,90 \%$, $n = 11$) annähernd die Werte des peripheren Bluts ($36 \pm 3,11 \%$, $n = 11$) der Versuchstiere, sodass kein statistischer Unterschied zwischen beiden Gruppen gefunden wurde.

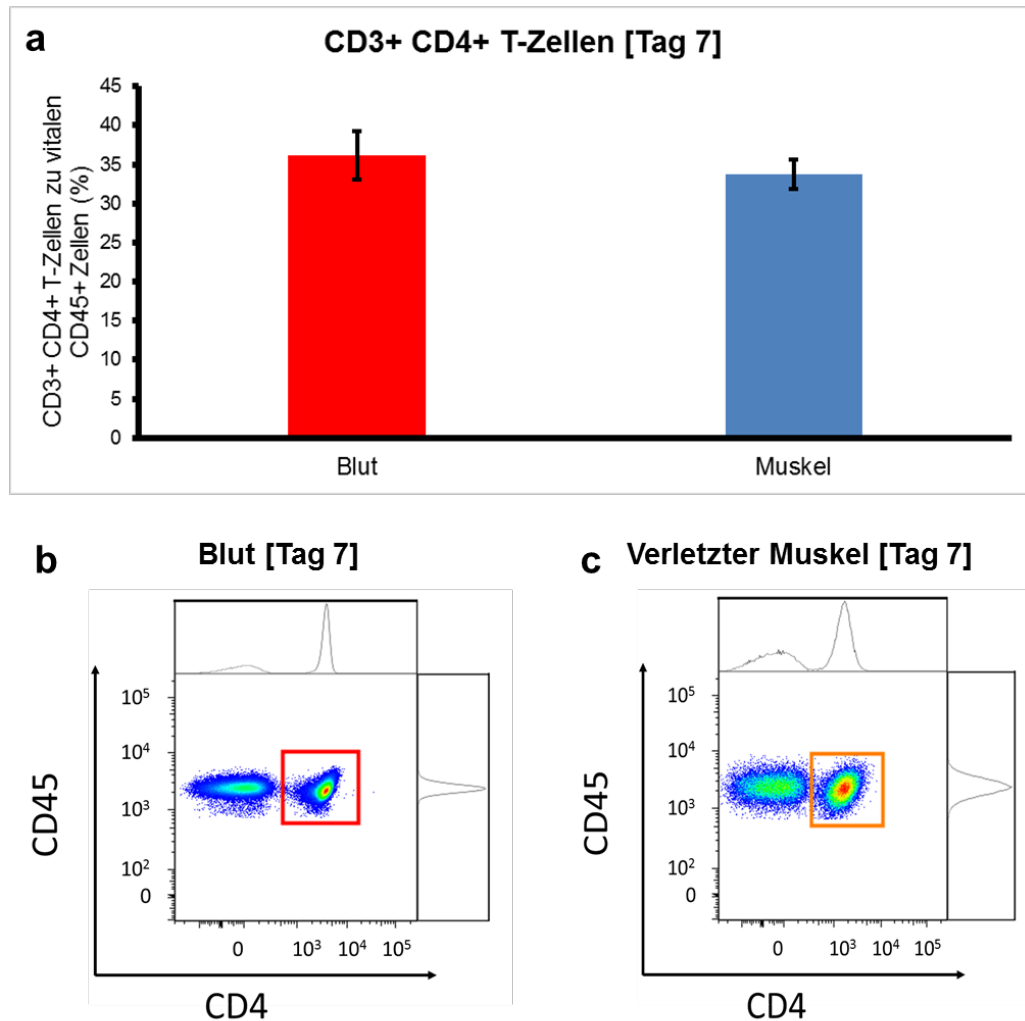


Abbildung 8: Es zeigte sich eine vermehrte Anreicherung der CD3+CD4+ T-Zellfraktion im verletzten Muskel an Tag 7. Relativer Anteil der CD3+CD4+ T-Zellen aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und lokal im Muskelgewebe an Tag 7 (n = 11) (a) sowie grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gated für CD45 und CD4 in Blut (b) und verletztem Muskel (c) an Tag 7.

Um den Anteil an regulatorischen T-zellen abschätzen zu können, wurde der Anteil an CD4+ T-Zellen mit hoher CD25 (CD25^{high}) Expression quantifiziert. Der relative Anteil dieser CD4+ CD25^{high} T-Zellen war signifikant höher im verletzten Muskelgewebe (CD45+CD3+CD4+CD25^{high} = 13 ± 1,60 %; n = 10) als im peripheren Blut der Versuchstiere (CD45+CD3+CD4+CD25^{high} = 3 ± 0,50 %; n = 10 mit p < 0,05; Bonferroni); siehe Abbildung 9). Die Werte bezüglich der CD25-Expression der Proben eines Versuchstieres waren nicht verwertbar und wurden daher nicht in die weitere statistisch Auswertung inkludiert.

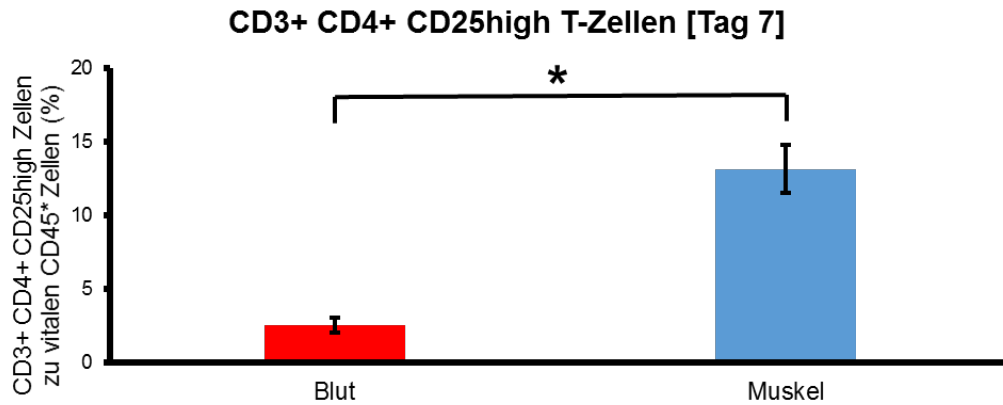


Abbildung 9: Es zeigte sich eine statistisch signifikant vermehrte Anreicherung der CD4+ T-Zellfraktion (regulatorische T-Zellen) im verletzten Muskel an Tag 7 im Vergleich zur Konzentration im Blut zum selben Zeitpunkt ($p < 0,05$; Bonferroni). Relativer Anteil Zellen des regulatorischen T-Zell-Kompartiment (CD4+ CD25^{high}) aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und lokal im Muskelgewebe an Tag 7 ($n = 10$).

Im nächsten Schritt wurde der Anteil der CD3+CD8+ T-Zellen bestimmt. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte analog zur Akkumulation der CD3+ T-Zellen auch eine Zunahme der CD8+ T-Zell-Population im Verletzungsgebiet beobachtet werden. An Tag 7 wurden signifikant höhere Anteile an CD3+CD8+ T-Zellen im verletzten Muskel (CD3+CD8+ T-Zellen = $19 \pm 2,05$ %; $n = 11$) gegenüber dem peripheren Blut (CD3+CD8+ T-Zellen = $12 \pm 0,91$ %; $n = 11$ mit $p < 0,05$; Bonferroni) erreicht (Abbildung 10).

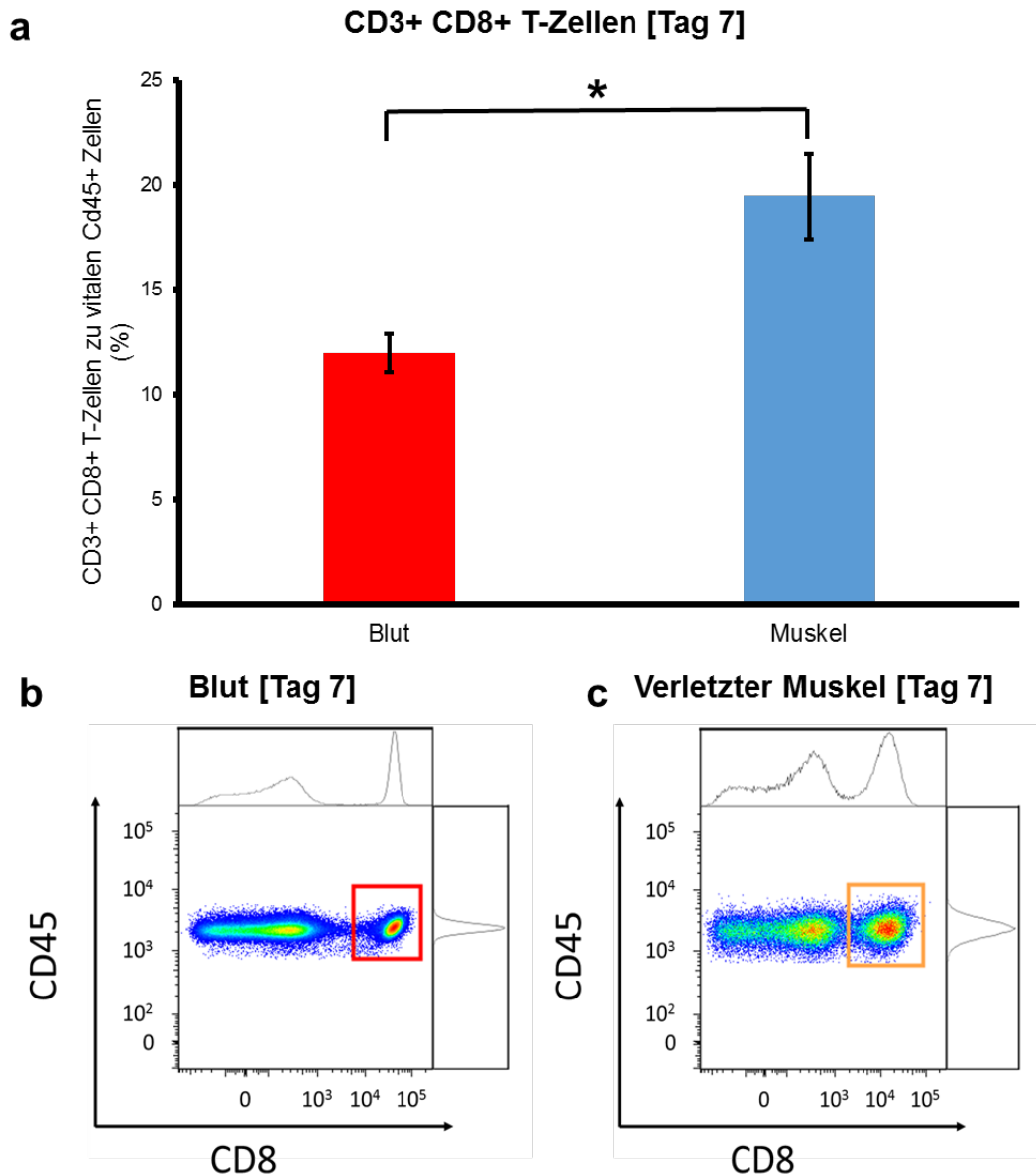


Abbildung 10: Es zeigte sich eine statistisch signifikant vermehrte Anreicherung der CD3+ CD8+ T-Zellfraktion im verletzten Muskel an Tag 7 im Vergleich zur Konzentration im Blut zum selben Zeitpunkt ($p < 0,05$; Bonferroni). Relativer Anteil der CD3+ CD8+ Zellen aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und lokal im Muskelgewebe an Tag 7 ($n = 11$) ($p < 0,05$, Bonferroni) (a) sowie eine grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gated für CD45 und CD8 im Blut (b) und verletztem Muskel (c) an Tag 7.

Folglich ergab sich ein signifikant geringeres Verhältnis aus CD4+ zu CD8+ T-Zellen im Verletzungsgebiet (Ratio verletzter Muskel: $2 \pm 0,16$ % bei $n = 11$) als im peripheren Blut (Ratio peripheres Blut: $3 \pm 0,52$ % bei $n = 11$) ($p < 0,05$; Bonferroni) (siehe Abbildung 11).

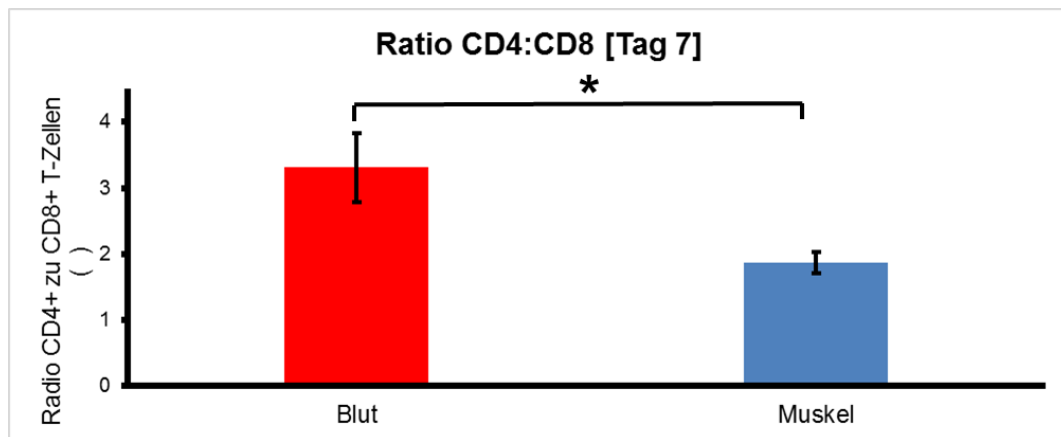


Abbildung 11: Es zeigte sich ein statistisch signifikantes Verhältnis aus CD4+ Zellen zu CD8+ T-Zellen anhand des jeweils relativen Anteils aus der Gesamtheit der vitalen CD45+ Zellen in peripherem Blut und verletztem Muskelgewebe beispielhaft an Tag 7 (n = 11) ($p < 0,05$; Bonferroni).

3.3 Depletion von CD8+ und CD4+ T-Zellen und ihre Auswirkungen auf die Muskelheilung

Um einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von T-Zellen und dem eingeschränkten Regenerationspotential von schweren Muskelverletzungen zu untersuchen, wurden prospektiv alle CD8+ T-Zellen bzw. alle CD4+ T-Zellen systemisch mittels spezifischer anti-CD8- und anti-CD4-Neutralisierungsantikörper depletiert.

Die erfolgreiche Depletion der entsprechenden T-Zell Subpopulation wurde anschließend in Blutbiopsien mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

In Bezug auf die CD8-Depletion zeigten sich signifikant geringere relative Konzentrationslevel der CD8+ Zellen nach Antikörpergabe an Tag 0 ($0 \pm 0,02$ %; n = 5) im Vergleich zu vor Antikörpergabe an Tag -2 ($12 \pm 1,44$ %; n = 5) ($p < 0,05$; Bonferroni). Die Konzentrationen der CD4+ T-Zellen waren vor ($33 \pm 2,01$ %; n = 5) und nach Antikörpergabe ($34 \pm 1,76$ %; n = 5) zu denselben Analysezeitpunkten nahezu konstant (siehe Abbildung 12).

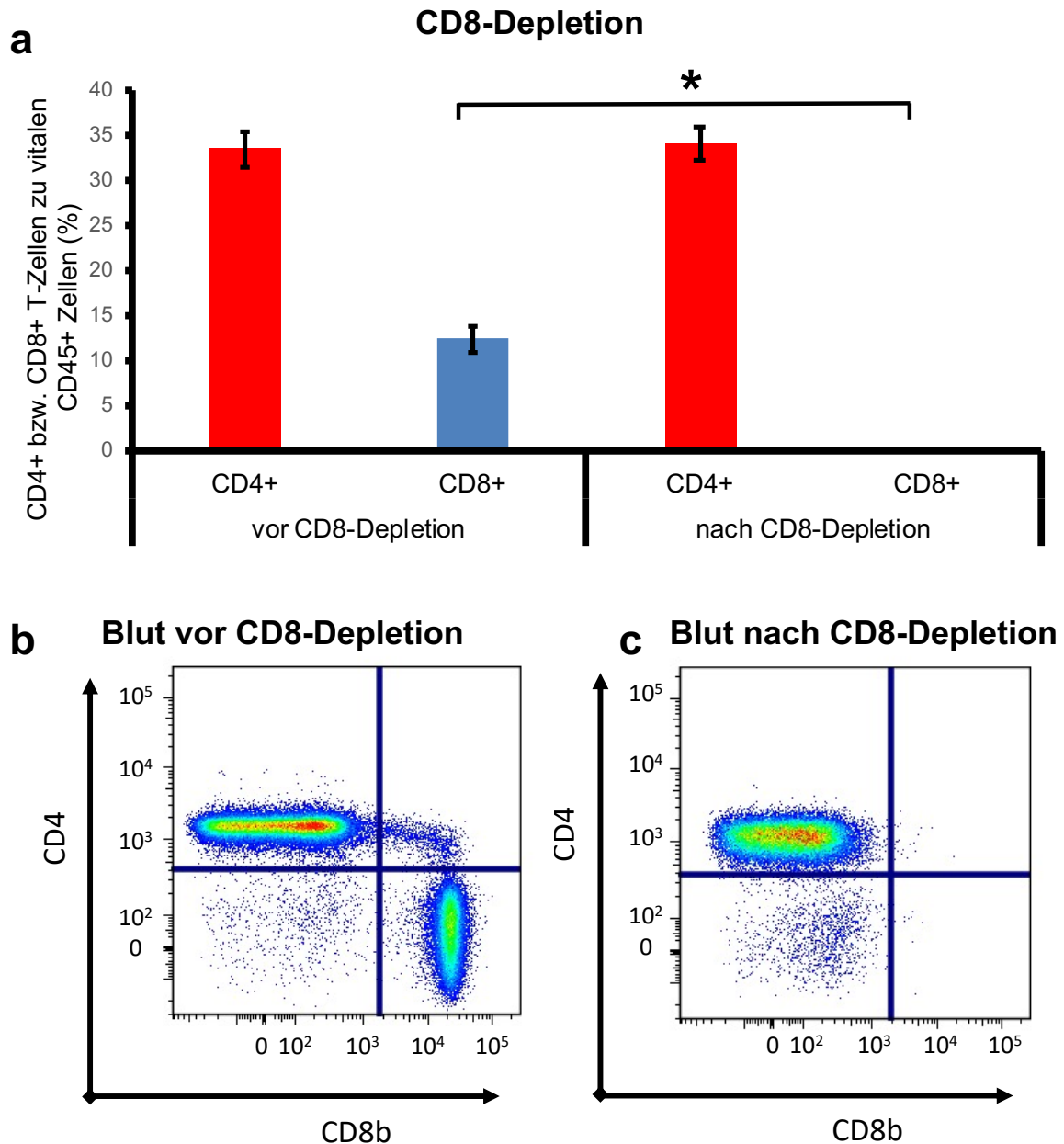


Abbildung 12: Es zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl der CD8b+ Subpopulation ($p < 0,05$; Bonferroni) als Darstellung einer erfolgreichen CD8-Depletion. Relative Anteile der CD4+ und CD8+ Zellen vor und nach erfolgter CD8-Depletion ($n = 5$) ($p < 0,05$ für CD8+ Zellen; Bonferroni) (a) sowie eine grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gated für CD4 und CD8b im Blut vor (a) und nach (c) Gabe von CD8a-Antikörpern.

In Bezug auf die CD4-Depletion zeigten sich signifikant geringere relative Konzentrationslevel der CD4+ Zellen nach Antikörpergabe an Tag 0 ($12 \pm 1,21\%$; $n = 6$) im Vergleich zu vor Antikörpergabe an Tag -2 ($28 \pm 1,78\%$; $n = 6$) ($p < 0,05$, t-Test), allerdings wurde keine vollständige Depletion erreicht. Die Konzentrationen der CD8+ Zellen waren vor ($15 \pm 1,19\%$; $n = 6$) und nach Antikörpergabe ($14 \pm 1,06\%$; $n = 6$) zu denselben Analysezeitpunkten nahezu konstant (siehe Abbildung 13).

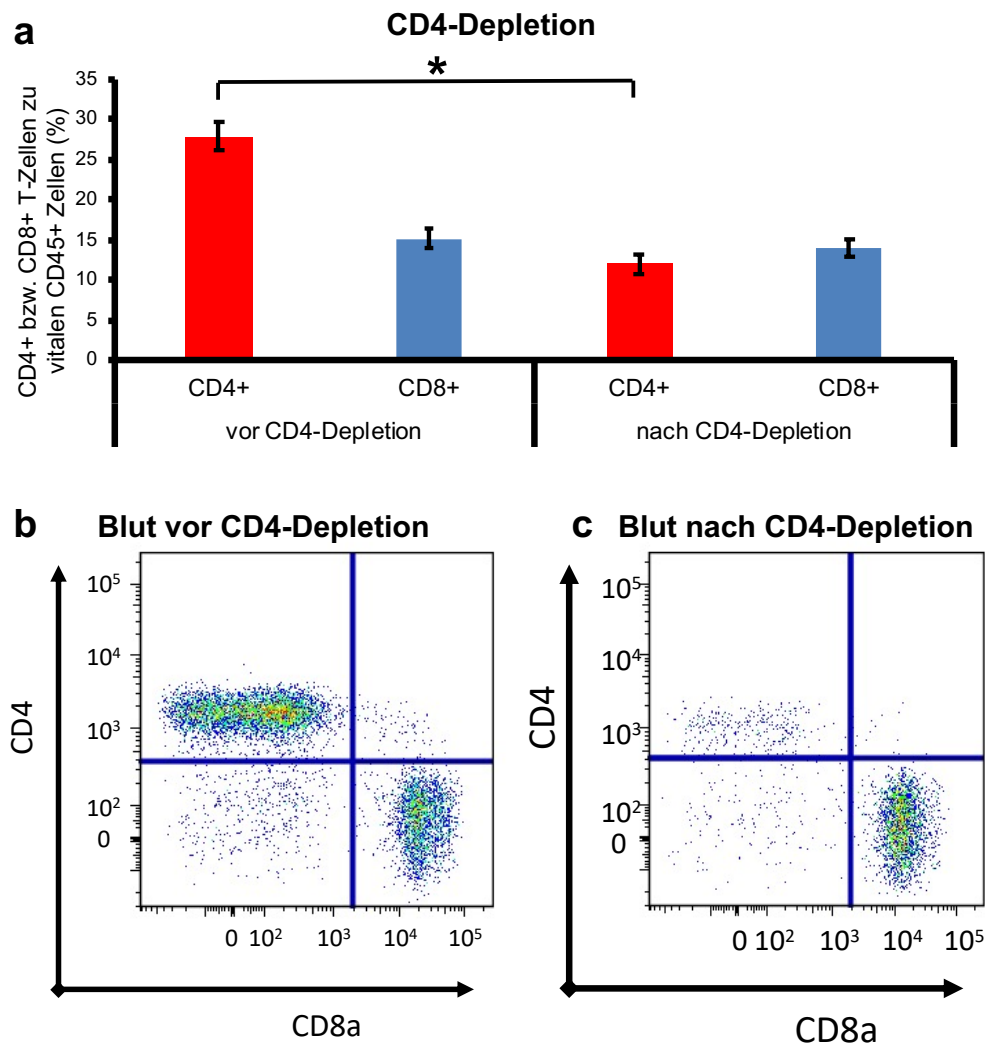


Abbildung 13: Es zeigte sich eine signifikant verringerte Anzahl der CD4+ Subpopulation ($p < 0,05$; Bonferroni) als Darstellung einer erfolgreichen CD4-Depletion. Relative Anteile der CD4+ und CD8+ Zellen vor und nach erfolgter CD4-Depletion ($n = 6$) ($p < 0,05$ für CD4+ Zellen; Bonferroni) (a) sowie eine grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gated für CD4 und CD8a im Blut vor (a) und nach (c) Gabe von CD4-Antikörpern.

3.4 Funktionale Ergebnisse anhand Muskelkraftmessung

Um die Auswirkung der Depletion der CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen auf die Regeneration der schwerer verletzten Skelettmuskulatur quantifizieren zu können, wurde eine biomechanische Messung der Muskelkraft an Tag 28 nach OP durchgeführt. Dabei wurden die relativen Verluste an Muskelkraft des traumatisierten M. soleus im Relation zur unverletzten Gegenseite bestimmt.

3.4.1 Verbesserte Regeneration der relativen Muskelkraft durch CD8-Depletion

Die Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Kraftverlust von $35 \pm 4,58$ % ($n = 12$) bezogen auf die fast-twitch (schnell-zuckende) Muskelkraft. Bei den Tieren mit CD4-Depletion zeigte sich hier ein durchschnittlicher Kraftverlust von $31 \pm 4,16$ % ($n = 9$). Nach CD8-Depletion betrug der durchschnittliche relative Kraftverlust der schnell-zuckenden Muskelfasern $7 \pm 4,37$ % ($n = 10$). Der mittlere Kraftverlust der Isotyp-Gruppe lag bei $35 \pm 4,69$ % ($n = 3$) und entsprach daher annähernd den Werten der Kontrollgruppe.

Bei der Gruppe der CD8-depletierten Tiere konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Isotyp-Gruppe ein signifikant geringerer relativer Kraftverlust der schnell-zuckenden Muskelfasern nachgewiesen werden ($p < 0,05$; Dunnett T3). Zwischen der CD4-depletierten und der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Verlust der fast twitch-Muskelkraft (siehe Abbildung 14a).

Die Kontrollgruppe zeigte einen mittleren Kraftverlust von $52 \pm 4,54$ % ($n = 12$) der tetanischen Muskelkraft. Bei den Tieren mit CD4-Depletion konnte ein durchschnittlicher Kraftverlust der tetanischen Muskelfasern von $42 \pm 4,31$ % ($n = 9$) beobachtet werden. Nach CD8-Depletion zeigte sich ein relativer tetanischer Kraftverlust von $9 \pm 3,68$ % ($n = 10$). Der mittlere Kraftverlust der Isotyp-Gruppe lag bei $47 \pm 6,13$ % ($n = 3$) und entsprach daher annähernd den Werten der Kontrollgruppe.

Bei der Gruppe der CD8-depletierten Tiere konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Isotyp-Gruppe ein signifikant geringerer Kraftverlust der tetanischen Muskelfasern nachgewiesen werden ($p < 0,05$; Dunnett T3). Zwischen der CD4-depletierten und der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Verlust der tetanischen Muskelkraft (siehe Abbildung 14b).

Die Werte der biomechanischen Muskelkraftmessung eines Versuchstieres waren nicht verwertbar und wurden nicht in die weitere statistische Analyse inkludiert.

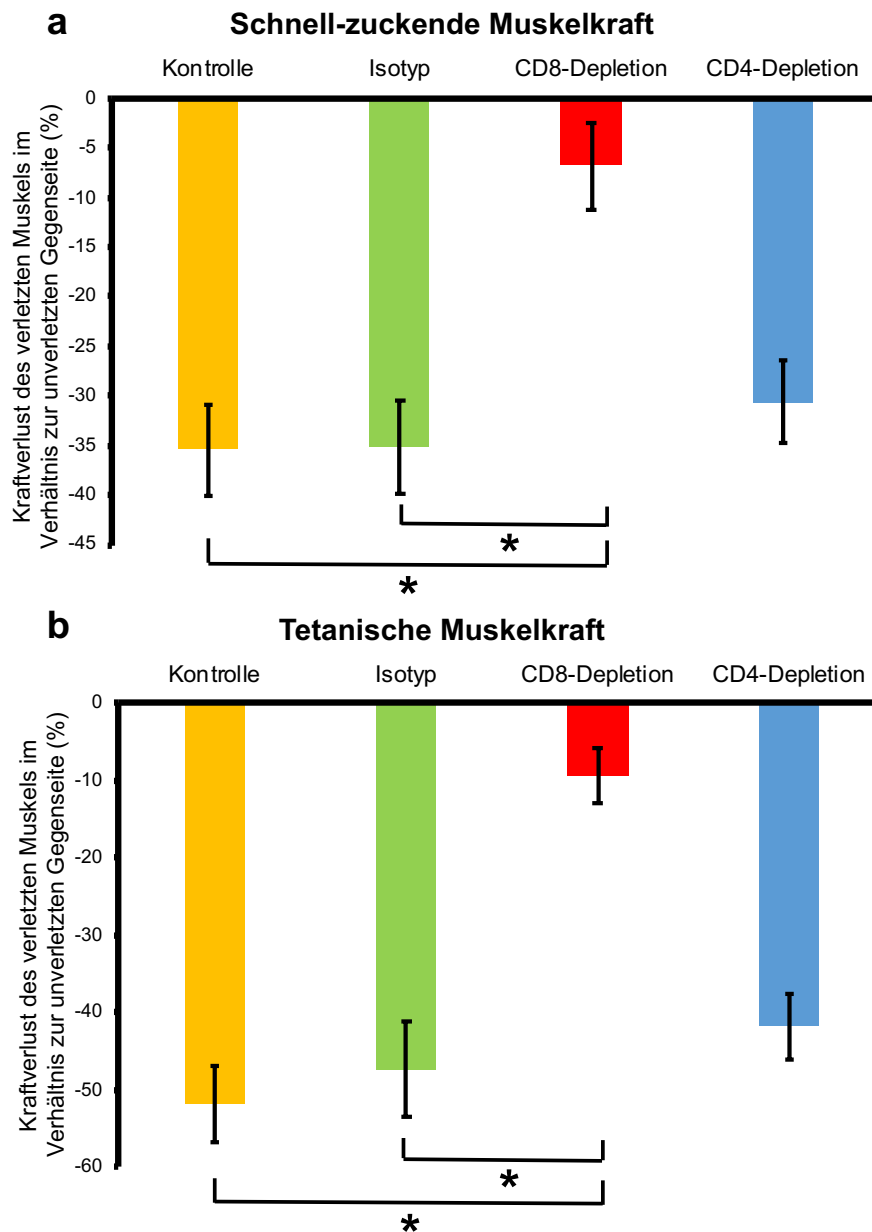


Abbildung 14: Bei der funktionalen Auswertung mittels biomechanischer Muskelkraftmessung zeigte sich ein statistisch signifikant geringerer relativer Kraftverlust der Versuchstiere nach CD8-Depletion im Vergleich zur Kontrollgruppe und Isotyp-Gruppe bezogen auf schnell-zuckende (a) und tetanische Muskelkraft (b) ($p < 0,05$; Dunnett T3). Kontrollgruppe (gelb) mit $n = 12$, Isotyp-Gruppe (grün) mit $n = 3$, CD8-depletierte Tiere (rot) mit $n = 10$, CD4-depletierte Tiere (blau) mit $n = 9$. Angaben als relativer Kraftverlust des verletzten Muskels im Verhältnis zum Muskel der unverletzten Gegenseite an Tag 28 (in %).

4 DISKUSSION

Skelettmuskulatur hat eine hohe endogene Regenerationsfähigkeit, welche aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener molekularer und zellulärer Faktoren resultiert. Diese Faktoren beinhalten auch die Interaktionen zwischen dem Muskelgewebe und dem angeborenen Immunsystem. Muskelresidente Satellitenzellen, aus denen über verschiedene Differenzierungsschritte neue funktionelle Myofasern entstehen, werden durch pro-inflammatorische M1-Makrophagen aktiviert und später von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen reguliert [52]. In ähnlicher Weise wird auch das funktionelle Verhalten von fibroadipogenen Vorläuferzellen (FAPs) durch verschiedene Makrophagen-Subpopulationen koordiniert [80]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der initialen Entzündungsreaktion nach einer Verletzung für die erfolgreiche Einleitung der endogenen Regeneration. Allerdings ist die zeitgerechte Auflösung dieser akuten Entzündung essenziell, um nachfolgende Phasen der Heilung einzuleiten, welche die ursprüngliche Struktur und Funktion des Gewebes wiederherstellen. Eine anhaltend persistierende Entzündungsreaktion verhindert die Regeneration des verletzten Gewebes und ist auch ein Kennzeichen chronischer Erkrankungen wie der Muskeldystrophie [140]. In Vorarbeiten konnte diese Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass über das angeborene Immunsystem hinaus auch die Zellen der adaptiven Immunität einen signifikanten Einfluss auf den Prozess der endogenen Regeneration haben [141]. Diese Arbeiten aus dem Bereich der Knochenregeneration zeigten die besondere Bedeutung lokaler regulatorischer und zytotoxischer T-Zellkonzentrationen als wichtige Modulatoren im Prozess der Frakturheilung. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der adaptiven Immunität im Prozess der Muskelregeneration näher untersucht.

4.1 Kinetik des adaptiven Immunsystems im Verletzungsgebiet

Es wurde zunächst eine longitudinale Betrachtung der Immunzellkomposition in schwer verletzter Skelettmuskulatur über einen Zeitraum von 14 Tagen vorgenommen und dabei auf CD45+CD3+ T-Zellen und ihre Subpopulationen fokussiert. Es konnte gezeigt werden, dass es im Zuge eines schweren Quetschtraumas zu einer Anreicherung CD45+ Zellen im Verletzungsbereich kommt, was mit einer Akkumulation von CD45+CD3+ T-Zellen assoziiert ist. Diese progressive Einwanderung von CD3+ T-Zellen erreicht ihr Maximum in diesem Modell am siebten Tag nach der Verletzung. Diese Dynamik deutet daraufhin, dass es sich bei der T-Zell-Akkumulation nicht um eine passive Einblutung in Folge der traumatischen Gefäßverletzung handelt, sondern eher eine aktive Rekrutierung der Zellen zum Ort der Verletzung. Eine vergleichbare Kinetik wurde auch für die entsprechenden CD45+CD3+CD4+ bzw. CD45+CD3+CD8+ T-Zellsubpopulationen gefunden. Während die CD45+CD3+CD4+ T-Zell-Level im verletzten Gewebe nach sieben Tagen vergleichbare Werte wie die entsprechende T-Zellpopulation im Muskel erreichte, unterschied sich jedoch ihre Zusammensetzung zwischen beiden Geweben. So wurden signifikant höhere Level an CD45+CD3+CD4+CD25^{high} im Muskelgewebe im Vergleich zum Blut gefunden. Dies könnte auf ein verstärktes Einwandern oder eine erhöhte Expansion von regulatorischen T-Zellen im verletzten Gewebe hindeuten. Es ist bekannt, dass CD25, welches die α -Kette des IL-2-Rezeptors darstellt, auf T-Zellen in Thymus und Peripherie exprimiert wird. IL-2 gilt als Wachstumsfaktor während einer frühen Immunantwort und begrenzt diese umgekehrt über ein positives Feedback, sodass eine Selbsttoleranz erhalten bleibt und Autoreaktivität vermieden wird. In der Peripherie trägt IL-2 ebenso zur Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen bei. CD25 gilt demnach ebenfalls als Identifizierungsmarker für aktivierte Zellen des regulatorischen T-Zellkompartiment [142].

Eine genauere Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen Level erfolgt über die zusätzliche intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3. Die FoxP3+ Fraktion der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen ist zwar im Blut verhältnismäßig klein [143], allerdings ist erhöhte Akkumulation von entsprechenden CD4+ Treg im verletzter Muskulatur bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und erscheint für eine erfolgreiche Heilung essentiell zu sein [93]. In dieser Arbeit konnte der für regulatorische T-Zellen spezifische Transkriptionsfaktor FoxP3 nicht bestimmt werden, aber durch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der Literatur, kann angenommen werden, dass die Zunahme an CD4+CD25^{high} T-zellen für ein Einwandern von regulatorischen CD4+ T-Zellen spricht. allerdings ist die Exemplarisch konnte in einem CTX-Mausmodell gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen unter anderem die IFN- γ -Produktion und damit die pro-inflammatorische Phase eindämmen [144]. Zudem zeigte ein mdx-Mausmodell, welches jedoch eine chronische Inflammation darstellt, im Rahmen einer CD25-Depletion eine Exazerbation der Entzündungsreaktion [145]. Allerdings wurden diese Untersuchungen überwiegend in Tiermodellen mit minderschweren Verletzungsfolgen vorgenommen, sodass diese ohne weitere therapeutische Versorgung spontan vollständig heilen [138], was die Vergleichbarkeit in dieser Arbeit untersuchten schweren Quetschtrauma einschränkt.

4.2 Regulatorische CD4+ T-Zellen kontrollieren die Art der Immunantwort

Das verwendete klinisch-relevante Tiermodell stellt die humane Situation einer schweren Muskelverletzung nach. Diese führt zu einem prolongierten bzw. häufig permanenten Verlust an Muskelkraft und der Bildung von Narbengewebe. Die Beobachtung, dass auch im Zuge einer solchen schweren Verletzung regulatorische T-Zellen in hoher Zahl im Verletzungsgebiet vorhanden sind, unterstreicht zwar ihre generelle Bedeutung für die Heilung, allerdings scheint ab einer bestimmte Schwere der Verletzung dies nicht mehr ausreichend, um eine vollständige Regeneration zu ermöglichen. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse der prä-traumatischen Depletion aller CD4+T-zellen im Blut unterstrichen. So zeigten die Tiere, welche eine anti-CD4-Antikörpertherapie erhalten haben, ähnlich wie unbehandelte Kontrolltiere, einen Verlust an Muskelkraft von 31 % bezogen auf schnell-zuckende und 42 % bei tetanischem Muskelkontraktionen nach 28 Tagen. In einer Vorarbeit von Spencer et al. zeigte sich bei einer nahezu vollständigen Depletion von CD4-Zellen in einem mdx-Mausmodell eine histologisch signifikant verbesserte Muskelsituation, was eine verbesserte Regenerationsfähigkeit bei chronischen Entzündungszuständen anzeigt. In dieser Forschungsarbeit wurde, trotz einer signifikanten Reduktion der systemischen CD4+ T-Zell-Level durch Antikörpergabe, keine Verbesserung der Heilung erreicht, allerdings auch keine gravierende Verschlechterung des funktionellen Heilungsergebnisses im Verhältnis zur Kontrollgruppe beobachtet.

Möglicherweise ist das nicht geänderte funktionelle Heilungsergebnis nach der anti-CD4-Antikörper-Intervention auf unvollständige Depletion und somit noch „ausreichende“ Konzentration an anti-inflammatorisch wirkenden Tregs bei gleichzeitiger Reduzierung inflammatorisch-wirkender CD4+ Zellen zu erklären. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die systemischen CD4+ T-Zellen im Verlauf der Regeneration schnell wieder hergestellt werden. Eine Untersuchung der Dynamik der CD4+ T-Zellkonzentration im zeitlichen Verlauf nach erfolgter CD4-Depletion ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt und ist eine sinnvolle weiterführende Untersuchung. Eine weitere Einflussgröße sind sicher auch die hohen lokalen Level der CD8+ T-Zellen, welche die Muskelregeneration negativ zu beeinflussen scheinen und nicht durch die vorhandenen regulatorischen T-Zell kompensiert werden können. Castiglioni et al. konnten in einem Kardiotoxin-Traumamodell zwar eine positive Wirkung von CD4+ FOXP3+ T-Zellen auf die Expansion von Satellitenzellen und den gesamten Heilungsprozess zeigen, allerdings wurden hier keine CD8+ T-Zellen im Verletzungsgebiet gefunden [146]. Dieser Unterschied zu den hier gezeigten Daten, kann sowohl im zugrundeliegenden Verletzungsmechanismus als auch in der Gewebeaufarbeitung und Zellaspiration liegen. Anders als bei Castiglioni et al. wurde in der vorliegenden Arbeit eine Prozessierung des gesamten Muskels vorgenommen, sodass eine Betrachtung der lokalen Zellgesamtheit möglich war. Andererseits sind Leukozyteninfiltrationen auch Anzeichen eines infektiösen Geschehens. Im Rahmen dieser Arbeit ist ein offen-chirurgisches Trauma erfolgt, welches im Vergleich zu Vorarbeiten mit geschlossene Verletzungsmechanismen ein höheres Risiko für postoperative Wundinfektionen bietet [147]. Jedoch hat demzufolge das hier genutzte Traumamodell einen näheren, klinisch-relevanten Bezug zu iatrogenen Skelettmuskelverletzungen wie beispielsweise im Rahmen von endoprothetischen Operationen, welche ebenfalls überwiegend offen-chirurgischen Verfahren unterliegen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte zudem kein Versuchstier klinische Anzeichen einer unverhältnismäßigen lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion im Sinne einer Infektion.

4.3 CD8+ T-Zellen als Hemmschuh der Muskelregeneration

Die Rolle von CD8+ T-Zellen im Prozess der Skelettmuskelheilung ist zudem bisher unzureichend untersucht. Allerdings gibt es Arbeiten aus dem Bereich der Muskeldystrophie, welche die Funktion der CD8-Zellen beschrieben haben. Bekannt ist beispielsweise, dass es in dystrophischer Muskulatur durch Anwesenheit von CD8+ T-Zellen zur einer vermehrten Perforin-abhängigen Nekrosebildung an Muskelfasern kommt [148]. Ferner wurde beschrieben, dass CD8+ T-Zellen die Expression von CCL2 durch ansässige Makrophagen erleichtern. Dies ist wiederum unerlässlich für die Rekrutierung von Monozyten in das Verletzungsgebiet. Umgekehrt zeigte sich in CD8-knockout Mäusen eine vermehrte Narbenbildung sowie eine geringere Satellitenzell-Expansion durch mangelnde CCL2-Rekrutierung. Dies ist assoziiert mit einer insuffizienten Muskelregeneration [149].

Gezeigt wurde ebenfalls bereits eine verstärkte Akkumulation von CD8+ T-Zellen im Frakturhämatom von Patienten mit gestörter Knochenheilung [141]. Zytotoxische CD8+ T-Zellen haben zudem eine hohe pro-inflammatorische Wirkung und können durch Einfluss auf die Sekretion von Zytokinen wie TNF α und IFN- γ die zeitgerechte Auflösung der initialen Entzündungsreaktion verzögern bzw. verhindern, was nachfolgende Heilungsphasen negativ beeinflusst und den Prozess der Narbengewebebildung verstärkt [149]. So reguliert IFN- γ einerseits den Phänotyp der Makrophagen bei mdx-Mäusen, sodass sich das Expressionsmuster zu M1-Makrophagen und somit zu einer pro-inflammatorischen Reaktion verschiebt [51]. Andererseits reguliert IFN- γ die Expression von Myogenin an Satellitenzellen. Durch eine Deletion von CIITA resultierte ein absoluter Myogeninmangel. Zudem kann ein Aufkommen im Spätstadium eine Differenzierung hemmen und so zu einer insuffizienten Regeneration führen [55, 150]. Im Rahmen einer prolongierten Frühphase supprimiert TNF α zusätzlich die CD163-Expression, was die folgende regenerativen Phasen verzögern kann [59].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Akkumulation von CD8+ T-Zellen einen wesentlichen Beitrag zur unzureichenden Regeneration nach schweren Muskeltraumata leistet. Diese Beobachtungen stützen die Ergebnisse dieser Arbeit mit Depletion aller CD8+ T-Zellen. So zeigten die Tiere, welche eine anti-CD8-Antikörpertherapie erhalten haben, einen signifikant geringeren relativen Verlust an Muskelkraft von nur noch 7 % (schnell-zuckende Muskelkontraktion) bzw. 9 % bei tetanischen Muskelkontraktionen nach 28 Tagen im Vergleich zur intakten Muskulatur der Gegenseite.

Andere Untersuchungen aus dem Bereich der Knochenheilung, unterstützen diese Beobachtung und zeigen ebenfalls einen positiven Einfluss der Depletion von CD8+ T-Zellen auf die endogene Regeneration. Reinke et al. beschrieben eine Erhöhung von terminal differenzierten CD8+ T-Effektorgedächtniszellen (T_{EMRA}) sowohl in peripherem Blut als auch im Frakturhämatom bei Patienten mit gestörter Frakturheilung. Diese Zellen sind lokal die Hauptproduzenten von IFN- γ und TNF α und verhindern so den Übergang von der pro- zur anti-inflammatorischen Heilungsphase und beeinflussen dadurch nachfolgende Regenerationsschritte negativ, da dies die Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen signifikant einschränkt. Ferner wurde in einem Osteotomiemodell der Maus eine verbesserte endogene Frakturheilung durch CD8-Depletion beschrieben. Umgekehrt führte die Erhöhung systemischer CD8+ T-Zell-Level durch einen adaptive Transfer dieser Zellen zu einem Ausbleiben der Knochenheilung [90].

Es ist bekannt, dass es bestimmten T-Zell-Subpopulationen möglich ist, über spezifische „Homing“-Rezeptoren durch Gefäßendothel zu einem Verletzungsgebiet vorzudringen. Die dafür notwendigen Liganden bzw. Chemokine werden insbesondere durch Zellen ausgeschüttet, welche unter chronischem Stress stehen. Antigen-präsentierende Zellen sind für diese Rekrutierungswege nicht notwendig. Dies trifft auch für CD8+ T_{EMRA} -Zellen zu. Diese Zellen können sich auch ohne CD80/86+ Zellen reaktivieren. Trigger sind hier ebenfalls Zytokine [90]. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen nicht erfolgt. Ob sich diese spezifischen, pro-inflammatorischen T-Zell-Subpopulationen auch auf die Regeneration von Skelettmuskulatur auswirken, erfordert weiterführende Untersuchungen.

4.4 CD4/CD8-Ratio mit möglicher prädiktiver Funktion

Ein weiterer relevanter Faktor des Einflusses des adaptiven Immunsystems scheint ebenfalls das Verhältnis aus Anreicherung von CD4+ und CD8+ T-Zellen zu sein. Aus Untersuchungen aus dem Bereich der Knochenheilung ist bekannt, dass CD4+ regulatorische T-Zellen autoreaktive Prozesse kontrollieren und so die Knochenheilung überwachen [151]. Dies steht im Kontrast zu den Wirkprozessen der pro-inflammatorischen CD8+ T-Zellen. Schlundt et al. beschrieben das Verhältnis aus CD8+ zu CD4+ T-Zellen als prädiktiven Marker für eine suffiziente bzw. kompromittierte Knochenheilung. Dieses Verhältnis konnte sowohl für lokale als auch für systemische Zellkonzentrationen widergespiegelt werden [152]. Ein wichtiger Begleitfaktor für die Validität dieses prädiktiven Markers scheint jedoch die Erfahrung des Immunsystems zu sein. In einem Osteotomiemodell der Maus zeigten sich hier bei naiven/unerfahrenen Immunsystemen (resultierend aus einer Haltung unter keimarmen Bedingungen) eine im Verhältnis geringere Zahl an CD8+ Effektor-T-Zellen im Vergleich zu angepassten/erfahrenen Immunsystemen. Ausgehend von dieser Erfahrungsabhängigkeit kann auf eine Altersabhängigkeit geschlossen werden. Hierzu wurde bei älteren - d.h. erfahreneren bzw. adaptierten – Immunsystemen eine vermehrte Vorläuferzellproliferation gegenüber einer reduzierten Vorläuferzelldifferenzierung als Ausdruck einer vermehrten pro-inflammatorische Wirkung mit verzögerter Knochenheilung beobachtet [141]. Obwohl CD4+ regulatorischen T-Zellen eine heilungsfördernde Wirkung bei lokaler Anreicherung an einem Knochentransplantat zeigten, ergab eine exogene, intravasale Anreicherung von CD4+ T-Zellen zur künstlichen Verschiebung des Verhältnisses vor einem knöchernen Trauma jedoch bei immunerfahrenen Mäusen nur eine 50 %-ige Heilungschance bzw. Rate an signifikant beeinträchtigter Knochenheilung [152, 153].

Eine entsprechende Abhängigkeit kann auch bei den Prozessen der Muskelregeneration zum aktuellen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich an Tag sieben eine signifikant geringere Ratio aus CD4+ zu CD8+ T-Zellen im Verletzungsgebiet als im peripheren Blut. Demzufolge war die lokale Konzentration an CD8+ T-Zellen im verletzten Muskel verhältnismäßig höher als in der Peripherie, was auf einen noch nach sieben Tagen anhaltenden, pro-inflammatorischen Prozess in Rahmen der Muskelregeneration schließen lassen könnte. In der Literatur ist vielfältig beschrieben, dass eine Abnahme der intramuskulären T-Zell-Level zurück zu prätraumatischen Konzentrationen nach sieben bis zehn Tagen mit einer erfolgreichen Heilung assoziiert ist. Hierbei gilt jedoch wiederum zu beachten, dass bei diesen Studien nur minderschwere Muskeltraumata erfolgten und nur eine longitudinale Betrachtung der Gesamtheit der CD45+ Zellen sowie der CD4+ (regulatorischen) T-Zellen beschrieben wurde [93, 146]. Die longitudinale Beobachtung der CD4+/CD8+-T-Zell-Ratio und des intramuskulären Vorkommens von pro-inflammatorischen CD8+ T-Zellen im Rahmen eines schweren, klinisch-relevanten Muskeltraumas erfordert weiterführende Experimente.

4.5 Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Untersuchungen

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit anderen Studien. Die meisten Studien, welche sich mit den Mechanismen der Muskelregeneration befassen, nutzen zur qualitativen und quantitativen Erhebung eine histologische Beschreibung. Unter anderem werden dort die Anzahl an Regeneratfasern oder neuen Muskelfasern, die Ausdehnung von Fibrosearealen sowie der Grad von Revaskularisierung und Reinnervation beschrieben. Diese Arbeit fokussierte sich jedoch neben durchflusszytometrischen Untersuchungen auf ein biomechanisches Outcome der entsprechenden Interventionsgruppen als funktionales Ergebnis der Muskelregeneration. Dies entspricht gängigen Endpunkten im Bereich der klinischen Forschung. Um jedoch diese Arbeit angemessen in den Kontext von Vorarbeiten stellen zu können, wären zukünftige Experimente mit einer histologischen Aufarbeitung sinnvoll. In früheren Studien mit diesem Quetschtraumamodell wurden funktionelle Verluste an relativer Muskelkraft auch mit einer strukturellen Änderung wie verringerter Muskelfaserdichte und erhöhter Narbenbildung in Verbindung gebracht [89]. Dieses Traumamodell ist darauf ausgerichtet, ein klinisch-relevantes Trauma zu imitieren, welches nachweislich auch durch diese histologischen Veränderungen zu einer unzureichenden Heilung führt. Jedoch zeigte sich bei Pumberger et al. bereits in der Kontrollgruppe, welche mit der Kontrollgruppe dieser Arbeit vergleichbar ist, ein Regeneratzellanteil von ca. 33 % an Tag 28 [113]. Ob sich der signifikant geringere Kraftverlust nach anti-CD8-Antikörperintervention auch histologisch durch beispielsweise einen höheren Anteil an Regeneratfasern validieren lässt, müsste in künftigen Untersuchungen bestimmt werden.

4.6 Ausblick und Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte jedoch durch die vorliegende Arbeit eine Kinetik des T-Zellvorkommens über 14 Tage nach schwerem Trauma der Skelettmuskulatur beschrieben werden. Die relativen Maxima der T-Zellkonzentrationen an Tag sieben sowie das Verhältnis aus CD4+ zu CD8+ T-Zellen lassen Rückschlüsse auf einen gestörten Regenerationsprozess der verletzten Muskulatur zu. Insbesondere die anti-CD8-Antikörperintervention erbrachte einen signifikant geringeren relativen Kraftverlust nach 28 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse lassen die Idee eines translationalen Ansatzes greifbarer erscheinen. Jedoch würde eine CD8-Depletion beim Menschen zu einem (vorübergehend) gravierenden Immundefekt führen. Vergleichbar könnte das sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte CD8-Mangel-Syndrom sein, welches durch eine Mutation im CD8 α -Gen beruht und so auf einem Fehlen von CD8+ T-Zellen beruht. Dies macht Betroffene anfälliger für rezidivierende bakterielle und virale Atemwegsinfektionen, welche abhängig vom Schweregrad des Phänotypen potenziell tödlich enden können [154]. Dadurch schließt sich eine humane Anwendung dieses therapeutischen Ansatzes aus. Zudem stellt die Gabe von Antikörpern in ausreichender Menge im Verhältnis zur hohen Anzahl an muskulären Verletzungen pro Jahr ein ökonomisches Problem dar.

Der alternative Ansatz, den „Gegenspieler“ der CD8+ T-Zellen in Form der CD4+ regulatorischen T-Zellen zu erhöhen, ist nach der Arbeit von Schlundt et al. aus dem Bereich der Frakturheilung ebenfalls kritisch zu bewerten, da die humanen Immunsysteme, welche einer solchen Therapie bedürften, bereits einen adaptierten Zustand erreicht hätten. Entsprechend des im murinen Modell gezeigten Resultates, wäre demzufolge auch beim Menschen in Bezug auf die Muskelregeneration eine insuffiziente Heilung denkbar [152]. Hierzu bedürfte es jedoch weiterer Untersuchungen. Ferner wäre auch bezüglich einer Therapie mit regulatorischen T-Zellen der ökonomische Faktor zu bedenken.

Einen vielversprechenden alternativen Ansatz scheint jedoch das Tissue Engineering mit dem Einsatz von Mesenchymalen Stammzellen darzustellen. Die durch Winkler et al. und von Roth et al. beschriebene verbesserte Muskelregeneration durch lokale und systemische Transplantation von MSC unterstreicht die regenerative Potenz dieser Zellen [129, 134]. Die genauen Wirkmechanismen der mesenchymalen Stammzellen sind dabei weiterhin unklar, jedoch ist bekannt, dass MSC auch eine immunmodulatorische Kompetenz besitzen. Möglich erscheint auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Verbindung zwischen der parakrinen Funktion von MSC und dem adaptiven Immunsystem bestehen könnte. Insbesondere eine Modulation der pro-inflammatorischen Wirkung von CD8+ T-Zellen könnte einen der Wirkmechanismen darstellen, welcher in Vorarbeiten zu einer signifikant geringeren Kraftverlust nach schwerem Muskeltrauma geführt hat [113]. Um eine solche Verbindung zu detektieren und mögliche translationalen Ansätze entwickeln zu können, erfordert es eine longitudinale Betrachtung der Zellen des adaptiven Immunsystems unter dem lokalen Einfluss transplanteder mesenchymaler Stammzellen in diesem klinisch-relevanten Traumamodell.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz, welcher sich auf Grundlage dieser Arbeit und Vorarbeiten aus dem Bereich der Knochenheilung ergibt, ist die exogene Immunmodulation durch einen pharmakologischen Ansatz. Besonders interessant erscheinen dabei Wirkstoffe, die eine Verschiebung zu einem hoher CD4+/CD8+ T-Zell-Ratio bewirken können. Als vielversprechend zeigten sich in der Arbeit von Wendler et al. Prostazykline bzw. das Prostazyklin-Analogon Illoprost. In vitro bewirkte es eine Abnahme der regenerationshemmenden zytotoxischen CD8+ T-Zellen. Zudem konnte in einem Osteotomie-Modell der Maus bei Gabe zum Zeitpunkt der frühen Inflammation eine Abnahme der pro-inflammatorischen Reaktion mit erniedrigten IFN- γ - und TNF α -Leveln während einer verstärkten Typ-2 Immunantwort beobachtet werden. Dies resultierte in einer verbesserten Knochenheilung [155]. Es benötigt jedoch weitere Untersuchungen, ob sich die vorliegende Arbeit translational auf den Menschen übertragen lässt. Ferner sind weitere Experimente erforderlich, um aufbauend auf diese Arbeit ebenfalls die Wirkung von immunmodulatorischen Wirkstoffen auf die Mechanismen der Muskelregeneration zu zeigen.

Manuela Hoffmann: Einfluss von CD3+ T-Zellen auf die Muskelregeneration nach einem schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte

Insgesamt liefert diese Arbeit wichtige Grunderkenntnisse bezogen auf die Rolle des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Regeneration von schwer verletzter Skelettmuskulatur. Insbesondere die Präsenz bzw. Abwesenheit der CD8+ T-Zellen erscheint entscheidend für eine suffizientere Heilung zu sein. Eine vollständige Regeneration konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Dennoch lassen sich auf Grundlage dieser Ergebnisse weitere Experimente anschließen, welche schließlich neue therapeutische Ansätze zur Behandlung und gegebenenfalls zur Prävention von verletzter Skelettmuskulatur mit dem Potenzial zum translationalen Einsatz am Menschen generieren könnten.

Literaturverzeichnis

- 1 Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183-95.
- 2 Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12601-4.
- 3 Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res.* 1994(304):78-83.
- 4 Ekstrand J, Häggglund M, Waldén M. Injury incidence and injury patterns in professional football: the UEFA injury study. *Br J Sports Med.* 2011;45(7):553-8.
- 5 James SL, Lucchesi LR, Bisignano C, Castle CD, Dingels ZV, Fox JT, Hamilton EB, Liu Z, McCracken D, Nixon MR, Sylte DO, Roberts NLS, Adebayo OM, Aghamolaei T, Alghnam SA, Aljunid SM, Almasi-Hashiani A, Badawi A, Behzadifar M, Bekru ET, Bennett DA, Chapman JR, Deribe K, Duko Adema B, Fatahi Y, Gelaw BK, Getahun EA, Hendrie D, Henok A, Hidru H, Hosseinzadeh M, Hu G, Jahani MA, Jakovljevic M, Jalilian F, Joseph N, Karami M, Kelbore AG, Khan MN, Kim YJ, Koul PA, La Vecchia C, Linn S, Majdzadeh R, Mehndiratta MM, Memiah PTN, Mengesha MM, Merie HE, R Miller T, Mirzaei-Alavijeh M, Mohammad Darwesh A, Mohammad Gholi Mezerji N, Mohammadibakhsh R, Moodley Y, Moradi-Lakeh M, Musa KI, Nascimento BR, Nikbakhsh R, Nyasulu PS, Omar Bali A, Onwujekwe OE, Pati S, Pourmirza Kalhori R, Salehi F, Shahabi S, Shallo SA, Shamsizadeh M, Sharafi Z, Shukla SR, Sobhiyeh MR, Soriano JB, Sykes BL, Tabarés-Seisdedos R, Tadesse DBB, Tefera YM, Tehrani-Banihashemi A, Tlou B, Topor-Madry R, Wiangkham T, Yaseri M, Yaya S, Yenesew MA, Younis MZ, Ziapour A, Zodpey S, Pigott DM, Reiner RC, Hay SI, Lopez AD, Mokdad AH. Morbidity and mortality from road injuries: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Inj Prev.* 2020;26(Supp 1):i46-i56.
- 6 Ekstrand J, Häggglund M, Waldén M. Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med.* 2011;39(6):1226-32.
- 7 Rupp M, Lau E, Kurtz SM, Alt V. Projections of Primary TKA and THA in Germany From 2016 Through 2040. *Clin Orthop Relat Res.* 2020;478(7):1622-33.
- 8 Memtsoudis SG, Pumberger M, Ma Y, Chiu YL, Fritsch G, Gerner P, Poultsides L, Valle AG. Epidemiology and risk factors for perioperative mortality after total hip and knee arthroplasty. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2012;30(11):1811-21.
- 9 Mäkelä KT, Matilainen M, Pulkkinen P, Fenstad AM, Havelin LI, Engesaeter L, Furnes O, Overgaard S, Pedersen AB, Kärrholm J, Malchau H, Garellick G, Ranstam J, Eskelinen A. Countrywise results of total hip replacement. An analysis of 438,733 hips based on the Nordic Arthroplasty Register Association database. *Acta Orthop.* 2014;85(2):107-16.

- 10 Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, Kuskowski M, Cheng EY, Sharkey PF, Parvizi J, Stiehl JB, Mont MA. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision? *Int Orthop*. 2008;32(5):597-604.
- 11 Kovalak E, Özdemir H, Ermutlu C, Obut A. Assessment of hip abductors by MRI after total hip arthroplasty and effect of fatty atrophy on functional outcome. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2018;52(3):196-200.
- 12 Kennon R, Keggi J, Zatorski LE, Keggi KJ. Anterior approach for total hip arthroplasty: beyond the minimally invasive technique. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-A Suppl 2:91-7.
- 13 Muller M, Tohtz S, Springer I, Dewey M, Perka C. Randomized controlled trial of abductor muscle damage in relation to the surgical approach for primary total hip replacement: minimally invasive anterolateral versus modified direct lateral approach. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2011;131(2):179-89.
- 14 Böhm H, Hagemeyer D, Thummerer Y, Kipping R, Stöckle U, Scheuerer K. Rehabilitation of gait in patients after total hip arthroplasty: Comparison of the minimal invasive Yale 2-incision technique and the conventional lateral approach. *Gait Posture*. 2016;44:110-5.
- 15 Yue C, Kang P, Pei F. Comparison of Direct Anterior and Lateral Approaches in Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA). *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(50):e2126.
- 16 Vasilakis I, Solomou E, Vitsas V, Fennema P, Korovessis P, Siambelis DK. Correlative analysis of MRI-evident abductor hip muscle degeneration and power after minimally invasive versus conventional unilateral cementless THA. *Orthopedics*. 2012;35(12):e1684-91.
- 17 van Oldenrijk J, Hoogland PV, Tuijthof GJ, Corveleijn R, Noordenbos TW, Schafroth MU. Soft tissue damage after minimally invasive THA. *Acta Orthop*. 2010;81(6):696-702.
- 18 Woolson ST, Mow CS, Syquia JF, Lannin JV, Schurman DJ. Comparison of primary total hip replacements performed with a standard incision or a mini-incision. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86(7):1353-8.
- 19 Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, Cooper AB, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Barr A, Cook D, Slutsky AS, Group CCCT. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(8):683-93.
- 20 von Roth P, Abdel MP, Wauer F, Winkler T, Wassilew G, Diederichs G, Perka C. Significant muscle damage after multiple revision total hip replacements through the direct lateral approach. *Bone Joint J*. 2014;96-B(12):1618-22.

- 21 Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93(1):23-67.
- 22 Cheung K, Hume P, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. *Sports medicine.* 2003;33(2):145-64.
- 23 Chillemi C, Petrozza V, Garro L, Sardella B, Diotallevi R, Ferrara A, Gigante A, Di Cristofano C, Castagna A, Della Rocca C. Rotator cuff re-tear or non-healing: histopathological aspects and predictive factors. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(9):1588-96.
- 24 Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(2):317-31.
- 25 Delos D, Maak TG, Rodeo SA. Muscle injuries in athletes: enhancing recovery through scientific understanding and novel therapies. *Sports Health.* 2013;5(4):346-52.
- 26 Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *Journal of applied physiology.* 2011;110(2):382-8.
- 27 Bayer ML, Magnusson SP, Kjaer M, Bispebjerg TRG. Early versus Delayed Rehabilitation after Acute Muscle Injury. *N Engl J Med.* 2017;377(13):1300-1.
- 28 Ziltener JL, Leal S, Fournier PE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: an update. *Ann Phys Rehabil Med.* 2010;53(4):278-82, 82-8.
- 29 Hotfiel T, Carl HD, Swoboda B, Heinrich M, Heiß R, Grim C, Engelhardt M. [Current Conservative Treatment and Management Strategies of Skeletal Muscle Injuries]. *Z Orthop Unfall.* 2016;154(3):245-53.
- 30 Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013;3(4):337-45.
- 31 Mishra DK, Fridén 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.
- 32 Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(2):C475-83.
- 33 El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.* 2007;78(4):661-9.

- 34 Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, Hogan MV, Huard J. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor β 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials*. 2016;87:147-56.
- 35 Drexler M, Dwyer T, Kosashvili Y, Chakraverty R, Abolghasemian M, Gollish J. Acetabular cup revision combined with tensor fascia lata reconstruction for management of massive abductor avulsion after failed total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2014;29(5):1052-7.
- 36 Whiteside LA, Nayfeh T, Katerberg BJ. Gluteus maximus flap transfer for greater trochanter reconstruction in revision THA. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;453:203-10.
- 37 Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288(2):R345-53.
- 38 Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports medicine*. 2008;38(11):947-69.
- 39 Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(7):1022-32.
- 40 Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1182-90.
- 41 Charrin S, Latil M, Soave S, Polesskaya A, Chrétien F, Boucheix C, Rubinstein E. Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nat Commun*. 2013;4:1674.
- 42 Gaudenzio N, Sibilano R, Marichal T, Starkl P, Reber LL, Cenac N, McNeil BD, Dong X, Hernandez JD, Sagi-Eisenberg R, Hammel I, Roers A, Valitutti S, Tsai M, Espinosa E, Galli SJ. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3981-98.
- 43 Dumont N, Bouchard P, Frenette J. Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(6):R1831-8.
- 44 Zhu L, Zhao Q, Yang T, Ding W, Zhao Y. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol*. 2015;34(1):82-100.
- 45 Honda H, Kimura H, Rostami A. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology*. 1990;70(2):272-7.
- 46 Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.

- 47 Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, Rando TA, Chawla A. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013;153(2):376-88.
- 48 St Pierre BA, Tidball JG. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *Journal of applied physiology*. 1994;77(1):290-7.
- 49 Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med*. 2003;37(4):284-6.
- 50 Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol*. 2015;6:212.
- 51 Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol*. 2011;187(10):5419-28.
- 52 Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol*. 2012;189(7):3669-80.
- 53 Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204(5):1057-69.
- 54 Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J*. 2011;25(10):3344-55.
- 55 Londhe P, Davie JK. Interferon- γ resets muscle cell fate by stimulating the sequential recruitment of JARID2 and PRC2 to promoters to repress myogenesis. *Sci Signal*. 2013;6(305):ra107.
- 56 Rigamonti E, Zordan P, Sciorati C, Rovere-Querini P, Brunelli S. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. *Biomed Res Int*. 2014;2014:560629.
- 57 Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol*. 2008;181(12):8633-41.
- 58 Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2004;94(1):119-26.

- 59 Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):97-103.
- 60 Moestrup SK, Møller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004;36(5):347-54.
- 61 Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *J Pathol.* 2014;232(3):344-55.
- 62 Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994;55(3):410-22.
- 63 Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209-38.
- 64 MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-5.
- 65 Pallafacchina G, Blaauw B, Schiaffino S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23 Suppl 1:S12-8.
- 66 Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3647-56.
- 67 Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3639-46.
- 68 Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med.* 2015;21(1):76-80.
- 69 Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1027-59.
- 70 Rocheteau P, Vinet M, Chretien F. Dormancy and quiescence of skeletal muscle stem cells. *Results Probl Cell Differ.* 2015;56:215-35.
- 71 Clarke MS, Feedback DL. Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. *FASEB J.* 1996;10(4):502-9.
- 72 Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120(1):11-9.
- 73 Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology.* 2001;91(2):534-51.

- 74 Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell*. 2012;148(1-2):112-25.
- 75 Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, Zaniolo G, Mazzoleni F, Vitiello L. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci*. 2002;23(4):189-94.
- 76 Ceafalan LC, Fertig TE, Popescu AC, Popescu BO, Hinescu ME, Gherghiceanu M. Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. *Cell Adh Migr*. 2018;12(3):228-35.
- 77 Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 2011;138(17):3625-37.
- 78 Bagalad BS, Mohan Kumar KP, Puneeth HK. Myofibroblasts: Master of disguise. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2017;21(3):462-3.
- 79 Moyer AL, Wagner KR. Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(6):568-73.
- 80 Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, Zhang RH, Natarajan A, Nedospasov SA, Rossi FM. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med*. 2015;21(7):786-94.
- 81 Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol*. 2007;26(8):615-24.
- 82 Sassoli C, Chellini F, Pini A, Tani A, Nistri S, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Bani D, Formigli L. Relaxin prevents cardiac fibroblast-myofibroblast transition via notch-1-mediated inhibition of TGF- β /Smad3 signaling. *PLoS One*. 2013;8(5):e63896.
- 83 Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21(5):798-804.
- 84 Taniguti AP, Pertille A, Matsumura CY, Santo Neto H, Marques MJ. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- β 1 blocker. *Muscle Nerve*. 2011;43(1):82-7.
- 85 Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117302.

- 86 Ferguson MW. Scar wars. *Br Dent J.* 2002;192(8):475.
- 87 Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman PK. Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol.* 2014;184(4):1167-84.
- 88 Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen 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.
- 89 Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta orthopaedica.* 2011;82(1):102-11.
- 90 Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M, Hartwig T, Akyüz L, Meisel C, Unterwalder N, Singh NB, Reinke P, Haas NP, Volk HD, Duda GN. Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Science translational medicine.* 2013;5(177):177ra36.
- 91 Konnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C, Schell H, Hauser A, Ellinghaus A, Volk HD, Radbruch A, Duda GN, Schmidt-Bleek K. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone.* 2014;64:155-65.
- 92 Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve.* 1991;14(6):515-20.
- 93 Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, Sefik E, Tan TG, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell.* 2013;155(6):1282-95.
- 94 McLennan IS. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J Anat.* 1996;188 (Pt 1):17-28.
- 95 Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):775-85.
- 96 Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Gao X, Millecchia L, O'Farrell L, Kuziel WA, Simeonova PP. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2005;19(3):413-5.
- 97 Wang Y, Wehling-Henricks M, Samengo G, Tidball JG. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell.* 2015;14(4):678-88.

- 98 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
- 99 Burzyn D, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1007-13.
- 100 Gratz IK, Rosenblum MD, Maurano MM, Paw JS, Truong HA, Marshak-Rothstein A, Abbas AK. Cutting edge: Self-antigen controls the balance between effector and regulatory T cells in peripheral tissues. *J Immunol*. 2014;192(4):1351-5.
- 101 Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*. 2011;20(4):790-805.
- 102 Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*. 2016;44(2):355-67.
- 103 Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, Sun K, Sun H, Wang H, Zhang Z, Zhang BT, Sheng C, Hu P. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res*. 2015;25(9):1082-3.
- 104 Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, Miceli MC, Spencer MJ. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1583-94.
- 105 Simon T, Anegon I, Blancou P. Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer. *Immunotherapy*. 2011;3(4 Suppl):15-8.
- 106 Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21(4):589-601.
- 107 Marklund P, Mattsson CM, Wählin-Larsson B, Ponsot E, Lindvall B, Lindvall L, Ekblom B, Kadi F. Extensive inflammatory cell infiltration in human skeletal muscle in response to an ultraendurance exercise bout in experienced athletes. *Journal of applied physiology*. 2013;114(1):66-72.
- 108 Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol*. 2005;26(7):373-80.
- 109 Deyhle MR, Gier AM, Evans KC, Eggett DL, Nelson WB, Parcell AC, Hyldahl RD. Skeletal Muscle Inflammation Following Repeated Bouts of Lengthening Contractions in Humans. *Front Physiol*. 2015;6:424.

- 110 Syverud BC, VanDusen KW, Larkin LM. Growth Factors for Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*. 2016;202(3-4):169-79.
- 111 Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo*. 2009;23(5):779-96.
- 112 Grasman JM, Do DM, Page RL, Pins GD. Rapid release of growth factors regenerates force output in volumetric muscle loss injuries. *Biomaterials*. 2015;72:49-60.
- 113 Pumberger M, Qazi TH, Ehrentraut MC, Textor M, Kueper J, Stoltenburg-Didinger G, Winkler T, von Roth P, Reinke S, Borselli C, Perka C, Mooney DJ, Duda GN, Geißler S. Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration. *Biomaterials*. 2016;99:95-108.
- 114 Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*. 2008;456(7221):502-6.
- 115 Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 2005;122(2):289-301.
- 116 Webster MT, Manor U, Lippincott-Schwartz J, Fan CM. Intravital Imaging Reveals Ghost Fibers as Architectural Units Guiding Myogenic Progenitors during Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2016;18(2):243-52.
- 117 Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, Wagers AJ. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell*. 2008;134(1):37-47.
- 118 Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, Sacco A, Leonardi NA, Kraft P, Nguyen NK, Thrun S, Lutolf MP, Blau HM. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 2010;329(5995):1078-81.
- 119 Rossi CA, Flaibani M, Blaauw B, Pozzobon M, Figallo E, Reggiani C, Vitiello L, Elvassore N, De Coppi P. In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB J*. 2011;25(7):2296-304.
- 120 Sleep E, Cosgrove BD, McClendon MT, Preslar AT, Chen CH, Sangji MH, Pérez CMR, Haynes RD, Meade TJ, Blau HM, Stupp SI. Injectable biomimetic liquid crystalline scaffolds enhance muscle stem cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(38):E7919-E28.
- 121 Matthias N, Hunt SD, Wu J, Lo J, Smith Callahan LA, Li Y, Huard J, Darabi R. Volumetric muscle loss injury repair using in situ fibrin gel cast seeded with muscle-derived stem cells (MDSCs). *Stem Cell Res*. 2018;27:65-73.

- 122 Lorant J, Saury C, Schleder C, Robriquet F, Lieubeau B, Négroni E, Leroux I, Chabrand L, Viau S, Babarit C, Ledevin M, Dubreil L, Hamel A, Magot A, Thorin C, Guevel L, Delorme B, Péréon Y, Butler-Browne G, Mouly V, Rouger K. Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human MuStem Cells following Transplantation into Injured Mice Muscle. *Mol Ther.* 2018;26(2):618-33.
- 123 Hashimoto H, Tamaki T, Hirata M, Uchiyama Y, Sato M, Mochida J. Reconstitution of the complete rupture in musculotendinous junction using skeletal muscle-derived multipotent stem cell sheet-pellets as a "bio-bond". *PeerJ.* 2016;4:e2231.
- 124 Meng J, Chun S, Asfahani R, Lochmüller H, Muntoni F, Morgan J. Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. *Mol Ther.* 2014;22(5):1008-17.
- 125 Rodriguez-Menocal L, Shareef S, Salgado M, Shabbir A, Van Badiavas E. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:24.
- 126 Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):11-5.
- 127 Park S, Choi Y, Jung N, Yu Y, Ryu KH, Kim HS, Jo I, Choi BO, Jung SC. Myogenic differentiation potential of human tonsil-derived mesenchymal stem cells and their potential for use to promote skeletal muscle regeneration. *Int J Mol Med.* 2016;37(5):1209-20.
- 128 Qazi TH, Mooney DJ, Duda GN, Geissler S. Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs. *Biomaterials.* 2017;140:103-14.
- 129 Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda GN, Perka C. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2012;6 Suppl 3:s60-7.
- 130 Sassoli C, Pini A, Chellini F, Mazzanti B, Nistri S, Nosi D, Saccardi R, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PLoS One.* 2012;7(7):e37512.
- 131 Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Mehta M, Perka C, Duda GN. Dose-response relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after severe skeletal muscle injury in rats. *Tissue engineering Part A.* 2009;15(3):487-92.
- 132 von Roth P, Duda GN, Radojewski P, Preininger B, Perka C, Winkler T. Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats. *Gender medicine.* 2012;9(2):129-36.

- 133 Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue engineering*. 2006;12(2):361-7.
- 134 von Roth P, Duda GN, Radojewski P, Preininger B, Strohschein K, Röhner E, Perka C, Winkler T. Intra-Arterial MSC Transplantation Restores Functional Capacity After Skeletal Muscle Trauma. *Open Orthop J*. 2012;6:352-6.
- 135 Winkler T, von Roth P, Schuman MR, Sieland K, Stoltenburg-Didinger G, Taupitz M, Perka C, Duda GN, Matziolis G. In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats. *Tissue engineering Part A*. 2008;14(7):1149-60.
- 136 Youssef A, Aboalola D, Han VK. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int*. 2017;2017:9453108.
- 137 Winkler T, Perka C, von Roth P, Agres AN, Plage H, Preininger B, Pumberger M, Geissler S, Hagai EL, Ofir R, Pinzur L, Eyal E, Stoltenburg-Didinger G, Meisel C, Consentius C, Streitz M, Reinke P, Duda GN, Volk HD. Immunomodulatory placental-expanded, mesenchymal stromal cells improve muscle function following hip arthroplasty. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(5):880-97.
- 138 Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon JM, Tajbakhsh S, Rocheteau P, Chrétien F. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147198.
- 139 MACS Miltenyi Biotec: Skeletal Muscle Dissociation Kit - mouse and rat [Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/en/~media/images/products/import/0006400/im0006445.a.shx>].
- 140 Spencer MJ, Tidball JG. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord*. 2001;11(6-7):556-64.
- 141 Bucher CH, Schlundt C, Wulsten D, Sass FA, Wendler S, Ellinghaus A, Thiele T, Seemann R, Willie BM, Volk HD, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Experience in the Adaptive Immunity Impacts Bone Homeostasis, Remodeling, and Healing. *Front Immunol*. 2019;10:797.
- 142 Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):665-74.
- 143 Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
- 144 Panduro M, Benoist C, Mathis D. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(11):E2585-E93.

- 145 Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, Margeta M, Spencer MJ, Bluestone JA. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Science translational medicine*. 2014;6(258):258ra142.
- 146 Castiglioni A, Corna G, Rigamonti E, Basso V, Vezzoli M, Monno A, Almada AE, Mondino A, Wagers AJ, Manfredi AA, Rovere-Querini P. FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128094.
- 147 Vopat BG, Lee BJ, DeStefano S, Waryasz GR, Kane PM, Gallacher SE, Fava J, Green AG. Risk Factors for Infection After Rotator Cuff Repair. *Arthroscopy*. 2016;32(3):428-34.
- 148 Spencer MJ, Walsh CM, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2745-51.
- 149 Zhang J, Xiao Z, Qu C, Cui W, Wang X, Du J. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1(high) macrophage infiltration. *J Immunol*. 2014;193(10):5149-60.
- 150 Londhe P, Davie JK. Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol Cell Biol*. 2011;31(14):2854-66.
- 151 Lei H, Schmidt-Bleek K, Dienelt A, Reinke P, Volk HD. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Front Pharmacol*. 2015;6:184.
- 152 Schlundt C, Reinke S, Geissler S, Bucher CH, Giannini C, Märdian S, Dahne M, Kleber C, Samans B, Baron U, Duda GN, Volk HD, Schmidt-Bleek K. Individual Effector/Regulator T Cell Ratios Impact Bone Regeneration. *Front Immunol*. 2019;10:1954.
- 153 Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen W, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med*. 2011;17(12):1594-601.
- 154 Dumontet E, Osman J, Guillemont-Lambert N, Cros G, Moshous D, Picard C. Recurrent Respiratory Infections Revealing CD8alpha Deficiency. *J Clin Immunol*. 2015;35(8):692-5.
- 155 Wendler S, Schlundt C, Bucher CH, Birkigt J, Schipp CJ, Volk HD, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Immune Modulation to Enhance Bone Healing-A New Concept to Induce Bone Using Prostacyclin to Locally Modulate Immunity. *Front Immunol*. 2019;10:713.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Manuela Hoffmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Einfluss von CD3+ T-Zellen auf die Muskelregeneration nach einem schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Manuela Hoffmann: Einfluss von CD3+ T-Zellen auf die Muskelregeneration nach einem schweren Skelettmuskeltrauma der Ratte

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation:

Zimmerer A, **Hoffmann M**, Hofer A, Janz V, Wassilew GI. [Hip-spine syndrome-current developments and state of the evidence]. Orthopade. 2020;49(10):841-8.

Abstract-Veröffentlichung:

Hoffmann M, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K et al. Neue pharmakologische Ansätze zur Verbesserung der Muskelregeneration. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie 2020; 158(S01): 177

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, welche mich bei dieser Dissertation unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zunächst möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Perka für die Überlassung des Themas sowie die stets freundliche Unterstützung danken, welche die Umsetzung dieser Forschungsarbeit erst möglich gemacht hat. Insbesondere der fachliche Austausch und die zahlreichen über den Tellerrand hinaus gehenden Gespräche haben meinen Werdegang konsequent gefördert.

Mein besonderer Dank für ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit geht gleichermaßen an Dr. med. Michael Fuchs und Dr.-Ing. Sven Geißler. Ihre Hilfsbereitschaft – auch beim mühevollen Korrekturlesen – und stetige Ermutigung waren über die gesamte Zeit eine wertvolle Stütze. Nicht zuletzt beim Übergang in das Berufsleben standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Auch danke ich den Mitarbeitern des Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien (BCRT), des Julius Wolff Instituts (JWI), des Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) und der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die wissenschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. med. Wassilew und PD Dr. med. Janz sowie allen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie der Universitätsmedizin Greifswald, die mich in den letzten Zügen dieser Arbeit unterstützt haben und mir den nötigen Freiraum zur Verschriftlichung ermöglicht haben.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Studienzeit und der Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben. Ich danke ihnen für ihre unerschöpfliche Geduld, für jeden ermutigenden Rat und die beständige Sicherheit, die sie mit mir geteilt haben. Für seinen uneingeschränkten Rückhalt, seine liebevollen Aufmunterungen und seine zielsicheren Anshubser zur Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich schließlich von ganzem Herzen bei Jan Bohorc bedanken.