

**PERIURETHRALE INJEKTION ADULTER
MESENCHYMALER STAMMZELLEN ALS NEUER
THERAPIEANSATZ ZUR BEHANDLUNG DER
BELASTUNGSIKONTINENZ IM RATTENMODELL**

JOCHEN SCHÄFER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



schönheit verbindet
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

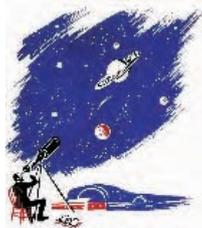
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere - Chirurgie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. M. Kramer

und

der Universitätsklinik für Urologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Stenzl

**Periurethrale Injektion adulter
mesenchymaler Stammzellen als
neuer Therapieansatz zur
Behandlung der
Belastungsinkontinenz im Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jochen Schäfer

Tierarzt aus Waiblingen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. M. Kramer

Prof. Dr. med. A. Stenzl

Tag der Disputation: 05.03.2009

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Inkontinenz in der Humanmedizin	3
2.2 Verschlussapparat der Harnblase (Corpus vesicae)	5
2.2.1 Muskuläre Mechanismen zum Verschluss der Harnblase (Erhalt der Kontinenz)	6
2.3 Therapiemöglichkeiten der Belastungsinkontinenz.....	7
2.4 Stammzellen und ihre Bedeutung für die Regenerationsmedizin	9
2.4.1 Mesenchymale Stammzellen (MSZ).....	10
2.4.1.1 Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz mit MSZ.....	12
2.5 Tissue Engineering (TE) und Regenerative Medizin	13
2.5.1 TE	13
2.6 Inkontinenzproblematik in der Tiermedizin	16
2.6.1 Therapie	18
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1 Tiere	21
3.1.1 Syngenes Tiermodell.....	21
3.1.2 Xenogenes Tiermodell.....	21
3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen (MSZ).....	22
3.2.1 Gewinnung der murinen MSZ (mMSZ)	22
3.2.2 Gewinnung der humanen MSZ (hMSZ)	23
3.2.2.1 Isolierung von hMSZ.....	23
3.2.3 Zellkultur	24
3.2.3.1 Inkubation von Zellen.....	24
3.2.3.2 Passagieren von Zellen	24
3.2.3.3 Induktion einer myogenen Differenzierung	24
3.2.4 Immuncytochemie kultivierter mesenchymaler Stammzellen	25
3.2.4.1 Antikörper	26

3.2.4.2 Auswertung.....	27
3.2.5 Markierung der Zellen mit PKH 26.....	27
3.3 Tier-OP	28
3.3.1 Versuchsablauf.....	28
3.3.1.1 Syngenes Tiermodell.....	28
3.3.1.2 Xenogenes Tiermodell.....	29
3.3.1.3 Zellapplikation.....	29
3.3.1.4 Entnahme der Rattenblasen	30
3.4 Aufarbeitung der Rattenblasen	31
3.4.1 Fixierung und Gewebeschnitte der Rattenblasen	31
3.4.1.1 Histologischer Nachweis transplantierte Zellen	32
3.4.2 Immunhistologie	32
4. Ergebnisse	34
4.1 Syngenes Tiermodell.....	34
4.1.1 Kulturerfolg	34
4.1.2 Myogene Differenzierung in vitro	34
4.1.2.1 Gegenüber 5-Azazytidin (5-Aza) exponierte MSZ	34
4.1.2.2 Nicht gegenüber 5-Aza exponierte Zellen – Kontrollen.....	37
4.1.3 Nachweis transplantierte Zellen in den histologischen Schnitten	40
4.1.4 Nachweis myogen differenzierter Zellen in den histologischen Schnitten	42
4.2 Xenogenes Tiermodell.....	45
4.2.1 Kulturerfolg	45
4.2.2 Myogene Differenzierung in vitro	47
4.2.2.1 Gegenüber 5-Aza exponierte MSZ	47
4.2.2.2 Nicht gegenüber 5-Aza exponierte Zellen – Kontrollen.....	51
4.2.3 Nachweis der applizierten Zellen in den histologischen Schnitten.....	57
4.2.4 Nachweis myogen differenzierter Zellen in den histologischen Schnitten	60
5. Diskussion	65
5.1 Gründe für neue Therapieoptionen der Belastungsinkontinenz.....	65
5.2 Wachstum der MSZ in vitro und deren Differenzierung	65
5.2.1 Wachstum.....	65

5.2.2 Differenzierung von MSZ (murin und human).....	66
5.3 5-Aza und dessen Möglichkeiten.....	67
5.4 Möglichkeiten der Zelltransplantation und Nachweis der Zellen.....	70
5.4.1 Nachweis der Zellen in vivo und deren Differenzierung.....	71
5.5 PKH 26-Markierung von MSZ zur Injektion in den Blasen Hals	73
5.6 Behandlung der Belastungsinkontinenz.....	75
5.6.1 Neue, zellbasierte Therapieformen.....	75
5.7 Fazit und Ausblick	82
6. Zusammenfassung.....	83
7. Summary	85
8. Literaturverzeichnis	87
9. Anhang	110
9.1 Nachweis der PKH26-Fluoreszenz im syngenem Tiermodell (Lewis Ratten)	110
9.2 Nachweis der PKH26-Fluoreszenz im xenogenem Tiermodell (Nacktratten)	111
10. Danksagung.....	114
11. Erklärung.....	116

Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
5-Aza	5-Azazytidin
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Nomenklatur für Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>Cluster of differentiation</i>)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Cy2	Grünfluoreszierendes Carbocyanin
d. h.	das heißt
DAB	3,3` Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DNA	Desoxirbonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
Fab	Antigenbindendes Fragment (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
HA	Hydroxylapatit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure

hMSZ	Humane mesenchymale Stammzellen
I. U.	Internationale Einheiten (<i>international units</i>)
IgG	Immunglobulin G
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LSAB	Labeled streptavidin biotin
M.	Musculus
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mMSZ	Murine mesenchymale Stammzellen
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
Myf5	Muskelentwicklungsfaktor 5 (<i>myogenic factor 5</i>)
MyoD	Muskeltranskriptionsfaktor (<i>myogenic determination factor</i>)
N.	Nervus
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
o. g.	oben genannt
Op	Operation
P	Passage der Zellkultur
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
TCP	Trikalziumphosphat (<i>tricalcium phosphate</i>)
TE	Tissue Engineering
u	undifferenziert
Vol. %	Volumenprozent
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Als Belastungsinkontinenz wird der unfreiwillige Verlust von Urin durch Anspannung, Anstrengung, Niesen oder Husten bezeichnet [Abrams et al. 2003]. Sie wird beim Menschen infolge physiologischer Apoptose durch eine mit dem Lebensalter korrelierende Abnahme von Muskelzellen des Rhabdosphinkters [Strasser et al. 1999] sowie durch morphologische und funktionale Defekte des Harnblasensphinkters als Folge von Operationen oder vaginalen Geburten hervorgerufen. Vor dem Hintergrund der Verschiebung der Alterspyramide in den Industrieländern zugunsten der älteren Menschen wird die Belastungsinkontinenz daher ein wachsendes gesundheitliches Problem darstellen. Bei den zurzeit angewandten chirurgischen Techniken für die Therapie der Belastungsinkontinenz wird nur eine passive Verengung der Urethra durchgeführt, eine direkte Heilung bzw. Regeneration des Rhabdosphinkters wird nicht erzielt [Deng et al. 2007]. Obwohl die injizierbaren Substanzen in den letzten Jahren verbessert wurden und der Kurzzeiterfolg befriedigend ist, gibt es immer noch Bedenken bezüglich der Dauerhaftigkeit des Effektes [Stenzl und Sievert 2007].

Auch in der Tiermedizin stellt die Harninkontinenz ein häufiges klinisches Problem bei Hunden dar [Holt 1985 und 1990]. Am häufigsten betroffen sind Hündinnen nach Kastration [Arnold 1997a] und Rüden großer Rassen [Holt und Thrusfield 1993].

Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin stellen die gängigen Therapieoptionen lediglich eine symptomatische und keine kausale Therapie dar.

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) lassen sich mit geringem Aufwand aus dem Knochenmark isolieren. Sie haben das Potential in Muskelgewebe [Wakitani et al. 1995; Ferrari et al. 1998] zu differenzieren. MSZ bieten deshalb eine neue Möglichkeit für eine zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz. Die Einbringung von nativen oder myogen differenzierten Muskelzellen kann die reduzierte Muskelzellichte wieder aufheben und den Kontinenzapparat funktionell restaurieren. Das Konzept einer Therapie der Belastungsinkontinenz mit patienteneigenen adulten Stammzellen stellt somit einen kausalen Therapieansatz

dar. Das Ziel ist die Regeneration des insuffizienten Kontinenzmechanismus. Hierfür sollen MSZ aus dem Knochenmark zunächst *in vitro* isoliert, expandiert und gegebenenfalls myogen differenzierte Subpopulationen separiert und weiter kultiviert werden. Durch die lokale Applikation der Stammzellen oder der aus ihnen hervorgegangenen differenzierten Zellen soll durch eine muskuläre Regeneration die physiologische Situation wieder hergestellt und eine funktionelle Verbesserung des Verschlussmechanismus erreicht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Inkontinenz in der Humanmedizin

Die International Continence Society (ICS) definiert die Harninkontinenz 1988 als Symptom jeden ungewollten Harnverlustes, der ein hygienisches oder soziales Problem darstellt und objektivierbar ist [Abrams et al. 1988].

Die Prävalenz der Belastungsinkontinenz beim Menschen korreliert mit dem zunehmenden Lebensalter und wird mit der Überalterung der Bevölkerung weiter ansteigen [Sievert et al. 2007c]. Nach Corcos et al. [2002] und Norton und Brubaker [2006] leiden 200 Millionen Menschen weltweit unter den Symptomen der Inkontinenz; eine Situation, die mit gesellschaftlicher Belastung und einer verringerten Lebensqualität verbunden ist.

An den Symptomen der Harninkontinenz, die sich in die Belastungs- (49 %) und Dranginkontinenz (22 %) mit der entsprechenden Überlappung (Mischinkontinenz 29 %) unterteilen lässt, leiden 30 % aller Frauen und 15 % aller Männer über 60 Jahren [Hunskar et al. 2005]. Die Wahrscheinlichkeit, an Harninkontinenz zu erkranken, liegt bei 30 Prozent [Hampel et al. 1997] und damit höher als bei anderen Volksleiden wie z.B. Bluthochdruck oder Diabetes.

Harninkontinenz ist vor allem ein Problem bei Frauen. Risikofaktoren für die Belastungsinkontinenz der Frau sind Geburten, das Alter und die Fettleibigkeit [Bump und Norton 1998]. Husten, Niesen, Laufen, Aufstehen und Treppensteigen führen zu einer Erhöhung des Harnblasendruckes, der den Verschlussdruck überschreitet und zum Urinverlust führt. Es wird diskutiert, dass eine angeborene Schwäche des urethralen Sphinktermechanismus bei Frauen und die Schwere der vaginalen Entbindung als wichtige Faktoren der Pathogenese der Belastungsinkontinenz im Zusammenhang stehen [Van Geelen et al. 1982]. Es wird gezeigt, dass durch die Geburt das Risiko von Harninkontinenz steigt und es scheint ein Tonusverlust des Beckenbodens mit steigendem Alter bei Frauen zu bestehen [Densmore 1982]. Viele Frauen berichten über Inkontinenz kurz nach vaginaler Entbindung, die aber nur bei einer kleinen Prozentzahl (2-3 %) der Frauen nach über einem Jahr bestehen bleibt [Meyer et al 1993].

Die Verbreitung der Harninkontinenz nach Schwangerschaft und Entbindung wird nach einer Literaturanalyse von Schuessler und Baesslerer [2003] für die Jahre 1983 - 1997 mit 3,7 % - 15,2 % angegeben. Inkontinenz entwickelt sich oftmals Jahre nach der letzten Geburt und meistens nach der Menopause [Tapp et al. 1988; Buzelin 1998]. Das Durchschnittsalter der Frauen mit Belastungsinkontinenz liegt mit 47,3 Jahren niedriger als das der Gesamtheit der Frauen mit Harninkontinenz (50,9 Jahre) [Hunskaar et al. 2004]. Es wird ebenfalls angenommen, dass sekundär zur vaginalen Entbindung Veränderungen am N. pudendus zur Inkontinenz beitragen. Die Harnkontinenz wird durch das Zusammenspiel einer intakten quergestreiften Muskulatur des Beckenbodens, einer ungestörten Innervation der glatten Muskulatur der Harnröhre und einen funktionstüchtigen Bandapparat gewährleistet. Durch das Zusammenwirken dieser anatomischen Strukturen wird die Kontinenz aufrechterhalten [Schumacher 2007].

Als Ursache der **Belastungsinkontinenz** ist die Insuffizienz des äußeren Harnröhrensphinkters (M. sphinkter uretrae externus) anzusehen. Dieser ist unter akuter Belastung als der funktionell entscheidende der Verschlussmuskeln der Harnblase zu sehen. Außer den oben beschriebenen Gründen können auch ein Tonusverlust der glattmuskulären Harnröhrenwandung (z.B. durch Alterung) und eine mit dem Alter abnehmende Muskelzellichte des Rhabdosphinkters Auslöser der Belastungsinkontinenz sein. Die Muskelzellichte im Rhabdosphinkter sinkt durch physiologische Apoptose von 88 % des Gesamtvolumens unmittelbar nach Geburt auf etwa 34 % im 90. Lebensjahr [Strasser et al. 1999].

Generell können mechanische und funktionelle Ursachen als Gründe der Belastungsinkontinenz angesehen werden. Entscheidende Faktoren sind myogene, neurogene, bindegewebige oder hormonelle Veränderungen.

Durch mechanische Ursachen kommt es zu einem defekten Aufhängeapparat von Blasenhalsh, Harnröhre und Vagina. Dieses führt zu einer Situsveränderung durch Hypermobilität der Urethra. Dadurch kommt es zu einer reduzierten passiven Drucktransmission, welche wiederum die Belastungsinkontinenz zur Folge haben kann. McGuire et al. [1976] beschreiben neben der Hypermobilität der Urethra die Mangelfunktion des inneren Harnröhrensphinkters als Ursache der Belastungsinkontinenz.

Bei Männern spielen besonders die postoperativen Veränderungen nach Eingriffen am unteren Harntrakt - in erster Linie die transurethrale Prostataresektion bei gutartiger Prostatavergrößerung (subvesikale Obstruktion) bzw. radikaler Prostatovesikulektomie - eine wesentliche Rolle.

Bei den funktionellen Ursachen wird zwischen hypotoner Harnröhre, Hyporeaktivität der Sphinktermuskulatur und unwillkürlicher Harnröhrenrelaxierung mit ihren spezifischen Ursachen unterschieden [Schumacher 2007].

Die Belastungsinkontinenz wird nach drei Schweregraden gegliedert [Ingelman-Sundberg 1982]:

Grad I: Unwillkürlicher Harnverlust bei heftiger Drucksteigerung im Bauchbereich, z.B. durch Lachen, Niesen, Husten oder schwere körperliche Belastung.

Grad II: Unwillkürlicher Harnverlust bei mittelstarker Drucksteigerung im Bauchbereich, z.B. durch Laufen oder Treppensteigen.

Grad III: Unwillkürlicher Harnverlust bei nur geringer Drucksteigerung im Bauchbereich und auch im Liegen.

Als Ursache der **Dranginkontinenz** liegt eine Überaktivität des Blasenmuskels zu Grunde. Der nicht unterdrückbare Harndrang führt zu plötzlich einsetzendem Urinverlust, bevor die Toilette erreicht wird.

Die Dranginkontinenz kann Folge von Harnwegsinfektionen (Harnröhre, Harnblase), obstruktiven Veränderungen in Folge von z.B. Tumoren oder Steinen, Östrogenmangel im Klimakterium der Frau, Störungen der Innervation oder der Sensorik oder auch häufig psychosomatisch bedingt sein [Abrams 2003].

2.2 Verschlussapparat der Harnblase (Corpus vesicae)

Zum Verschlussapparat des unteren Harntraktes gehört der (im Trigonum vesicae einschichtige) M. detrusor vesicae. Dieser bildet um das Ostium urethrae internum mit elliptischen Zügen einen funktionellen glattmuskulären Sphinkter (M. sphincter urethrae internus). Fasern des M. transversus perinei profundus bilden um die Urethra eine somatisch innervierte Schlinge quergestreifter Muskulatur. Diese dient ebenfalls zum Urethraverschluss des M. sphincter urethrae externus (siehe Abbildung I und II).

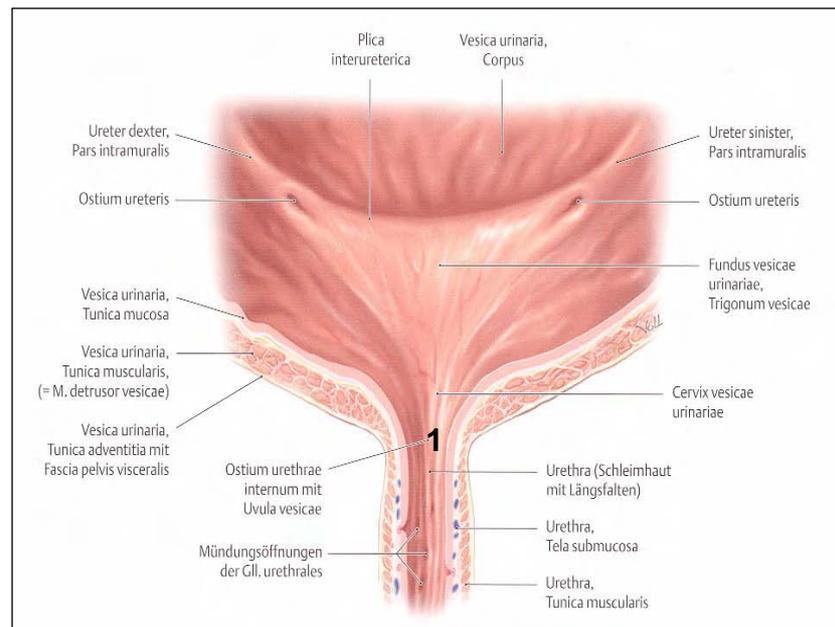


Abb. I: Anatomie der Harnblase und Urethra der Frau,
1) M. sphinkter urethrae internus [Abbildung aus:
Prometheus, Lernatlas der Anatomie 2, 2005].

Die Versorgung der Harnblase erfolgt über die Aa. vesicales superiores, Äste aus der A. umbilicales und aus der A. vesicalis inferior.

Die Entleerung der Harnblase (Miktion) verläuft über spinale und supraspinale Reflexe, die einer willkürlichen Kontrolle unterliegen. Die Miktion wird überwiegend durch den Parasympathikus gesteuert. Die zugehörigen präganglionären Neurone liegen im Sakralmark. Durch ein Nachlassen der Wandspannung regelt der Sympathikus die Füllung, während der Parasympathikus durch die Kontraktion des M. detrusor vesicae die Entleerung steuert. Die übergeordneten Zentren des Sympathikus und Parasympathikus befinden sich im Hirnstamm [Huppelsberg und Walter 2005].

2.2.1 Muskuläre Mechanismen zum Verschluss der Harnblase (Erhalt der Kontinenz)

Bei den muskulären Mechanismen wird der unwillkürliche und der willkürliche Verschlussmechanismus unterschieden. Die Kontinenz des unwillkürlichen Verschlussmechanismus wird über die schlingenförmigen Fasern der Blasenwandmuskulatur (M. detrusor vesicae) erreicht, welche die Urethraöffnung

umfassen. Unterstützend wirken die schlingenförmigen Fasern des M. pubovesicalis. Der willkürliche Verschlussmechanismus besteht aus den absteigenden Fasern des Beckenbodenmuskels (M. transversus perinei profundus). Diese umfassen schlingenförmig die Urethra (M. sphincter urethrae externus). Dieser Verschlussmechanismus kann bei einer strukturellen Beckenbodenschwäche, wie sie nicht selten nach zahlreichen Geburten auftritt, versagen (siehe Abbildung II) [Hodgkinson 1953].

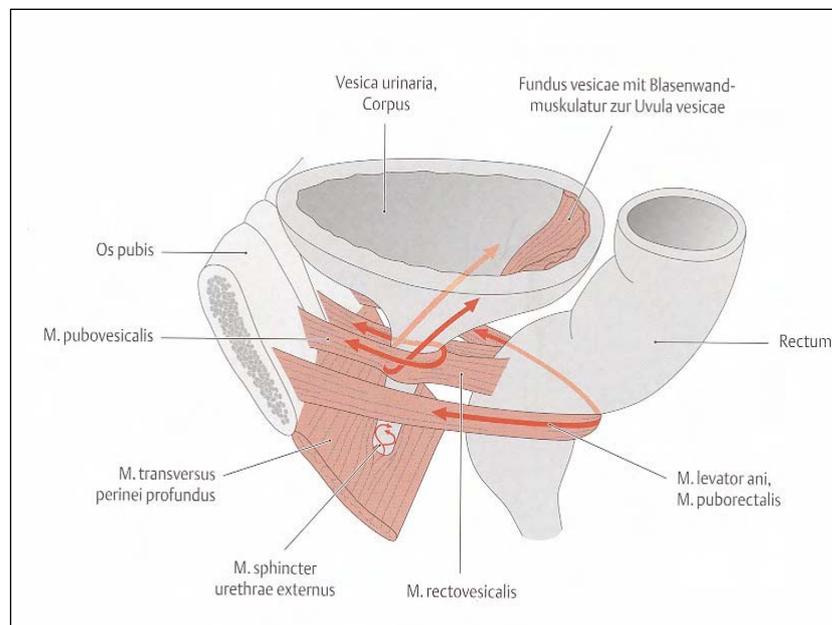


Abb. II: Verschlussmechanismus der menschlichen Harnblase [Abbildung aus: Prometheus, Lernatlas der Anatomie, 2 2005].

2.3 Therapiemöglichkeiten der Belastungsinkontinenz

Bei der Therapie der Belastungsinkontinenz werden konservative und operative Möglichkeiten unterschieden. Bei den konservativen Therapien steht die Krankengymnastik an erster Stelle. Zur Kräftigung des Beckenbodens wird Beckenbodentraining durchgeführt. Dies kann durch Übungen für die willkürliche Kontrolle der Blase (Biofeedbacktraining) ergänzt werden. Bei besonders leichten bis mittleren Schweregraden der Belastungsinkontinenz der Frau wird auch die Elektrotherapie angewendet. Medikamentös kann ein Behandlungsversuch mit Sympathomimetika und Östrogenen erfolgen [Walters et al. 1992].

Sympathikomimetika wie zum Beispiel Midodrin (Gutron®) erhöhen den Muskeltonus im Blasenbereich. Östrogene fördern die Durchblutung der Schleimhäute und verbessern dadurch indirekt die Inkontinenz [Elia und Bergman 1993; Robinson und Cardozo 2003].

Als operative Therapieform wird seit 1972 der Scott-Sphinkter weltweit zur Behandlung der männlichen Inkontinenz eingesetzt [Scott et al. 1973]. Dieser besteht aus einer Manschette, einem Druckreservoir (Ballon) und einer Pumpe. Standardtechnik ist die bulbäre Implantation der Manschette. Pumpe und Druckreservoir werden über einen Schnitt im Unterbauch ins Skrotum bzw. intraperitoneal platziert. Das System ist mit isotoner Kontrastmittel-Lösung gefüllt. Weltweit wurden über 3000 männliche Patienten nach der Methode operiert [Hübner 2004].

Neue Erkenntnisse hierzu werden von Sievert et al. [2007a und 2007b] präsentiert. Sie zeigen mit ihren Untersuchungen, dass die Implantation eines künstlichen Sphinkters eine gute Möglichkeit darstellt, starke Harninkontinenz bei Frauen und Männern zu lindern. Kiilholma et al. [1993] zeigen, dass die Injektion von Bulkingstoffen wie Teflon, bovines Kollagen, Silicon oder Carbonbeads zu einer kurzzeitigen Verbesserung der Belastungsinkontinenz führen. Diese Materialien können zu einer chronischen Entzündung, starker Fremdkörperreaktion, periurethralem Abszess, Beeinträchtigung der Harnblase und der Harnröhre, Verengung des unteren Harntraktes mit Harnverhalt und Wanderung (Migration) zu anderen inneren Organen und dadurch zur Lungenembolie führen. Teflonpaste ist einer der ersten Bulkingstoffe die zur Schleimhautunterspritzung verwendet wird [Politano et al. 1973].

Strasser et al. [2004 und 2007] stellen in einer neuen Therapieform die Injektion von Myoblasten in den Rhabdosphinkter vor. Die Myoblasten werden per Muskelbiopsie aus dem Oberarm entnommen und im Labor vermehrt (siehe hierzu Kapitel 2.4.1.1).

Ein weiterer innovativer Ansatz ist die Verwendung des Nervengiftes Botox zur Heilung der Inkontinenz. Bei der Therapie wird das Botulinumtoxin A (300 IU Botox®) an verschiedene Stellen in den Blasenwandmuskel injiziert. Die Botoxbehandlung ist zur Behandlung der Blasenschwäche noch nicht zugelassen. Es liegen aber Studien vor, in denen die Wirksamkeit und Sicherheit der Behandlung bei nerval bedingten Blasenentleerungsstörungen belegt werden [Wefer et al. 2007].

2.4 Stammzellen und ihre Bedeutung für die Regenerationsmedizin

Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Autoreproduktion aus. Sie sind nicht differenziert, d.h. ihre Nachkommen sind entweder selbst Stammzellen oder weiter differenziert als die Stammzelle, aus der sie hervorgegangen sind [Blanpain et al. 2004].

Der Stammbaum aller Zellen eines Organismus beginnt mit der Zygote. Diese ist totipotent („zu allem fähig“). Keine Stammzelle wurde bis heute als totipotent klassifiziert [Atala 2005]. Aus undifferenzierten Vorläuferzellen, den Progenitorzellen, entstehen während der Embryonalentwicklung spezialisierte Zelltypen.

Die pluripotente („zu vielem fähig“) embryonale Stammzelle aus der inneren Zellmasse der Blastozyste unterscheidet sich von der adulten multipotenten („zu mehreren fähig“) Stammzelle, welche sich als Progenitorzelle in den meisten Gewebearten ausgewachsener Organismen findet [Jiang et al. 2002].

Embryonale Stammzellen leiten sich aus den totipotenten Zellen des frühen Säugetierembryos ab und sind in vitro zu uneingeschränkter, undifferenzierter Proliferation fähig. Aus diesen Zellen kann zwar kein kompletter Organismus mehr gebildet werden, aber sie sind immer noch in der Lage, in sämtliche Zelltypen zu differenzieren und Abkömmlinge der drei embryonalen Keimblätter zu formen [Evans und Kaufman 1981; Martin 1981].

Fetale Stammzellen finden sich lediglich in der fetalen Entwicklungsphase und scheinen mit der Reifung zum Neugeborenen zu verschwinden [Sievert et al. 2007c] (siehe Abbildung III).

Die adulte Stammzelle besitzt im Gegensatz zur embryonalen Stammzelle ein geringeres Differenzierungsvermögen und eine verringerte Proliferationsrate [Jiang et al. 2002]. Die Schwierigkeit, eine embryonale Stammzelle in vitro zu einer Herz-, Nerven-, Epidermis-, oder Knorpelzelle zu differenzieren besteht in der Entschlüsselung der individuellen Bedingungen und Faktoren, die für die Differenzierung einer Stammzelle in einen bestimmten Gewebetyp notwendig sind.

Aufgrund ethischer Überlegungen, wonach das Blastozystenstadium eines menschlichen Embryos bereits als menschliches Individuum angesehen werden kann, ist in Deutschland die Isolierung embryonaler Stammzellen durch das Embryonenschutzgesetz (EschG vom 13.12.1990) verboten.

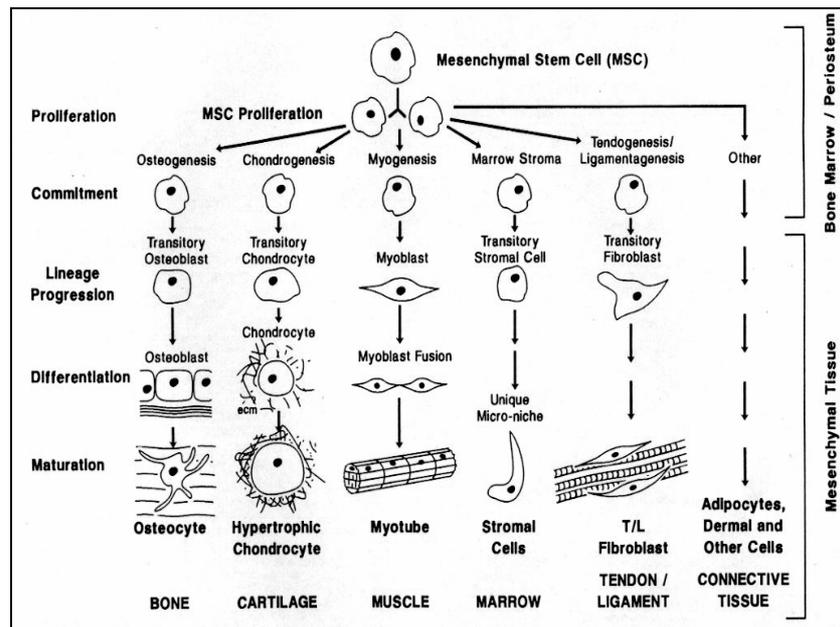


Abb. III: Darstellung der verschiedenen Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen. Die einzelnen Differenzierungsschritte sind vereinfacht wiedergegeben [Abbildung aus: Caplan 1994].

Die Gewinnung und die Forschung mit adulten Stammzellen wird als ethisch unbedenklich angesehen.

Adulte Stammzellen können als hämatopoetische [Weissman 2000], gastrointestinale [Potten 1998], epidermale [Watt 1998], neuronale [Gage 2000], hepatische [Alison und Sarraf 1998] oder mesenchymale [Caplan 1991 und 1994] Stammzellen aus Knochenmark, Trabekularknochen, Periost, Muskelgewebe, Fettgewebe [Park et al. 1999], Gehirn, Gefäßpericyten, Synovia, Milchzähnen, Haut [Muschler et al. 2004; Wiesmann et al. 2004; Berry et al. 2004] und Hodengewebe [Guan 2006] isoliert werden. Die Isolierung von MSZ ist auch aus dem Nabelschnurblut [Bieback et al. 2004] beschrieben.

2.4.1 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

Das Mesenchym ist das multipotente Ursprungsgewebe von Binde- und Stützgewebe, glatter Muskulatur sowie von Skelett- und Herzmuskulatur. Caplan [1991] benennt als MSZ eine einzelne Bindegewebsvorläuferzelle, die sowohl

Bestandteil des embryonalen als auch des adulten Knochenmarkstromas ist und als solche aus beiden isoliert werden kann.

MSZ lassen sich von den hämatopoetischen Stammzellen, die ebenfalls im postnatalen Knochenmark vorkommen, aufgrund ihrer Fähigkeit zur Adhärenz und der fehlenden Oberflächenmarker CD14 (Rezeptor für Lipopolysaccharid-Komplex und Lipopolysaccharid-Bindungsprotein), CD34 (Ligand für L-Selectin) und CD45 (Tyrosinphosphatase, Leukozytenmarker) unterscheiden [Pittenger et al. 1999].

Bis heute liegen nur wenige eindeutige Erkenntnisse über die Charakterisierung und Kultivierungsmethoden der MSZ hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene, Anreicherungsmethoden und Differenzierungsmechanismen vor. Beträchtliche Fortschritte im Rahmen der Oberflächencharakterisierung von MSZ wurden über die Methode des „Fluorescence-activated-cell-sorting“ (FACS) gemacht. Jedoch wurde noch kein einheitlicher Marker identifiziert, der die MSZ darstellen kann [Gronthos et al. 1994; Pittenger et al. 1999; Minguell et al. 2001; Tocci und Forte 2003]. Es bleibt die Aufgabe, einen allgemeinen Marker für MSZ zu finden, da sich MSZ und endotheliale-, epitheliale- und Muskelzellen gemeinsame Merkmale teilen [Minguell et al. 2001].

MSZ können experimentell sowohl in vivo als auch in vitro differenzieren. Cassiede et al. [1996] und Kadiyala et al. [1997] gelingt es, MSZ in Knochen- und Knorpelgewebe zu differenzieren. Pittenger et al. [1999] differenzieren MSZ in Adipozyten. Ebenfalls können MSZ zu Kardiomyozyten [Toma et al. 2002] und Myozyten [Wakitani et al. 1995; Ferrari et al. 1998] differenziert werden.

Diese Erkenntnisse liefern die Grundlagen für einen Einsatz MSZ zur Regeneration mesenchymaler Gewebe.

MSZ werden in serumhaltigen Medien kultiviert. Fünf bis sieben Tage nach Isolierung sind erste Kolonien zu erkennen. Ab Passage fünf tritt in vitro ein Verlust der Differenzierbarkeit ein [Pittenger et al. 1999].

Aufgrund der Morphologie der MSZ werden zwei Zelltypen unterschieden. Beschrieben werden spindelförmige Zellen, die schnell proliferieren und große Kolonien ausbilden und breitflächige Zellen, die sich wesentlich langsamer teilen und nicht konfluent werden. Kolonien, die durch den spindelförmigen Zelltyp gebildet

werden, sind um das zwei- bis dreifache größer als Kolonien des breitflächigen Zelltyps. Mit zunehmender Passagierung nimmt die Menge der spindelförmigen Zellen ab und die der breitflächigen Zellen zu [Digirolamo et al. 1999].

2.4.1.1 Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz mit MSZ

Basierend auf der Tatsache, dass sich MSZ mit geringem Aufwand aus dem Knochenmark isolieren lassen, gibt es für die therapeutische Anwendung autologer MSZ zahlreiche Ansätze.

Chancellor et al. [2000] injizieren in einem Tiermodell Myoblasten in die Blasenwand von Sprague Dawley Ratten um eine Verbesserung der Detrusorkontraktilität zu erreichen und dadurch eine Linderung der Belastungsinkontinenz zu erzielen. Die injizierten Myoblasten sollen dabei einen neuen Harnblasensphinkter aufbauen. Myoblasten sind natürlicherweise in der Lage, sich in vielkernige Muskelfasern zu differenzieren, die zur Kontraktion fähig sind. Yiou et al. [2005] zeigen, dass sich nach der Injektion einer heterogenen Population von Muskelvorläuferzellen in einen durch Elektrokoagulation irreversibel geschädigten urethralen Sphinkter funktionsfähige Myotuben bilden können. Bei der Zelltherapie für urologische Dysfunktionen zeigen Lee et al. [2003] in einem Rattenmodell eine Verbesserung der Belastungsinkontinenz nach Transplantation von aus Muskelgewebe isolierten Stammzellen die bis zu vier Wochen nach Operation andauert. Strasser et al. [2004] berichten über neue Versuche zur Behandlung der Belastungsinkontinenz mittels autologen Myoblasten. Hierbei werden acht weiblichen Schweinen Skelettmuskelbiopsien entnommen und hieraus Myoblasten und Fibroblasten isoliert und vermehrt. Diese werden unter Ultraschallkontrolle in den Rhabdosphinkter bzw. in die Urethra injiziert. Nach guten Ergebnissen im Tierversuch wird dies analog beim Menschen durchgeführt. Dabei werden Muskelbiopsien aus dem Oberarm des Patienten entnommen, daraus autologe Myoblasten und Fibroblasten isoliert, in vitro vermehrt und anschließend in den Rhabdosphinkter bzw. Urethra appliziert [Strasser et al. 2004].

2.5 Tissue Engineering (TE) und Regenerative Medizin

Die **Regenerative Medizin** befasst sich mit der Entwicklung und Anwendung innovativer medizinischer Therapien mit dem Ziel, erkrankte Gewebe zu heilen, teilweise wieder herzustellen oder die Regeneration von kranken und verletzten Organen zu unterstützen [Fuchs et al. 2001].

Da es derzeit keine offiziell gültige Definition der Regenerativen Medizin gibt, wird diese Definition als Synthese der verschiedenen gängigen Begriffe bestimmt, um den Befragungsgegenstand abzugrenzen und die Auswertung zu strukturieren. Zu den Technologien und Materialien, die in der Regenerativen Medizin eingesetzt werden, gehören Stammzellen, differenzierte Zellen, bioaktive Moleküle (wie z.B. Wachstumsfaktoren) und Biomaterialien [Atala 2007]. Diese werden auch oft in Kombination verwendet. Produkte der Regenerativen Medizin, die seit einigen Jahren bereits eingesetzt werden, sind der Hautersatz mit körpereigenen Zellen zur Behandlung von chronischen Wunden [Kuroyanagi 2006] und die Behandlung von Knorpeldefekten mittels autologer Chondrozytenimplantation (Knorpelersatz) [Kramer et al. 2006]. In der Entwicklung befinden sich zudem neue Produkte und Verfahren, die auf dem Einsatz von Stammzellen und Biomaterialien beruhen, aber auch Gentherapieverfahren oder Tumorstimmimpfungen.

Huard et al. [2002] zeigen die Differenzierung von aus Muskelgewebe isolierten Stammzellen in glattmuskuläre Alpha-aktin exprimierende glattmuskuläre Zellen in vivo. Aus Muskelgewebe isolierte Stammzellen tolerieren die Ex-vivo-Bearbeitung gut und werden für die Verbesserung von zahlreichen Geweben innerhalb des Bewegungsapparates (Muskulatur, Knochen, Bänder, Knorpel und Meniskus) eingesetzt. Diese Zellen werden ebenfalls zur Behandlung von Herzfehlern und urologischen Dysfunktionen verwendet (siehe Kapitel 2.4.1.1) [Usas und Huard 2007].

2.5.1 TE

Der Begriff TE wird 1987 von der National Science Foundation in Washington, DC folgendermaßen definiert: „Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken

Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“.

Skalak und Fox [1988] definieren TE als ein fächerübergreifendes Feld der Ingenieurwissenschaften und Biowissenschaften mit dem Ziel der Entwicklung von biologischem Ersatzgewebe, das die Gewebefunktion erneuert, beibehält oder verbessert. Es kann deshalb als wichtiges Teilgebiet der regenerativen Medizin angesehen werden [Atala 2004].

TE ist eine etablierte allerdings noch in weiten Bereichen experimentelle Forschungsrichtung mit dem Potenzial, die chirurgisch-rekonstruktiven Möglichkeiten der Urologie zu erweitern. Diese bestehen aktuell in der Verwendung von körpereigenem Ersatzgewebe wie beispielsweise Magen oder Darmschleimhautanteilen, Mundschleimhaut und freien bzw. gestielten Hauttransplantaten [Stenzl et al. 2001 und 2003; Maurer et. al. 2005].

TE ist eine Methode der Organ- und Geweberekonstruktion, bei der entnommenes Gewebe in die Zellbestandteile aufgeteilt wird und diese Zellen entweder gleich oder nach vorheriger Kultivierung und Vermehrung im Labor wieder in einen Organismus implantiert werden [Atala 2000]. Die implantierten Gewebestandteile können dabei heterolog, homolog oder autolog sein. Für die Zellkultivierung in vitro werden entweder bereits bestehende azelluläre Gewebematerialien (Matrices) oder künstliche Biomaterialien, die resorbierbar bzw. nichtresorbierbar sind, verwendet (siehe Abbildung IV). Weiterhin ist es möglich, bioartifizielle Urothelgewebe zu züchten [Feil et al. 2006 und 2008].

Forschung und Entwicklung im Bereich des TE werden vor allem durch das Warten vieler Patienten auf ein größeres Angebot an transplantierbaren Geweben und Organen vorangetrieben. Die durch TE ermöglichte Transplantationen autologer Zellen bzw. Geweben haben den großen Vorteil, dass im Gegensatz zu allogenen und xenogenen Organtransplantationen immunologische Abstoßungsreaktionen nicht zu erwarten sind.

Derzeit wird in der Klinik für Urologie Tübingen die Latissimus-dorsi-Detrusormyoplastie klinisch erfolgreich zur Therapie akontraktiver Blasen angewandt. Der hierbei verwendete freie Gewebelappen bietet in Kombination mit TE, d.h. Beschichtung mit urothelialen Zellen bzw. bioartifiziellem Urothelgewebe, eine

Grundlage zur Blasenaugmentation und Substitution. [Stenzl et al. 1998 und 2000; Ninkovic et al. 2000].

Durch die neuen Techniken im Bereich des TE wird Ersatz für innere Organe (Leber, Pankreas, Herz, Niere, Lunge), Sinnesorgane (Auge, Ohr, Nase), den Stützapparat (Knochen und Knorpel), für das Gehirn (bei Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) und für die Haut (bei Verbrennungen) entwickelt [Kasper und Stahl 2001].

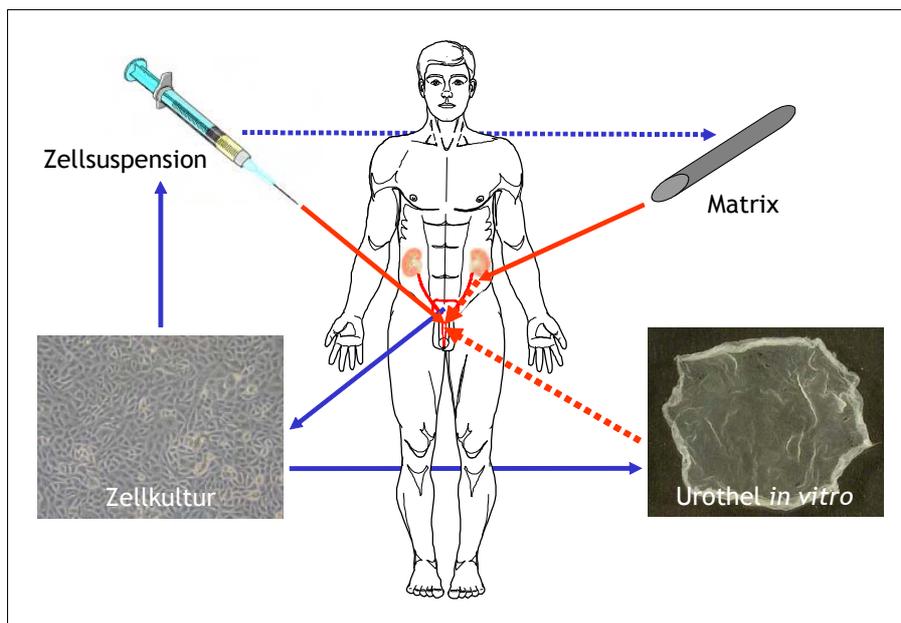


Abb. IV: Methoden des Tissue Engineering am Beispiel der Harnröhrenrekonstruktion.

Durch die Möglichkeit, eigenes Nabelschnurblut zu konservieren, wären bei späteren malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems und nach einer Chemotherapie autologe Zellen verfügbar. Dies böte den Vorteil, dass ein sehr schneller Wiederaufbau des Immunsystems möglich ist. Die erste erfolgreiche Nabelschnurbluttransplantation wird 1988 von Gluckmann et al. [2004] bei einem sechsjährigen Jungen mit Fanconi-Anämie durchgeführt.

Die Behandlungserfolge mit Nabelschnurblut sind den Behandlungserfolgen mit Knochenmarktransplantationen mindestens als vergleichbar anzusehen [Wagner und Verfaillie 2004; Grewall et. al. 2004].

Die schnelle und effiziente Blutversorgung von in vitro hergestellten Geweben oder Organsubstituenten nach deren Transplantation ist immer noch eines der wichtigsten Probleme im TE. Nach der Transplantation ist ein solches Transplantat ausschließlich auf die Diffusion der umgebenden Gewebsflüssigkeit angewiesen, bis Kapillaren aus dem Empfängerbett einsprießen [Reichmann et al. 2005]. Es wird deshalb versucht, Gewebesubstitute bereits in vitro mit Gefäßen zu versorgen oder Faktoren, die die Gefäßeinsprossung unterstützen, einzusetzen.

2.6 Inkontinenzproblematik in der Tiermedizin

Grundsätzlich wird zwischen morphologischen und funktionellen Ursachen der Harninkontinenz im Bereich des unteren Harntraktes unterschieden, wobei meistens die Harnröhre betroffen ist und seltener die Harnblase. Wegen des Mangels an klaren äußerlichen Stressfaktoren bei Hunden wird in der Tiermedizin anstelle der Belastungsinkontinenz von der urethralen Sphinkterinkompetenz gesprochen [Janssens 1997]. Harninkontinenz ist ein häufiges klinisches Problem bei Hunden, von dem Hündinnen mehr als Rüden betroffen sind [Holt 1985 und 1990c]. Als Ursachen der Harninkontinenz bei adulten Hündinnen werden Sphinkterinkompetenz insbesondere nach Kastration, Urolithiasis, Neoplasie des Blasenhalbes und der Harnröhre, neurologische Schädigung des Plexus pelvici und die Detrusorinstabilität bzw. ein Kapazitätsdefizit angesehen.

Das Vorkommen der Inkontinenz bei nichtkastrierten Hündinnen liegt bei 0,2 - 0,3 % [Kyles et al. 1996]. Für kastrierte Hündinnen schwanken die Angaben zwischen 11 % [Okkens et al. 1997] über 17,7 % [Thrusfield 1985] bis 20 % [Arnold 1997b]. Die urethrale Sphinkterinkompetenz ist der Hauptgrund für die Harninkontinenz bei Hündinnen. Schätzungsweise sind hiervon 20 % aller kastrierten Hündinnen betroffen und 30 % der kastrierten Hündinnen über 20 kg Körpergewicht [Arnold et al. 1989a].

In einer Untersuchung von Janssens und Janssens [1991] wird nach durchgeführter Ovariohysterektomie und Ovarioektomie kein Unterschied in der Häufigkeit, in der die Hunde inkontinent werden, festgestellt. Dies wird in weiteren Untersuchungen bestätigt [Ruckstuhl 1976; Arnold et al. 1989a]. Es ist nicht sicher, ob das Kastrationsalter eine Rolle spielt, dass ein Hund inkontinent wird. Es wird

angenommen, dass die Kastration vor der ersten Läufigkeit das Risiko erhöht [Ruckstuhl 1978]. Nach Stöcklin-Gautschi et al. [2001] werden 9,7 % der Hündinnen, die vor der ersten Läufigkeit kastriert wurden, inkontinent. Das ist ungefähr die Hälfte dessen, was bei einer Kastration nach der ersten Läufigkeit zu erwarten ist. Die klinischen Symptome der Inkontinenz sind allerdings bei einer Kastration vor der ersten Läufigkeit stärker ausgeprägt.

Als eine Ursache wird angenommen, dass hormonale Faktoren für das häufige Auftreten der Sphinkterinkompetenz nach der Kastration verantwortlich sind. Allerdings ist noch nicht geklärt, weshalb nur bestimmte Hunde erkranken. Betroffen sind sowohl männliche als auch weibliche Hunde insbesondere die Rassen Boxer, Dobermann, Rottweiler, Weimaraner oder Irish Setter und selten sogar Katzen in jedem Alter auch ohne vorhergehende Kastration [Holt und Thrusfield 1993]. Die genaueren Ursachen der Sphinkterinkompetenz konnten bisher noch nicht geklärt werden. Risikofaktoren für das Entstehen der Sphinkterinkompetenz der erwachsenen Hündinnen sind wie erwähnt die Kastration aber auch eine Schwanzamputation [Holt und Thrusfield 1993] und eine kaudale Position der Harnblase („pelvic bladder“). Durch die Schwanzamputation kommt es zu einer Hypotrophie der Beckenbodenmuskulatur (M. levator ani und M. coccygeus) und infolge zu einer Inkontinenz [Janssens 1997]. In einer Untersuchung von Power et al. [1998] bei 37 inkontinenten Hunden im Vergleich zu 28 gesunden Hunden wird festgestellt, dass die inkontinenten Hunde mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0.005$ einen intrapelvin-liegenden Blasenhalshaben.

Für das multifaktorielle Geschehen der Sphinkterinkompetenz werden nach Hoelzler und Lidbetter [2004] ein verminderter Harnröhrendruck, eine verminderte Harnröhrenlänge, ein möglicher Östrogenmangel, die intrapelvin liegende Blase, ein defekter vesicourethraler Support oder eine Abnormalität der glattmuskulären Harnröhrenmuskulatur verantwortlich gemacht.

Eine seltene Sonderform der Sphinkterinkompetenz tritt bei juvenilen Hündinnen, besonders bei Neufundländern und Golden Retrievern, auf. Interessanterweise bessert sich die Symptomatik deutlich um den Zeitpunkt der ersten Läufigkeit [Holt 1990b].

Bei Hunden, die im Alter zwischen zwei und sechs Monaten an Inkontinenz leiden, kann ein sogenannter ektopischer Harnleiter die Ursache sein. Hierbei münden die

beiden Uretheren direkt in den Blasenhalss, die Urethra oder sogar in die Vagina [Wiegand und Nickel 1996].

Tumoren im und um den unteren Harntrakt können ebenfalls durch Reizung der Harnblase und verminderter Blasenkapazität zu einer Inkontinenzsymptomatik führen. Besonders bei älteren Hunden ist die neoplastische Ursache einer Harninkontinenz nicht zu unterschätzen [Nickel et al. 1997]. Bei einer Untersuchung von Holt [1990b] sind ein Drittel der Hunde mit Blasentumoren inkontinent.

2.6.1 Therapie

Viele Hündinnen mit urethraler Spinkterinkompetenz können mit Östrogenen (Östriol) oder Sympathomimetika (Ephedrin, Phenylpropanolamin) erfolgreich therapiert werden [Blendinger et al. 1995]. Der Wirkungsmechanismus dieser Präparate führt zu einem besseren Verschluss der Harnröhre. Dieser ist auf die alpha-adrenerge Stimulation der glatten Muskelzellen zurückzuführen. Ungefähr ein Drittel bis zu drei Viertel der inkontinenten Hunde reagiert sehr gut auf die Therapie mit Phenylpropanolamin [Arnold et al. 1989a].

Für die chirurgische Behandlung der Inkontinenz bei Hündinnen stehen verschiedene Operationstechniken zur Verfügung. Die Kolposuspension beispielsweise ist ein abdominales Operationsverfahren zur Behandlung der Belastungsinkontinenz, bei dem über eine kranioventrale Elevation der Scheide indirekt eine Rückverlagerung der funktionell wichtigen Blasenhalssregion in den Abdominalraum erreicht wird. Langzeituntersuchungen ergeben, dass die Kolposuspensionstechnik bei vielen Patienten gute Ergebnisse zeigt. Mehr als 56 % der Hündinnen sind nach dieser Operation komplett kontinent und das Ausmaß und die Frequenz der Inkontinenz werden bei weiteren 40 % signifikant verringert [Holt 1985 und 1990a]. Außerdem werden Harnröhrenplastiken [Bushby und Hankes 1980; Dean et al. 1989], das Einsetzen einer Blasenhalsschlinge [Christie 1986] und die periurethrale Injektion von Teflon oder Kollagen [Arnold et al. 1989b] durchgeführt.

Bei der endoskopischen Injektion von Teflon in die Submukosa der Urethrawand sind alle Hunde mindestens zwei Monate kontinent, allerdings rezidivieren nach zwei Monaten 64 % der Hunde [Arnold et al. 1989b]. Mit einer Kollageninjektion behandelte Hunde sind nach einer noch nicht veröffentlichten Untersuchung von

Nickel et al., die im Rahmen des vierten Gießener Wintersymposiums 2007 vorgestellt wird, zu 60 % für die Dauer von ca. 1,5 Jahren kontinent.

Eine von White [2001] durchgeführte Untersuchung an 100 Hunden mit urethraler Sphinkterinkompetenz, die mit einer Urethropexie operiert werden, zeigt sich ein Jahr nach Operation bei 73 % eine deutliche Verbesserung der Inkontinenzsymptomatik. Holt [2005] berichtet über die Prostatopexie bei Rüden als Behandlungsmethode einer Inkontinenz. Er operiert insgesamt neun Hunde, von denen einer komplett kontinent wird. Bei jeweils vier Tieren ergibt sich eine Verbesserung bzw. bringt die Operation keinen Unterschied zur Ausgangslage.

Eine weitere chirurgische Möglichkeit zur Behandlung der Inkontinenz der Hündin ist die transpelvikale Schlingentechnik. Nach Nickel et al. [1998] sind bei einer Untersuchung von 26 Hündinnen 13 nach einer Operation mit der transpelvikalen Schlingentechnik kontinent. Bei sechs dieser 13 Hunde wird zusätzlich noch die Kolposuspensionstechnik durchgeführt. Bei sieben Hündinnen (davon drei mit Kolposuspensionstechnik) verbessert sich die Inkontinenz deutlich.

Abschließend sollte noch auf eine Untersuchung von Arbeiter [1986] hingewiesen werden, der von guten Ergebnissen bei Anwendung der Akupunktur und Neuraltherapie berichtete, wobei sich insbesondere die Infiltrationstherapie im Bereich der Cervix uteri als erfolgreich erwiesen haben soll. Von zwölf derart behandelten Tieren wurden auf Grund dieser Therapie acht Tiere geheilt, wobei bei zwei der Tiere ein Rezidiv auftritt.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Der experimentelle Ansatz dieser Arbeit zielt auf die Möglichkeit der kausalen Behandlung der Belastungsinkontinenz mittels Einbringung mesenchymaler Stammzellen (MSZ) bzw. hieraus differenzierter Muskelzellen in den Kontinenzapparat ab. Im Einzelnen wird die Differenzierung muriner und humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark in Muskelzellen in vitro sowie die Integration und das Überleben von in den Blasen Hals injizierten MSZ bzw. hieraus differenzierten Muskelzellen in einem syngenem und xenogenem Kleintiermodell untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die Versuche werden männliche und weibliche Ratten von der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet.

3.1.1 Syngenes Tiermodell

Das syngene Tiermodell wird mit Ratten vom Lewis Stamm durchgeführt (siehe Abbildung V). Lewis Ratten wurden 1950 aus Wistar-Ratten gezüchtet und eignen sich sehr gut für Applikations- und Transplantationsforschungen [Lewis et al. 1955]. Das Gewicht der Tiere liegt zum Zeitpunkt der Injektion der Stammzellen zwischen 140 und 180 Gramm Körpergewicht (KGW). Insgesamt werden 14 Tiere operiert.

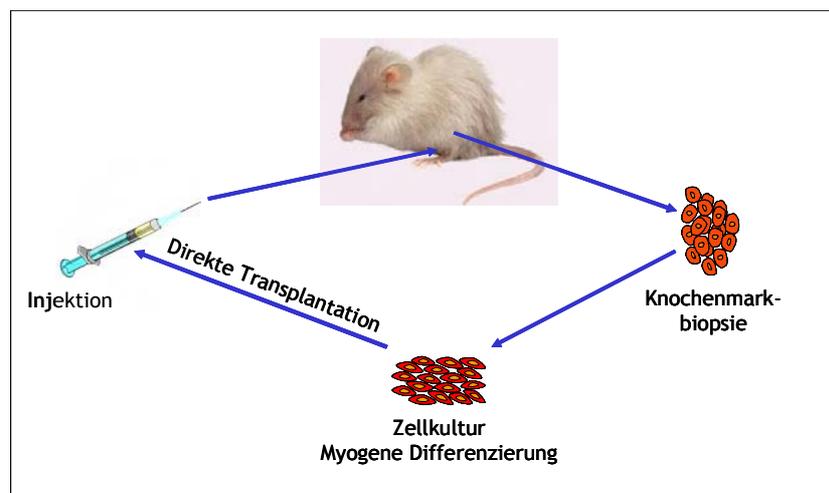


Abbildung V: Schema des syngenens Tiermodells.

3.1.2 Xenogenes Tiermodell

Für das xenogene Tiermodell werden Nacktratten vom Typ Crl:NIH-Foxn1^{nu} verwendet (siehe Abbildung VI). Diese thymuslosen Tiere haben verringerte Zellpopulationen in den thymusabhängigen Gebieten der peripheren Lymphorgane. Alle Tiere haben zum Operationszeitpunkt ein KGW von ca. 90 bis 120 Gramm und waren vier bis sechs Wochen alt. Insgesamt werden 25 Tiere operiert.

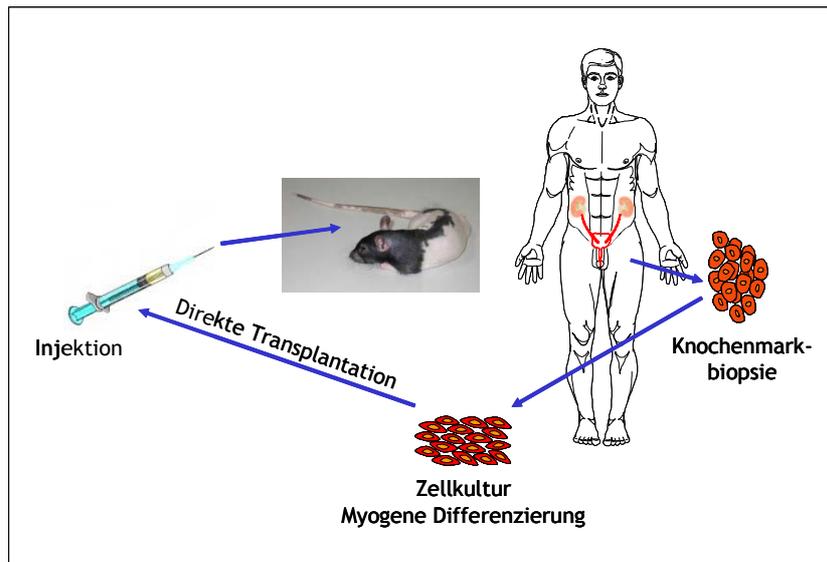


Abbildung VI: Schema des xenogenen Tiermodells.

3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen (MSZ)

3.2.1 Gewinnung der murinen MSZ (mMSZ)

Zur Gewinnung der mMSZ werden im syngenem Tiermodell männliche Lewis-Ratten verwendet. Die Tiere sind sechs Wochen alt.

Die Tiere werden mittels letaler Narcoren[®] (Pentobarbital; Merial, Hallbergmoos) Dosis von 500 mg pro kg KGW getötet.

Zur Gewinnung der Stammzellen werden die Hintergliedmaßen vom Körper abgetrennt und Femur und Tibia von Muskulatur und Bindegewebe mittels Schere und Skalpell entfernt. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Knochen in Transportmedium aus Hank's buffered salt solution mit 0,35 g/l NaHCO₃⁻, Phenolrot ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom, Berlin), 10 mM HEPES (Gibco, Karlsruhe), 20 KIU/ml Aprotinin (Trasylol 500.000, Bayer, Leverkusen) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) bei 4 °C aufbewahrt.

Die beiden Enden des Knochens werden mittels Skalpell abgetrennt und der Knochen eröffnet. Der Knochen wird zweimal mit ca. 5 ml Zellkulturmedium (s. u.) über einer Petrischale ausgespült. Die Knochenmarksuspension wird anschließend mit einer zuvor mit bovinem Serumalbumin (BSA) gespülten Pipette in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Danach wird die Zellsuspension zweimal mit BSA-gespülter Pipette resuspendiert.

Die Zellsuspension wird über ein 70 µm Nylon-Zellfilter (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gegeben und mit 20 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco) gespült und sieben Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in 2 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgt nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer.

Zur Kultivierung der Zellen wird die Zellsuspension mit 13 ml Medium in eine T75 Zellkulturflasche (Becton Dickinson GmbH) pipettiert und im Brutschrank bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Als Zellkulturmedium wird α -MEM (Minimum Essential Medium) ohne Ribonucleoside und Deoxyribonucleoside (Gibco) verwendet. Das Medium wird mit 20 % fetalem Kälberserum, 2 % Pyruvat 100 mM, 1 % Glutamin 200 mM und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert.

3.2.2 Gewinnung der humanen MSZ (hMSZ)

Die Entnahme hMSZ aus dem Knochenmark erfolgt in der Medizinischen Klinik II und ist für Forschungszwecke von der zuständigen Ethik-Kommission genehmigt (Projekt Nr. 20/2000, 268/2003, 269/2003). Um die Knochenmarkfragmente aus dem Knochenmark-Entnahmesystem auszuwaschen, werden ca. 2 ml Heparin in das Entnahmesystem gegeben. Um die Zellen zu lösen, müssen die Filtersysteme gut durchmischt werden. Anschließend werden 50 ml PBS (Bio-Mérieux, Nürtingen) in das Entnahmesystem gegeben, damit sich die Knochenmarkfragmente vom Filter lösen. Das PBS-Knochenmarkgemisch wird nun durch ein steriles 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen gepresst. Das so gewonnene Filtrat wird zur weiteren Isolierung der hMSZ verwendet.

3.2.2.1 Isolierung von hMSZ

25 ml des gewonnenen Filtrates werden in zwei 50 ml-Röhrchen überführt, die mit 15 ml Ficoll (Biochrom AG) gefüllt sind. Als nächster Schritt werden die beiden Röhrchen 20 Minuten mit 700 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die MSZ werden in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert und mit 50 ml PBS aufgefüllt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 x g wird der Überstand

abgekippt und mit 8 ml PBS aufgefüllt. Diese Probe wird langsam zu 4 ml BSA in ein 15 ml-Röhrchen pipettiert.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (acht Minuten, 300 x g) wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit Kulturmedium gemischt.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Inkubation von Zellen

Die wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben isolierten Zellen werden bei Inkubation in einer 75 cm² Zellkulturflasche in 20 ml Medium und bei Inkubation in einer 25 cm² Zellkulturflasche in 10 ml Medium aufgenommen. Die in die Zellkulturflasche verbrachten MSZ werden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bis erreichen konfluenten Wachstums inkubiert. Medienwechsel erfolgt erstmals nach sieben Tagen, danach alle zwei bis drei Tage. Das Passagieren der Zellen wird wie nachstehend beschrieben durchgeführt.

3.2.3.2 Passagieren von Zellen

Wenn die Zellkultur konfluiert, wird das Medium vollständig abgesaugt. Um das restliche Serum aus dem Medium zu entfernen, wird die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS (Gibco) gespült. Für das Ablösen der Zellen werden 2 ml Trypsin/EDTA (Gibco) in die Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C fünf Minuten inkubiert. Der Ablösevorgang wird mit 10 ml Medium und 10 % fetalen Kälberserum (Gibco) gestoppt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert. Zum Entfernen der noch anhaftenden Zellen wird die Flasche nochmals mit 10 ml PBS gespült. Die Zellen werden dann sechs Minuten bei 300 x g pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes können die Zellen passagiert werden.

3.2.3.3 Induktion einer myogenen Differenzierung

Um eine myogene Differenzierung zu induzieren, werden die mittels Plastikadhärenz isolierten und anschließend passagierten Zellen in Kulturpassage eins für 24

Stunden mit 10 μM 5-Azacytidin (5-Aza) (Vidaza™, Lipomed, Bad Säckingen) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.4 Immuncytochemie kultivierter mesenchymaler Stammzellen

Für den Nachweis einer myogenen Differenzierung werden immuncytologische Analysen nativer und gegenüber 5-Aza exponierten Stammzellen verschiedener Kulturpassagen durchgeführt. Es werden monoklonale Antikörper gegen glattmuskuläre und skelettmuskuläre Antigene verwendet (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Hierfür werden die enzymatisch abgelösten Stammzellen (siehe Abschnitt 3.2.3.2) mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden auf achtkammrigen Permanox Objektträgern (Lab Tek, NUNC, Roskilde, Dänemark) jeweils 5×10^4 Zellen pro Kammer ausgesät und im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ zwei Tage kultiviert. Bei konfluentem Zellwachstum wird das Medium abgesaugt, dann einmal mit PBS gewaschen und die Zellen zehn Minuten mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Objektträger fünf Minuten mit 0,15 mM PBS pH 7,2 (Bio Mérieux) gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran werden die Objektträger für zehn Minuten einer Saponinbehandlung (0,1 %) unterzogen und danach dreimal je zwei Minuten mit PBS gewaschen.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper wird mit Antibody-Diluent (DakoCytomation GmbH, Hamburg) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die primären Antikörper werden mit Antibody-Diluent entsprechend verdünnt (siehe Abschnitt 3.2.4.1), auf die Präparate aufgetragen und diese für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wiederholt mit PBS gewaschen.

Bei den murinen Zellpräparaten wird die Bindung der primären Antikörper mit dem LSAB2-System (DakoCytomation GmbH), das auf der Streptavidin-Biotin Methode beruht, nachgewiesen. Als Substrat-Chromogenlösung wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und als Enzym Meerrettichperoxidase eingesetzt. Bei Expression des nachzuweisenden Antigens zeigt sich ein brauner Farbniederschlag.

Bei den humanen Zellpräparaten wird die Bindung der primären Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2- konjugierten Esel-F(ab)₂-Anti-Maus-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg) detektiert. Die Inkubationszeit beträgt 45 Minuten. Dann werden

die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt bei den tierischen Zellpräparaten mit Hämatoxylin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Die Präparate werden über Nacht luftgetrocknet und anschließend mit VectaMount (Vector Laboratories Inc.) eingedeckt.

In den humanen Zellpräparaten erfolgt die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid), das im Eindeckmedium Immuno-Select-Antifading-Mounting-Medium (Dianova GmbH) enthalten ist.

Für eine Bewertung unspezifischer Reaktionen werden Parallelpräparate ohne Verwendung des Primärantikörpers immunologisch gefärbt. Anstatt des Primärantikörpers wird Antibody-Diluent (DakoCytomation GmbH) verwendet.

3.2.4.1 Antikörper

für den Nachweis muskelspezifischer Antigene werden folgende Antikörper eingesetzt:

Primärantikörper

- Gegen glattmuskuläres alpha-Aktin gerichteter monoklonaler Antikörper aus der Maus, Klon 1A4 (Sigma, Taufkirchen) in der Verdünnung 1:2000.
- Gegen glattmuskuläres alpha/gamma-Aktin gerichteter monoklonaler Antikörper aus der Maus, Klon CGA7 (MAB 1522, Chemicon, Hofheim) in der Verdünnung 1:250.
- Gegen den für Skelettmuskelzellen spezifischen Transkriptionsfaktor MyoD gerichteter monoklonaler Antikörper aus der Maus, Klon MoAb5.8A (Becton Dickinson GmbH) in der Verdünnung 1:100.
- Gegen skelettmuskuläres langsames Myosin gerichteter monoklonaler Antikörper aus der Maus, Klon NOQ 7.5.4D (MAB 1628, Chemicon, Hofheim) in der Verdünnung 1:1000.

Sekundärantikörper

- Cy2-markierter Esel-F(ab)₂-Antikörper gegen Maus IgG (H+L) (Dianova GmbH, Hamburg) in der Verdünnung 1:50.

3.2.4.2 Auswertung

Die Quantifizierung der Zellen, die mit den verwendeten Antikörpern positiv reagieren, wird mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.

Das Mikroskop ist mit den spezifischen Fluoreszenzfiltern F41-027 für das rote Spektrum, F41-028 für das grüne Spektrum und F31-000 für DAPI (AHF Analysetechnik, Tübingen), einer hochauflösenden Mikroskopie-Farbkamera (AxioCam HRc, Zeiss, Oberkochen) und zwei Monitoren ausgestattet. Verwendet wird die Objektive „A-Plan“ 5x/0,12 Ph0, „A-Plan“ 10x/0,25 Ph1, LD „Achromat“ 20x/0,40 Korr, LD „Plan-Neofluar“ 40x/0,6 Korr Ph2 (Zeiss) mit den Vergrößerungen fünf-, 10-, 20- und 40-fach.

Die Anzahl von positiven Zellen bezüglich der verwendeten Antikörper in der Immunocytochemie werden mittels Auszählung der positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Zellen in 10 Gesichtsfeldern bei 20-facher Vergrößerung am Monitor bestimmt. Pro Passage werden zwei bis sechs Kammerobjektträger ausgewertet.

Bei der Immunocytochemie der hMSZ wird auch die Leuchtintensität qualitativ beurteilt. Die Skala reichte von dreifach plus für eine sehr gute Expression (starkes Leuchten des fluoreszierenden Sekundärantikörpers), bis hin zu einfach minus für keine Expression (kein Leuchten des Sekundärantikörpers). Die Untersuchung und Einteilung wird von einer Person vorgenommen.

3.2.5 Markierung der Zellen mit PKH 26

PKH 26 ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion transplantierte Zellen in Gewebeschnitten [Horan et al. 1989 und 1990; Haas et al. 2000]. Der Farbstoff bindet an den Lipidanteilen der Zellmembran.

Die Markierung der Zellen erfolgt mit dem PKH 26 Cell-Linker-Kit (Sigma). Hierfür werden die Zellen aus der Zellkulturflasche abgelöst (vgl. Abschnitt 3.2.3.2) und fünf Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 300 µl Diluent-C-Kit-PKH 26 resuspendiert, mit einer Mischung aus 300 µl Diluent-C-Kit-Lösung mit 15 µl PKH 26 Linker gemischt und für acht Minuten inkubiert. Anschließend werden die

Zellen mit 10 ml Medium und 20 % fetalem Kälberserum gewaschen, fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt, um die Reste des Markierungsreagenz zu entfernen.

3.3 Tier-OP

3.3.1 Versuchsablauf

Für die Injektion der MSZ werden die Zellen in verschiedene Stadien passagiert. Im syngenem Tierversuch, in dem allogene mMSZ verwendet werden, werden die Zellen in den Passagen zwei, drei und vier injiziert. Im xenogenem Tiermodell werden hMSZ in den Passagen eins bis sechs verwendet. In beiden Versuchen werden unterschiedliche Versuchszeiträume gewählt. In den folgenden Tabellen (1 und 2) werden für beide Versuchsabläufe die Zeitdauer, Zellpassage und die Differenzierung mit 5-Aza beschrieben. Für eine vergleichende Untersuchung werden nicht gegenüber 5-Aza exponierte Zellen injiziert.

3.3.1.1 Syngenes Tiermodell

Folgende Tabelle zeigt den Versuchsplan für das syngene Tiermodell.

Versuchstag Tiere / Gruppe	2	58	65	135	156	163
1) Undifferenzierte Zellen P2	-	-	-	2	-	-
2) Differenzierte Zellen P2	-	-	-	2	-	-
3) Undifferenzierte Zellen P3	-	-	1	-	1	-
4) Differenzierte Zellen P3	-	-	-	-	-	2
5) Undifferenzierte Zellen P4	-	1	-	-	-	-
6) Differenzierte Zellen P4	3	1	-	-	-	-
7) Scheineingriff	-	-	-	-	-	1

Tabelle 1: Versuchsplan syngenes Tiermodell.

3.3.1.2 Xenogenes Tiermodell

Folgende Tabelle zeigt den Versuchsplan für das xenogene Tiermodell.

Versuchstag Tiere / Gruppe	4	8	12	28	56
1) Undifferenzierte Zellen P1	3	2	2	2	2
2) Differenzierte Zellen P2	-	-	-	-	2
3) Differenzierte Zellen P3	-	-	-	-	3
4) Differenzierte Zellen P4	-	-	-	-	3
5) Differenzierte Zellen P5	-	-	-	-	3
6) Differenzierte Zellen P6	-	-	-	-	1
7) Scheineingriff	-	-	-	-	2

Tabelle 2: Versuchsplan xenogenes Tiermodell.

3.3.1.3 Zellapplikation

Es wird die für Nager empfohlene Menge von 4 mg pro kg KGW Xylazin[®] 2 % (Virbac, Bad Oldesloe) und 100 mg pro kg KGW Ketamin[®] 10 % (Albrecht, Aulendorf) für die Narkotisierung intraabdominal appliziert.

Zur Operation wird die Ratte auf den Rücken positioniert und mit einem ca. 2 cm langen Schnitt die Bauchhöhle eröffnet. Die intraperitoneal liegende Harnblase wird aufgesucht und vorgelagert.

Unter leichtem Zug der Blase nach cranial wird der Blasen Hals freigelegt und gegebenenfalls umliegendes Fettgewebe entfernt. Die Einspritzung der Zellen in die perisphinktäre Region erfolgt unter Sicht. Zur Einspritzung der Zellen wird die Insulinkanüle Omnicam 20 (Braun, Melsungen) mit einem maximalen Fassungsvermögen von 0,5 ml und eine Kanüle mit der Länge 8 mm und dem Durchmesser 0,30 mm verwendet (siehe Abbildung VII). Es werden jeweils ca. eine Million Zellen in 50 µl als Depot injiziert.

Anschließend wird das Peritoneum mittels Einzelheften verschlossen. Die Unterhaut wird mittels fortlaufender Reverdinnahrt vernäht. Die Hautnaht erfolgt durch eine invertierte Naht mit versenkten Knoten. Verwendet wird das Nahtmaterial Vicryl 5,0, V797 (Ethicon GmbH, Norderstedt). Diese Nahttechnik hat sich bewährt, da die Tiere

nach der Operation sofort wieder in den Käfig gelegt werden und die Gefahr, dass sich die Tiere die Fäden selbständig oder gegenseitig entfernen, durch die einstülpende Nahttechnik verhindert wird.

Die Eingriffsdauer beträgt jeweils ca. 30 Minuten.

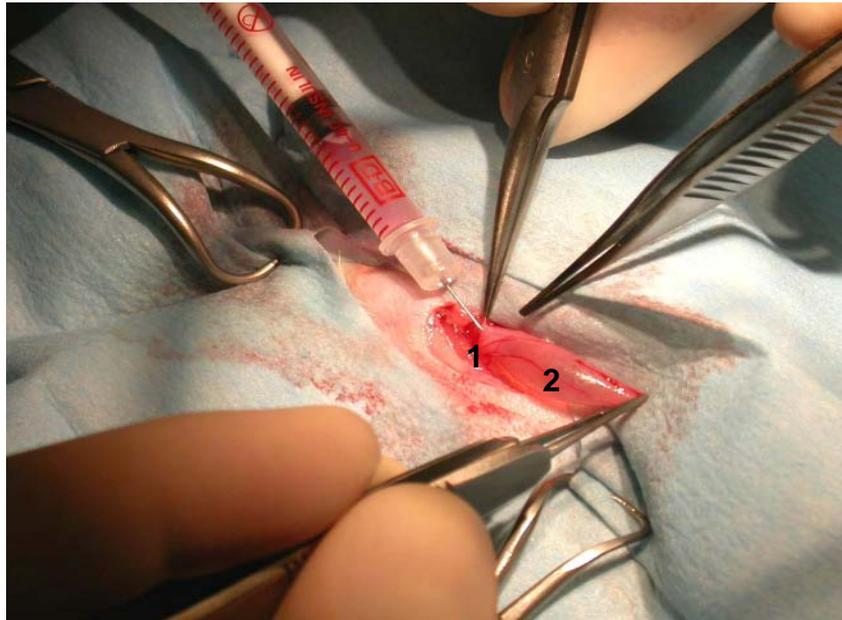


Abbildung VII: Injektion der MSZ in den Sphinkter, 1) Blasenhalshals; 2) Harnblase.

3.3.1.4 Entnahme der Rattenblasen

Die Ratten werden entsprechend der in Tabelle 1 und 2 angegebenen Versuchsdauer mittels letaler Narcoren[®] (Pentobarbital; Merial) Dosis von 500 mg pro kg KGW getötet.

Die Bauchhöhle wird eröffnet und die Harnblase exponiert. Die Symphyse des Tieres wird zur besseren Entnahmemöglichkeit der Harnblase und Harnröhre geteilt. Die Harnröhre wird möglichst weit caudal, bei gleichzeitiger Mitresektion der vorderen Vagina, abgesetzt. Harnröhre mit vorderer Vaginalwand und Harnblase werden komplett entfernt (siehe Abbildung VIII).

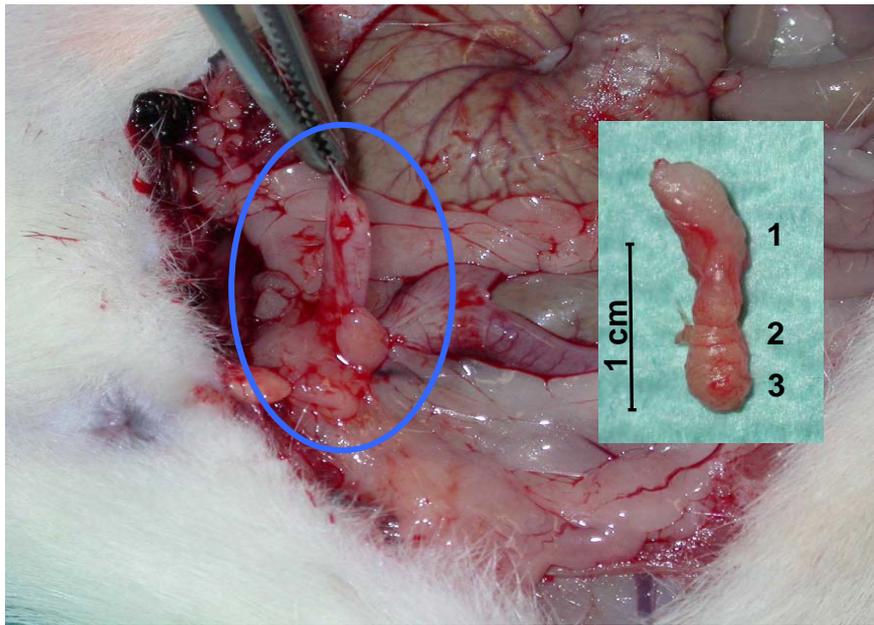


Abbildung VIII: Entnahme der Rattenblase, Op-Situs und Organpräparat,

1) Harnblase; 2) Sphinkter; 3) Urethra.

3.4 Aufarbeitung der Rattenblasen

3.4.1 Fixierung und Gewebeschnitte der Rattenblasen

Die entnommenen Rattenblasen werden nach Eröffnung des Harnblasendoms über Nacht in 18 % Saccharoselösung kryoprotectiert und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die tiefgefrorenen Präparate werden bis zur Aufarbeitung bei minus 25 °C gelagert und zur weiteren Bearbeitung in Tissue-Freezing-Medium (Leica Microsystems GmbH, Nussloch) eingebettet. Von jeder entnommenen Rattenblase mit anhängender Harnröhre werden ca. 100 bis 150 Kryogewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Die Aufarbeitung des Präparates erfolgt von caudal nach cranial. Jeder siebte Gewebeschnitt wird mit Hämatoxylin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) für eine Minute inkubiert, anschließend ca. zwei Minuten unter fließendem Wasser gebläut und mit Vectamount (Vector Laboratories Inc.) eingedeckt. Die restlichen Präparate werden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung bei minus 25 °C zwischengelagert.

3.4.1.1 Histologischer Nachweis transplantierte Zellen

Zunächst wird der histologische Nachweis des Anwachsens und der Integration der applizierten Zellen geführt.

Das Überleben der transplantierten, mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH 26 markierten Zellen, und deren Integration in das Zielgewebe werden histologisch untersucht. Das Vorhandensein der Zellen mit den entsprechenden Fluoreszenzsignalen in einem Präparat wird mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen) und dem spezifischen Fluoreszenzfilter F41-027 (AHF Analysentechnik, Tübingen) evaluiert. Das Ergebnis wurde mit der hochauflösenden Farbkamera AxioCam HRc (Zeiss) dokumentiert.

3.4.2 Immunhistologie

Immunhistochemische Analysen auf Marker glatt- und skelettmuskulärer Zellen werden an Gefrierschnitten mit einer Dicke von 5 µm durchgeführt. Verwendet werden die in Abschnitt 3.2.4.1 erwähnten monoklonalen Antikörper. Bei allen immunhistochemischen Färbungen werden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit bzw. ohne Primärantikörper angefertigt. Alle Präparate werden vor und nach den jeweiligen Inkubationsschritten wie in Abschnitt 3.2.4 für die Immunocytochemie beschrieben zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper werden mit Antibody-Diluent (DakoCytomation GmbH) wie beschrieben (siehe Abschnitt 3.2.4.1) verdünnt. Pro Objektträger werden 100 µl des Primärantikörpers aufgetragen. Alle Inkubationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

Als erstes werden die Gewebeschnitte auf einer Wärmeplatte bei 42 °C für 30 Minuten fixiert, um eine bessere Anhaftung der Schnitte durch Glättung zu erreichen. Die Primärantikörper werden für 45 Minuten und der Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln, um die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers nicht zu schwächen. Für die Demaskierung des skelettmuskulären Myosins werden die Präparate zunächst für drei mal drei Minuten in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle bei 600 Watt vorbehandelt. Der Citratpuffer wird frisch aus Zitronensäure und Natriumcitrat angesetzt (Merck KGaA, Darmstadt). Die Objektträger werden bei Raumtemperatur über Nacht im

Dunkeln getrocknet. Abschließend wird mit Immuno-Select-Antifading-Mounting Medium (Dianova GmbH) eingedeckt.

Die Zellkerne werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der im Eindeckmedium enthalten war, gefärbt. Die mikroskopische Dokumentation erfolgt wie im Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Syngenes Tiermodell

4.1.1 Kulturerfolg

Nach Aussaat in eine T25 Zellkulturflasche sind die mMSZ aus den Knochenmarkbiopsien der Ratte nach ca. drei Stunden adhärent. Die Stammzellen zeigen nach zwei Wochen Konfluenz und werden dann passagiert. Aus einer T25 Zellkulturflasche werden ca. zwei Millionen Zellen geerntet.

4.1.2 Myogene Differenzierung in vitro

4.1.2.1 Gegenüber 5-Azazytidin (5-Aza) exponierte MSZ

Die im syngenem Tiermodell mit 5-Aza behandelten mMSZ werden zum Nachweis myogener Differenzierung mit spezifischen Antikörpern immunocytochemisch untersucht. Die In-vitro-Auszählung für den glattmuskulären Anti-alpha-Aktin-Antikörper Klon 1A4 ergibt 50 bis 90 % positive Zellen (siehe Abbildung IX). Der Anti-alpha/gamma-Aktin-Antikörper Klon CGA7 erbringt ein Ergebnis von 20 % positiven Zellen (siehe Abbildung X).

Die skelettmuskulären Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor MyoD und langsames Myosin zeigen bei deutlich weniger Zellen eine positive Reaktion. Der Transkriptionsfaktor MyoD kann mit dem Anti-MyoD-Antikörper Klon MoAb5.8A nur in einzelnen Zellen (< 1 %) nachgewiesen werden (siehe Abbildung XI). Der Antikörper Klon NOQ 7.5.4D, der die schwere Kette des skelettmuskulären langsamen Myosin nachweist, ist stets negativ (siehe Abbildung XII).

Abbildungen IX bis XII: Myogene Differenzierung von mMSZ in vitro nach Exposition gegenüber 5-Aza. Immuncytochemischer Nachweis der glattmuskulären Antigene alpha-Aktin und alpha/gamma-Aktin (siehe Abbildungen IX und X) sowie der skelettmuskulären Antigene MyoD und langsames Myosin (siehe Abbildungen XI und XII).

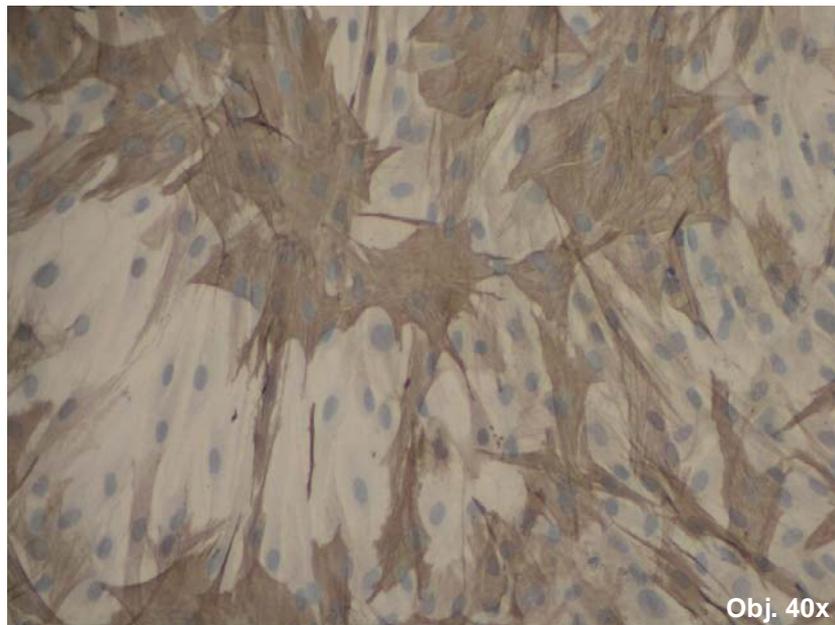


Abb. IX: Immuncytochemie bei mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4.

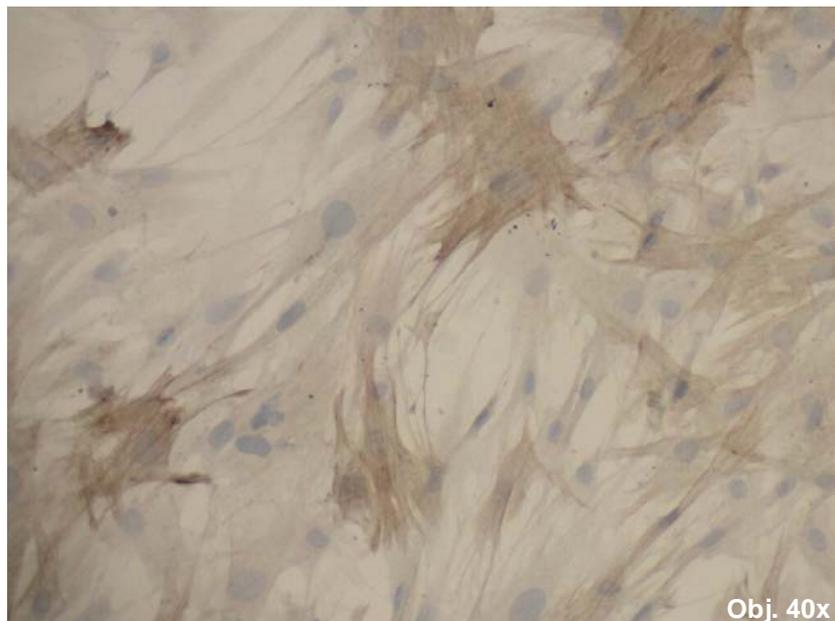


Abb. X: Immuncytochemie bei mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7.

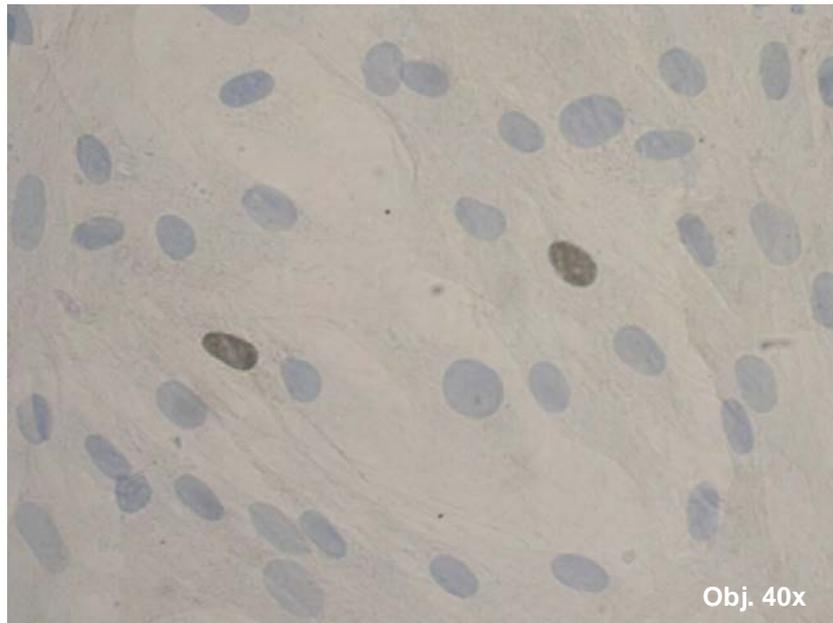


Abb. XI: Immuncytochemie bei mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD Klon MoAb5.8A.

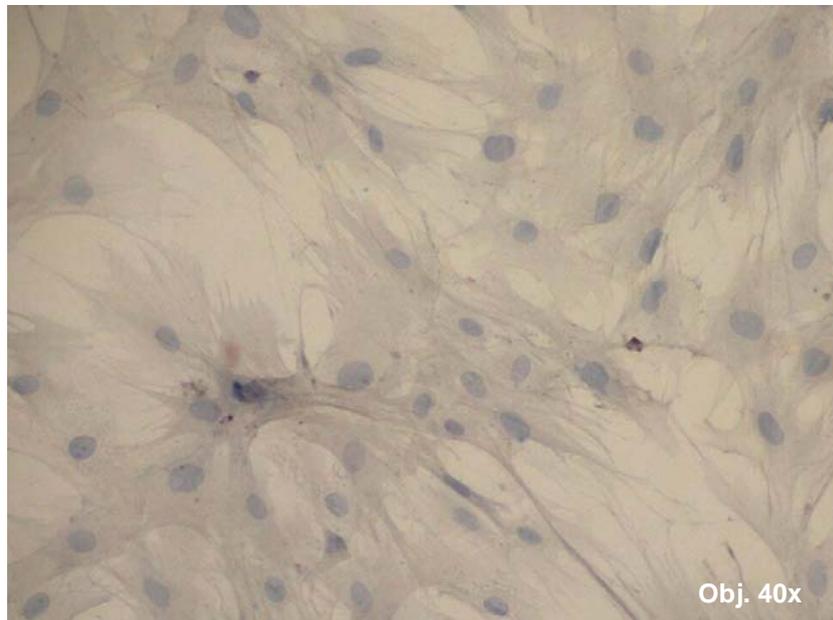


Abb. XII: Immuncytochemie bei mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-Myosin Klon NOQ 7.5.4D.

4.1.2.2 Nicht gegenüber 5-Aza exponierte Zellen – Kontrollen

Um die Wirksamkeit von 5-Aza bezüglich der myogenen Differenzierung von MSZ zu zeigen, werden immuncytochemische Untersuchungen auch an nicht mit 5-Aza behandelten Zellen durchgeführt. Hierbei reagiert der glattmuskuläre Antikörper Anti-alpha-Aktin Klon 1A4 in 50-90 % der Zellen positiv (siehe Abbildung XIII). Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7 ist in 20 % der Zellen positiv (siehe Abbildung XIV). Die beiden skelettmuskulären Marker MyoD und langsames Myosin sind nicht nachweisbar (siehe Abbildung XV und XVI).

Abbildungen XIII bis XVI: Myogene Differenzierung von mMSZ in vitro ohne Exposition gegenüber 5-Aza. Immuncytochemischer Nachweis der glattmuskulären Antigene alpha-Aktin und alpha/gamma-Aktin (siehe Abbildungen XIII und XIV) sowie der skelettmuskulären Antigene MyoD und langsames Myosin (siehe Abbildungen XV und XVI).

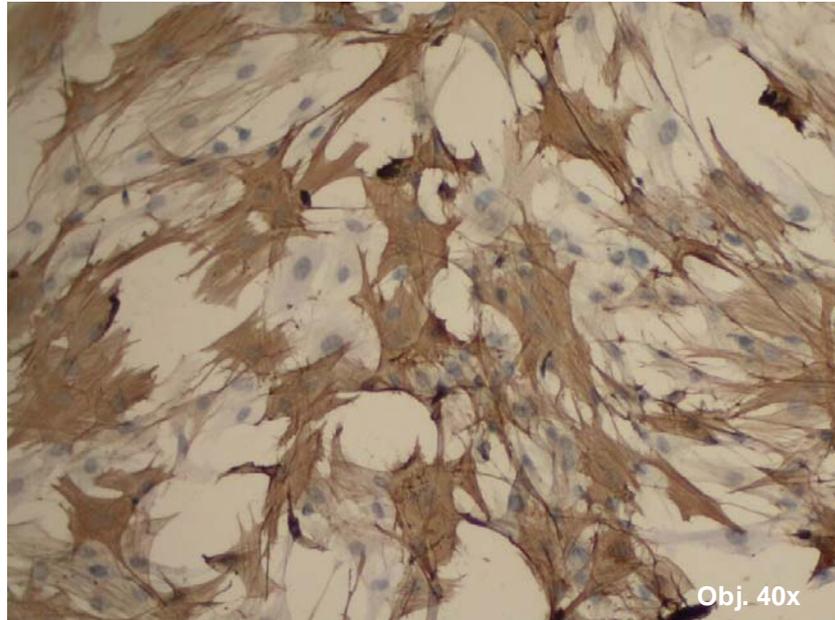


Abb. XIII: Immuncytochemie bei mMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4.

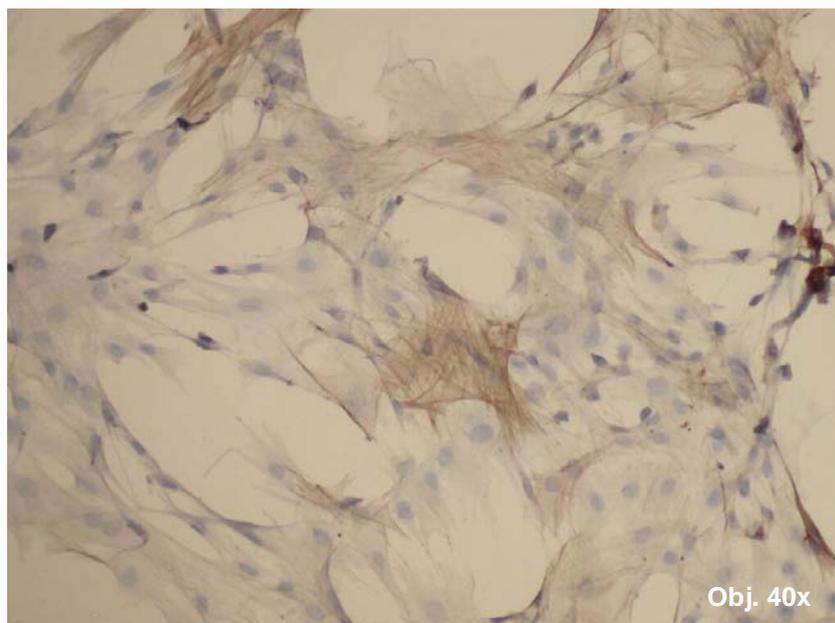


Abb. XIV: Immuncytochemie bei mMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7.

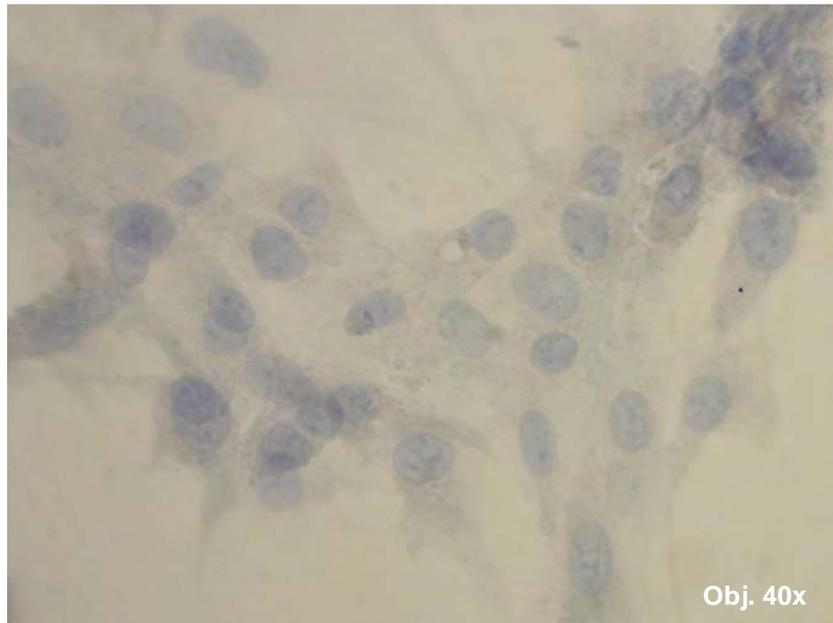


Abb. XV: Immuncytochemie bei mMSZ, nicht gegen-über 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD Klon MoAb5.8A.

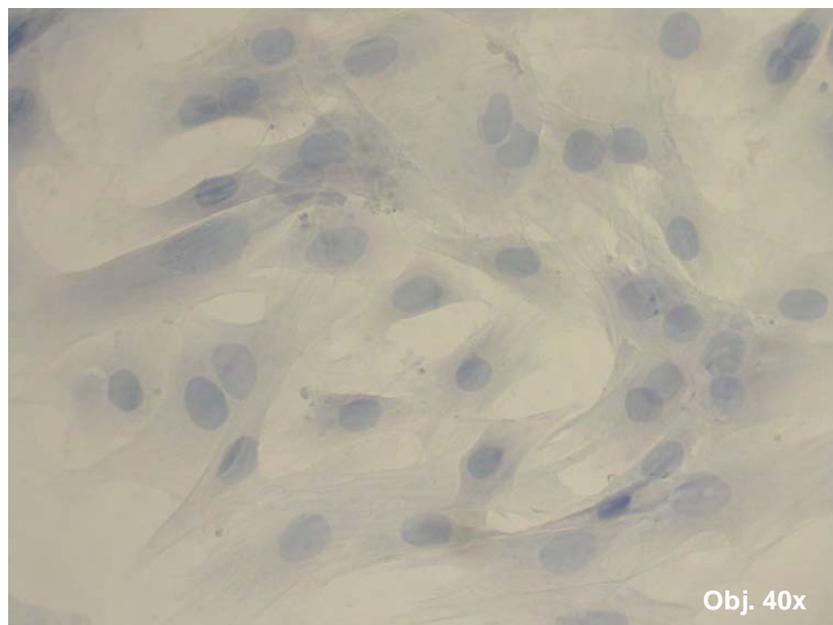


Abb. XVI: Immuncytochemie bei mMSZ, nicht gegen-über 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-Myosin Klon NOQ 7.5.4D.

4.1.3 Nachweis transplanteder Zellen in den histologischen Schnitten

Mit dem rot fluoreszierenden Zellmarker PKH 26 markierte Zellen können bis zu 163 Tage nach Transplantation in den Blasengeweben nachgewiesen werden. Ab einer Versuchsdauer von 58 Tagen wird bei zwei von 14 Tieren auch eine Verteilung der injizierten Zellen im Blasengewebe beobachtet (siehe Abbildung XVII bis Abbildung IX).

Bei zwei von insgesamt 14 Tieren werden in der histologischen Aufarbeitung der Rattenblasen keine Zellen gefunden und bei einem Tier nur eine sehr schwache Fluoreszenz (siehe Tabelle 3).

Abbildungen XVII bis XIX: Blasengewebe mit den verteilten Zellen (siehe Abbildung XVII), Blasengewebe mit injiziertem Zellcluster (siehe Abbildung XVIII) und Ausschnitt PKH 26 markierter Zellen (siehe Abbildung XIX).

L: Lumen; M: Muskulatur; U: Urothel

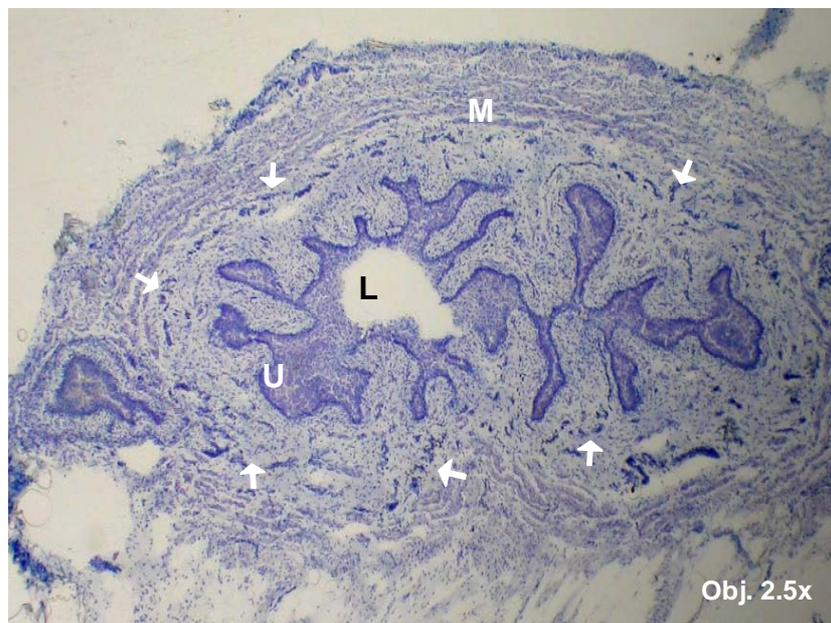


Abb. XVII: Integration und Verteilung von Zellen im Blasengewebe. Die Pfeile deuten auf die verteilten Zellen 58 Tage nach Injektion, Hämatoxylinfärbung, Ratte 16, Präparat 8.

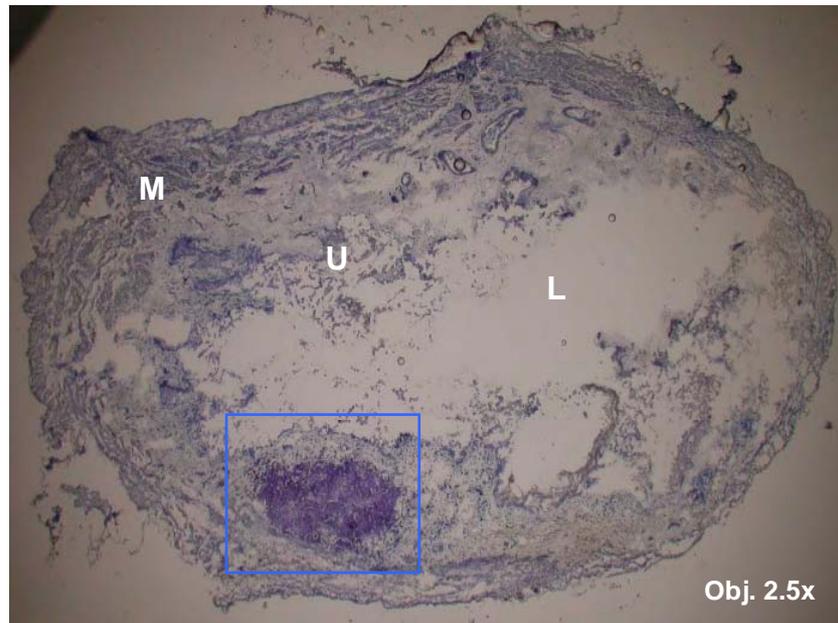


Abb. XVIII: Integration und Verteilung von Zellen im Blasengewebe, 2 Tage nach Injektion von PKH 26 markierten Zellen (Detail siehe Abbildung XIX), Hämatoxylinfärbung, Ratte 10, Präparat 111, Übersicht.



Abb. XIX: Integration von Zellen im Blasengewebe, 2 Tage nach Injektion von PKH 26 markierten Zellen (rot), Ratte 10, Präparat 111, Detail.

Versuchsdauer in Tagen	Passage	Zellnachweis		
		Positiv	Schwach positiv	Negativ
2	4	3/3 D		
58	4	2/2 D/K		
65	3	1/1 K		
135	2	3/4 D/K, K		1/4 D
156	1		1/1	
163	3	2/3 D/K		1/3 D

Tabelle 3: Nachweis von in den Blasenboden applizierten Zellen in vivo in Abhängigkeit der Versuchsdauer, der Passage und des Differenzierungsstadiums;
D= Gegenüber 5-Aza exponiert, K= Kontrolle

4.1.4 Nachweis myogen differenzierter Zellen in den histologischen Schnitten

Um eine mögliche In-vivo-Differenzierung der Stammzellen nachzuweisen, werden die Gewebeschnitte mit den PKH 26-markierten Zellen immunhistologisch auf die Expression der o. g. Muskelmarker untersucht. Dabei ist ein Verlust der Intensität des Farbstoffes PKH 26 durch die verschiedenen Färbe- bzw. Waschschrte aufgefallen. Der Nachweis von PKH 26-positiven Zellen nach der Immunhistochemie gelingt nur in Gewebeschnitten, die schon vor der immunhistochemischen Behandlung eine starke PKH 26-Fluoreszenz zeigen. Mit den glattmuskulären Antikörpern (Klon 1A4 und CGA7) sind die Muskelbereiche der Blase sehr gut darstellbar (siehe Abbildung XX bis Abbildung XXIII). In den Gewebeschnitten von drei Ratten liegt zu der roten Fluoreszenz PKH 26-markierter Zellen auch grüne Fluoreszenz für die Antikörper vor. Dies belegt zumindest den glattmuskulären Phänotyp der injizierten Zellen.

Abbildungen XX bis XXIII: Immunhistologischer Nachweis glattmuskulärer Antigene mit spezifischen Antikörpern und mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper. Rotfluoreszenz: PKH 26-positive Zellen, Grünfluoreszenz: spezifisches Muskelantigen, Gelborange fluoreszenz: Muskelantigen exprimierende PKH 26 positive Zellen. L: Lumen; M: Muskulatur; U: Urothel

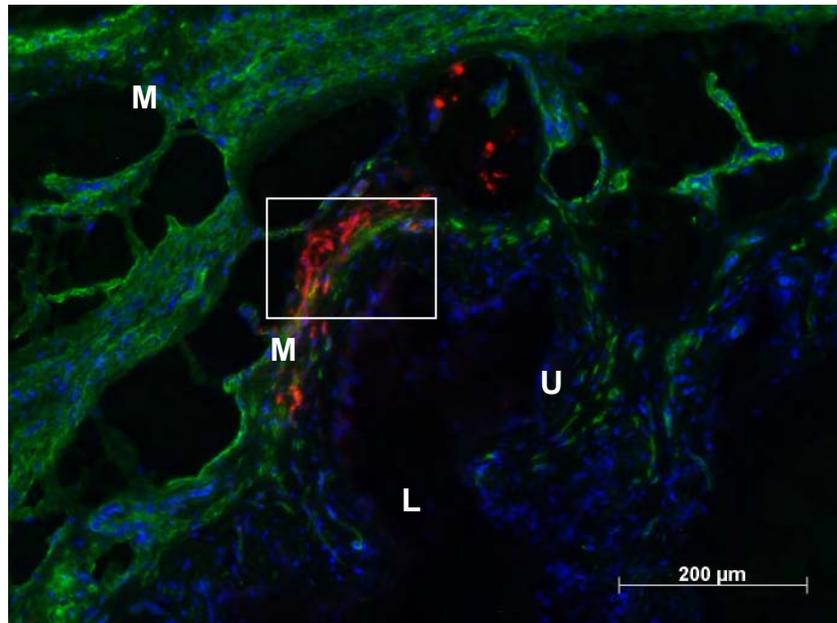


Abb. XX: Blasengewebe mit PKH 26-markierten injizierten mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (163 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4; Ratte 09, Präparat 67, Übersicht, Detail siehe Abbildung XXI.

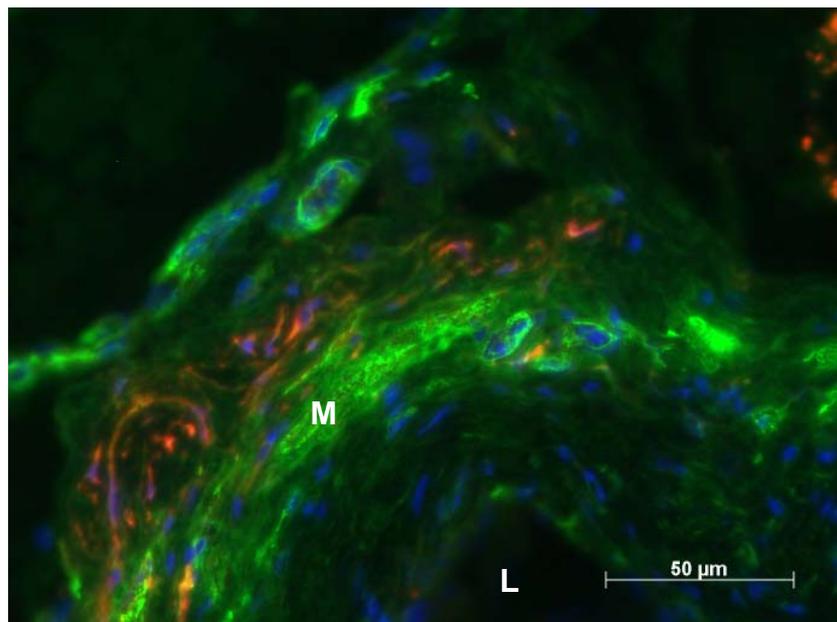


Abb. XXI: Blasengewebe mit PKH 26-markierten injizierten mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (163 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4; Ratte 09, Präparat 67, Detail.

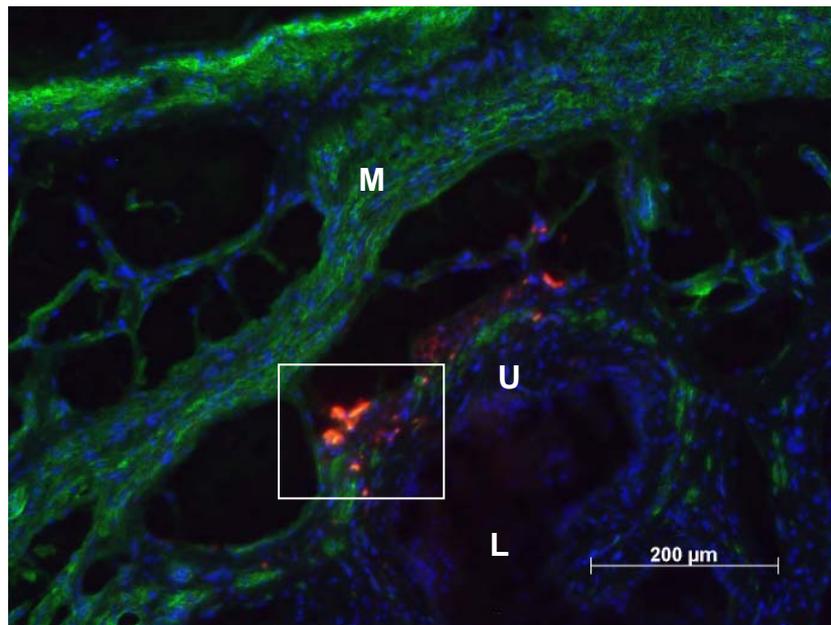


Abb. XXII: Blasengewebe mit PKH 26-markierten injizierten mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (163 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7; Ratte 09, Präparat 69, Übersicht, Detail siehe Abbildung XXIII.

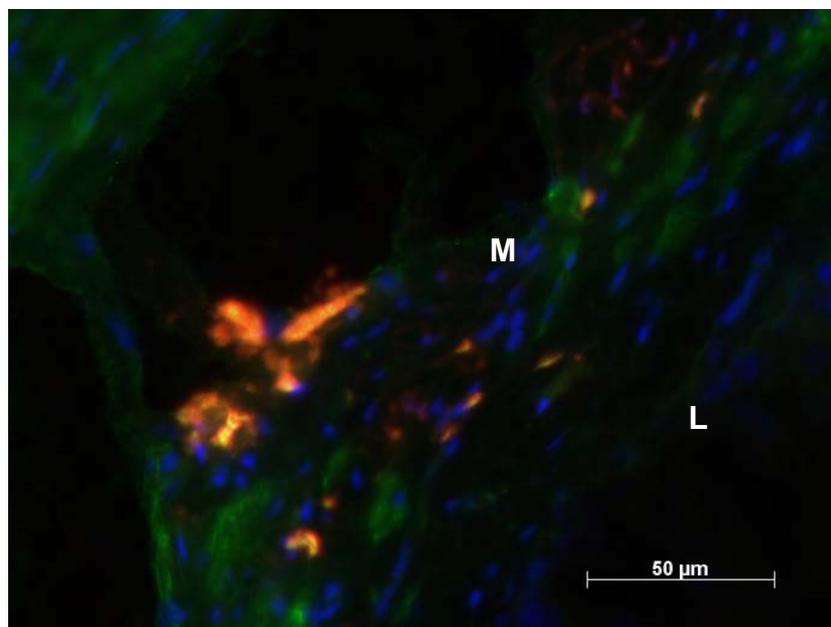


Abb. XXIII: Blasengewebe mit PKH 26-markierten injizierten mMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (163 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7; Ratte 09, Präparat 69, Detail.

4.2 Xenogenes Tiermodell

4.2.1 Kulturerfolg

Die hMSZ aus den Knochenmarkbiopsien sind nach ca. drei Stunden adhärent. Nach Aussaat in eine T25 Zellkulturflasche zeigen die Stammzellen nach ca. drei Wochen Konfluenz und werden dann passagiert (siehe Abbildung XXIV). Die weiteren Passagierungen erfolgen im Abstand von zwei Wochen. Aus einer T25 Zellkulturflasche wurden ca. zwei Millionen MSZ geerntet.

Ab Passage vier wird eine Abnahme der Zellteilung beobachtet. Dies führt zu einer deutlichen Zunahme des Zeitintervalls auf vier Wochen zwischen den Passagen vier und fünf bzw. fünf und sechs.

Eine Veränderung der Zellmorphologie wird ab Passage vier ebenfalls beobachtet. In den niedrigeren Passagen eins bis drei sind die Zellen spindelförmig-länglich. Mit zunehmender Passagezahl ändert sich dieses Bild hin zu kugelförmigen Zellen (siehe Abbildung XXV). Die Konfluenz wird bei den höheren Passagen nicht mehr mit steigenden Zellzahlen, sondern vielmehr mit einer Größenzunahme der einzelnen Zellen erreicht.

Es kann kein Unterschied in der Morphologie und der Wachstumsgeschwindigkeit bei Zellen, die gegenüber 5-Aza exponiert sind, im Vergleich zu nicht exponierten Zellen beobachtet werden.

Abbildungen XXIV und XXV: Vergleich der Morphologie von MSZ in Kulturpassage null (oben) und sechs (unten).

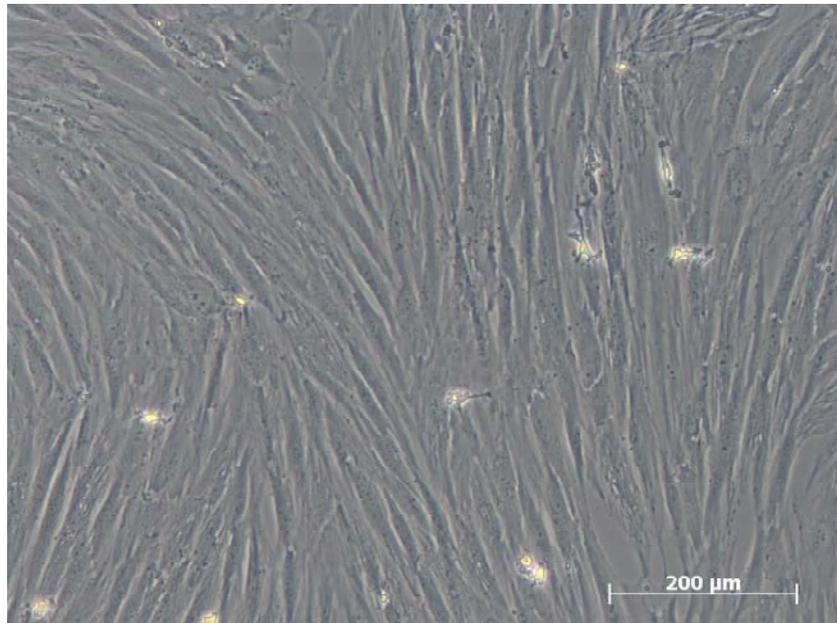


Abb. XXIV: Primärkultur von hMSZ, Zellmorphologie spindelförmig.

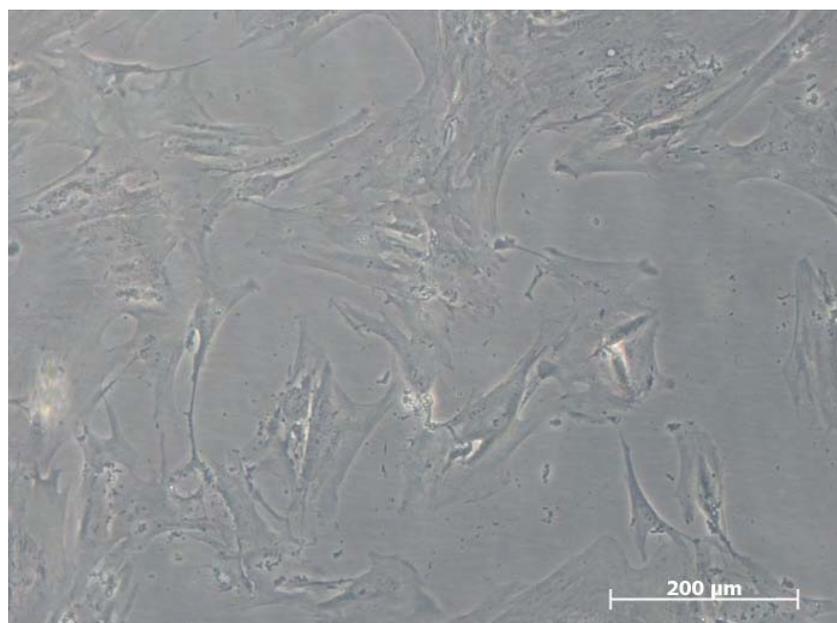


Abb. XXV: hMSZ in Passage sechs, Zellmorphologie eckig bis kugelförmig.

4.2.2 Myogene Differenzierung in vitro

4.2.2.1 Gegenüber 5-Aza exponierte MSZ

Es werden bei der Immunocytochemie sowohl die undifferenzierten als auch die mit 5-Aza in Passage eins differenzierten Zellen untersucht.

Bei den mit 5-Aza behandelten Zellen liegt die Reaktivität mit dem glattmuskulären Anti-alpha-Aktin Antikörper Klon 1A4 zwischen 86 % in Passage drei und 96,7 % in den Passagen vier und fünf (siehe Abbildung XXVI). Die Expression des Anti-alpha/gamma-Aktin-Antikörpers Klon CGA7 liegt zwischen 81,3 % in Passage fünf und 99,6 % in Passage zwei (siehe Abbildung XXVII). Für den skelettmuskulären Transkriptionsfaktor MyoD Klon MoAb5.8A liegt der niedrigste positive Wert mit 63,4 % in Passage fünf und der höchste Wert mit 100 % in Passage vier (siehe Abbildungen XXVIII und XXIX). Der skelettmuskuläre gegen langsames Myosin gerichtete Antikörper Klon NOQ 7.5.4D ist in allen Passagen negativ (siehe Abbildung XXX).

Der Verlauf der Expression der untersuchten muskulären Marker mit zunehmender Passage ist in der Abbildung XXXI dargestellt.

Die Intensität der Antigenexpression wird für den jeweiligen Marker quantitativ mit einer Skala von negativ bis dreifach positiv bewertet. Der glattmuskuläre Antikörper Klon 1A4 reagiert in allen Passagen dreifach positiv. Der Klon CGA7 ist zwischen ein- bis zweifach positiv. Bei den skelettmuskulären Antikörpern reagiert der Klon MoAb5.8A einfach positiv und der Klon NOQ 7.5.4D stets negativ.

Abbildungen XXVI bis XXX: Gegenüber 5-Aza exponierte Zellen in Passage 2 mit dem jeweiligen Primärantikörper und mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper. Grün: positiver Antigennachweis, blau: Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

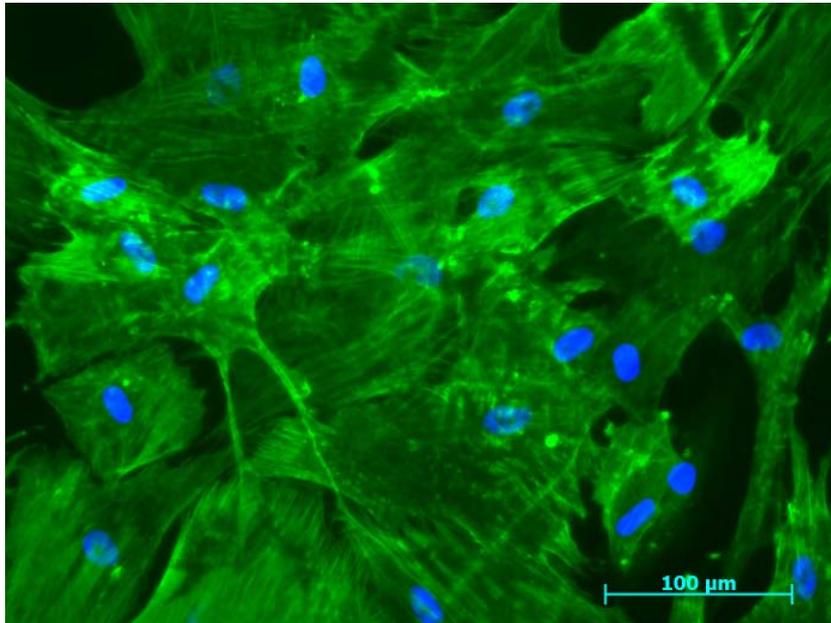


Abb. XXVI: Immuncytochemie bei hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4.

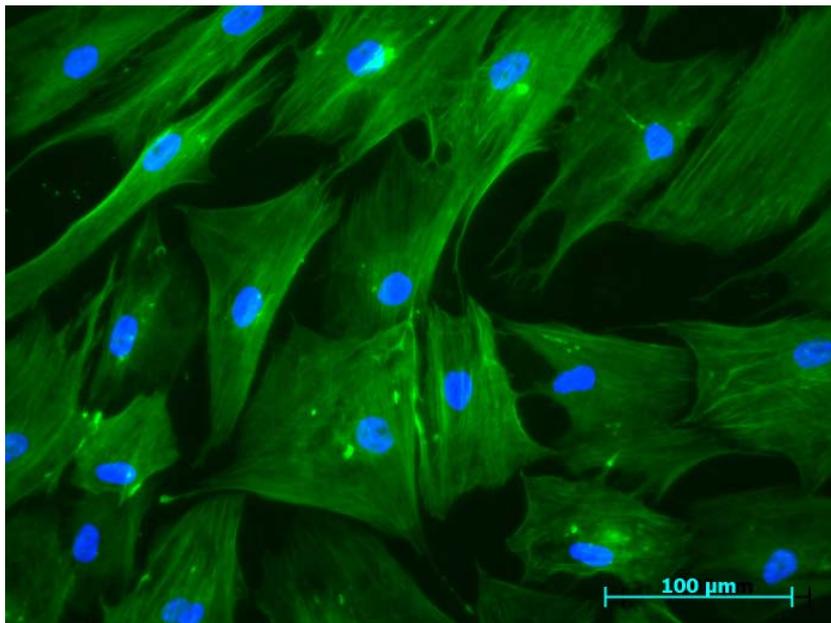


Abb. XXVII: Immuncytochemie bei hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha/gamma Aktin; Klon CGA7.

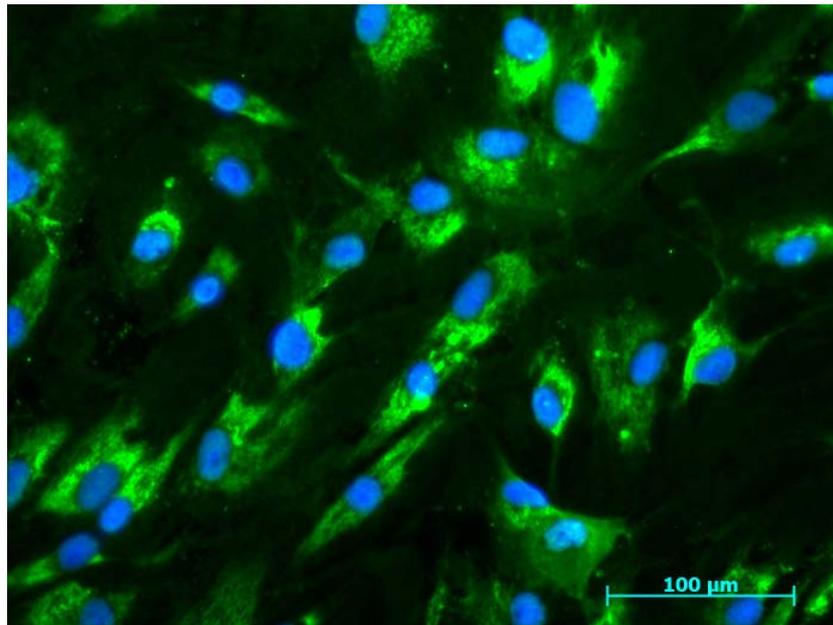


Abb. XXVIII: Immuncytochemie bei hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD; Klon MoAb5.8A.

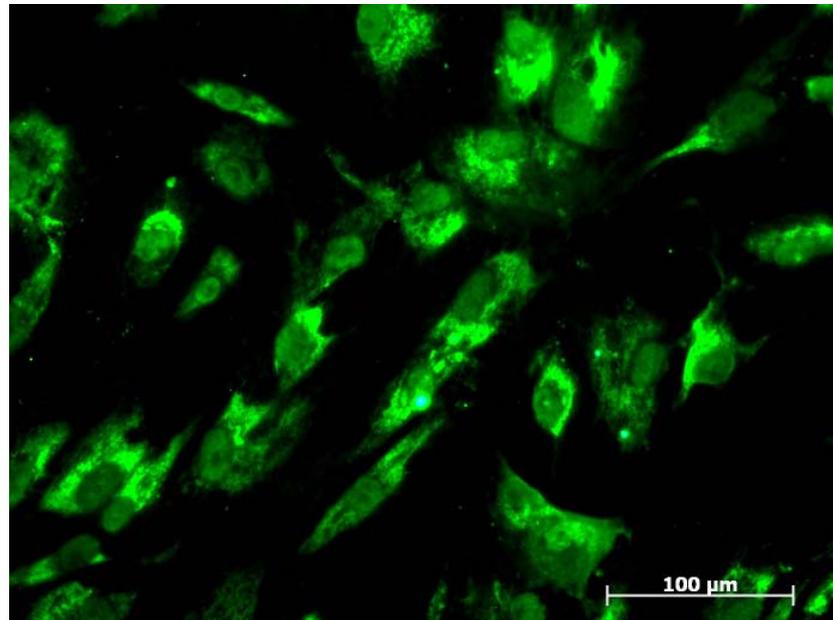


Abb. XXIX: Immuncytochemie bei hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD; Klon MoAb5.8A, ohne Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

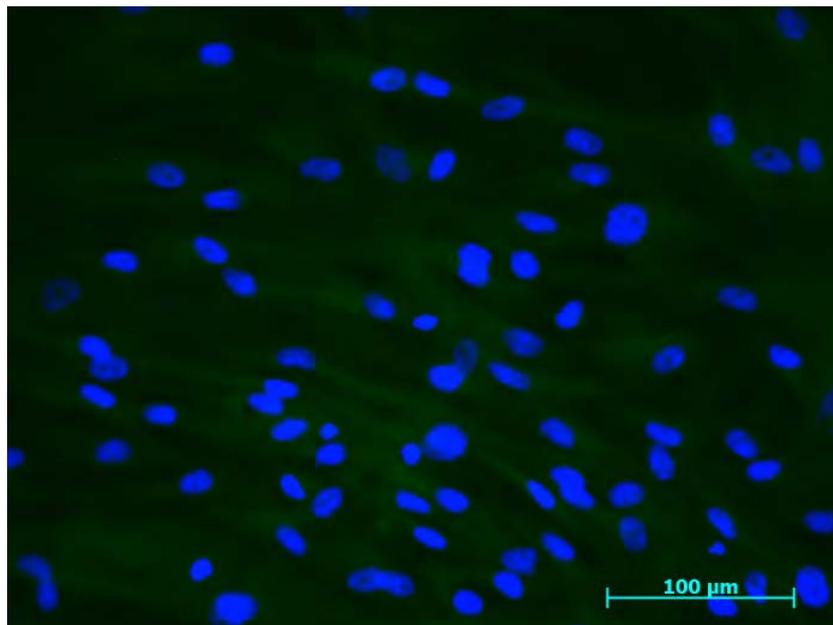


Abb. XXX: Immuncytochemie bei hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-Myosin Klon NOQ 7.5.4D.

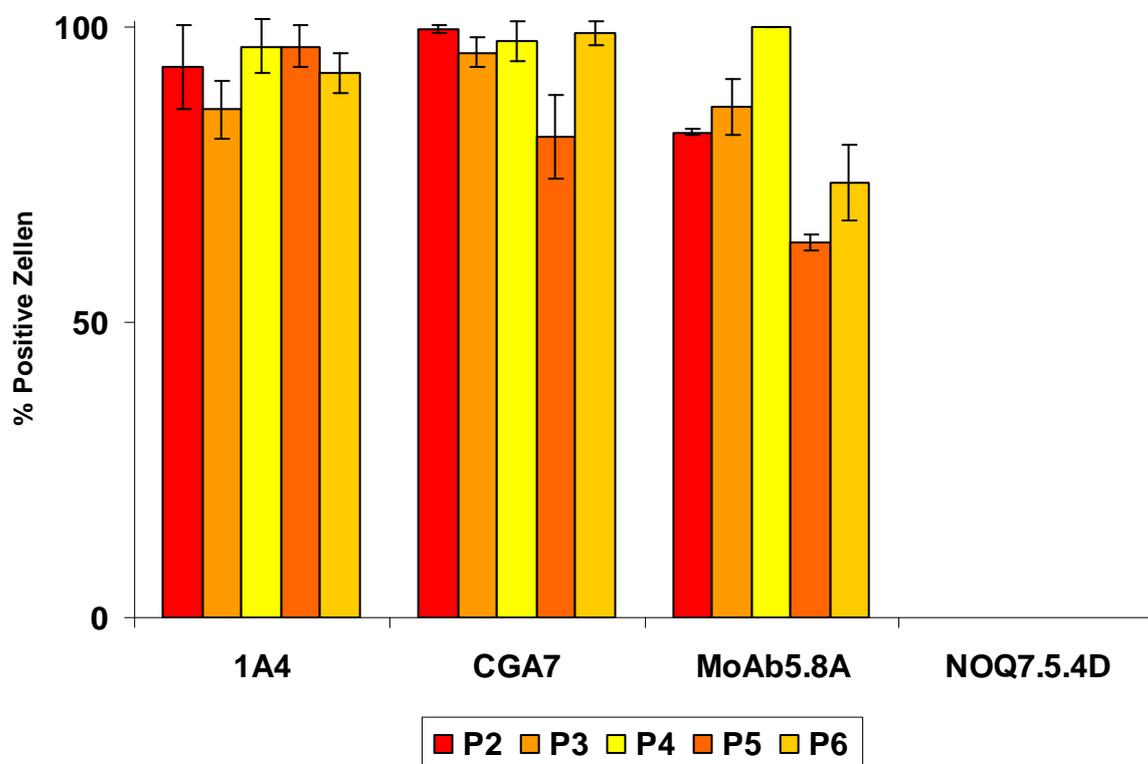


Abb. XXXI: Reaktion in Prozent der untersuchten Zellen nach Exposition gegenüber 5-Aza in Passage 2 (P2) bis Passage 6 (P6) auf glattmuskuläre Antigene mit Anti-alpha-Aktin-Antikörper (Klon 1A4) und Anti-alpha/gamma-Aktin-Antikörper (Klon CGA7) und auf skelettmuskuläre Antigene mit Anti-MyoD-Antikörper (Klon MoAb5.8A) und Anti-Myosin-Antikörper (Klon NOQ 7.5.4D).

4.2.2.2 Nicht gegenüber 5-Aza exponierte Zellen – Kontrollen

Bei den unbehandelten Zellen werden ebenfalls positive Reaktionen nachgewiesen. Bei dem glattmuskulären Marker Anti-alpha-Aktin Klon 1A4 liegt der Höchstwert mit 93,5 % positiver Zellen in Passage eins. Der geringste positive Wert für diesen Marker liegt mit 62,3 % in Passage null.

Für den zweiten glattmuskulären Marker, Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7, liegt der höchste Wert mit 99,8 % positiven Zellen ebenfalls in Passage eins. In der Passage null sind 60,3 % der ausgezählten Zellen positiv. Die Passagen zwei bis sechs sind mit diesem Antikörper negativ. Der skelettmuskuläre Transkriptionsfaktor MyoD Klon MoAb5.8A zeigt in der Passage null bei 73,3 % der Zellen und in Passage eins bei 92,2 % der Zellen eine positive Reaktion. In den weiteren Passagen liegen keine Reaktionen vor. Der skelettmuskuläre gegen langsames Myosin gerichtete Antikörper Klon NOQ 7.5.4D ist in allen Passagen negativ. Die Expression der untersuchten muskulären Antigene in den entsprechenden Passagen sind in den Abbildungen XXXII bis XL dargestellt.

Der Verlauf der Expression der untersuchten muskulären Marker mit zunehmender Passage ist in der Abbildung XLI zusammengefasst.

Die qualitative Auswertung zur Expressionsintensität ergibt für die Expression von alpha-Aktin zweifach positiv und für alpha/gamma-Aktin einfach positiv.

Abbildungen XXXII bis XXXV: hMSZ in Primärkultur mit dem jeweiligen Primärantikörper und mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper; Grün: positiver Antigennachweis, blau: Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

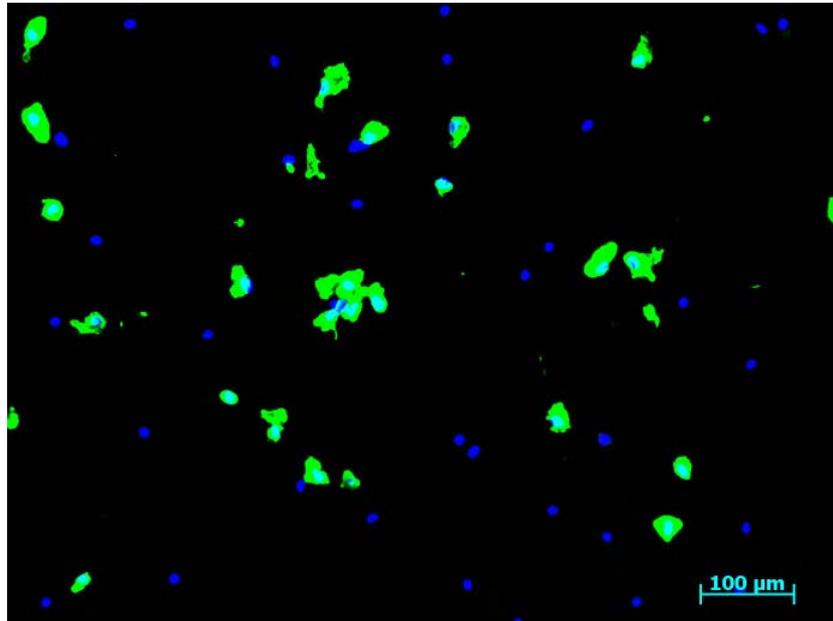


Abb. XXXII: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Cytospin P0, Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4.

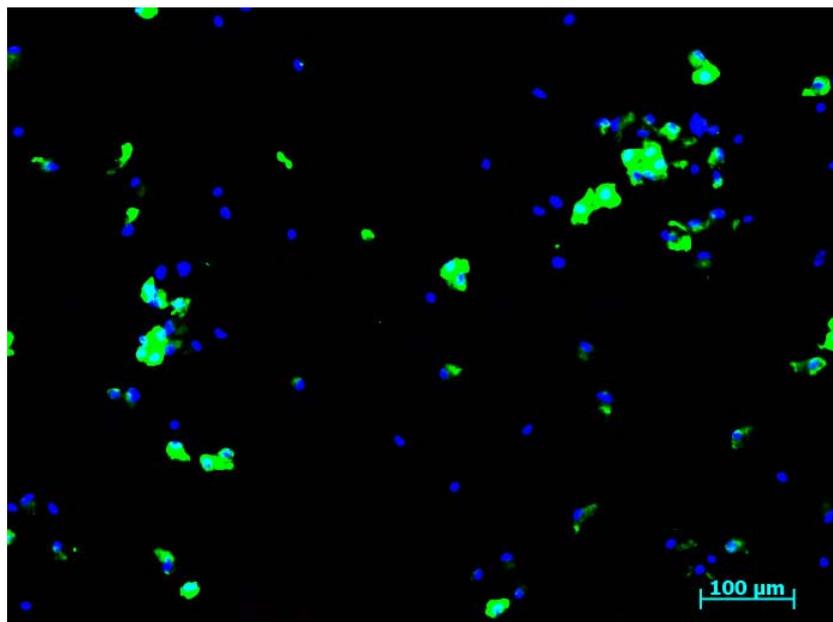


Abb. XXXIII: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Cytospin P0, Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7.

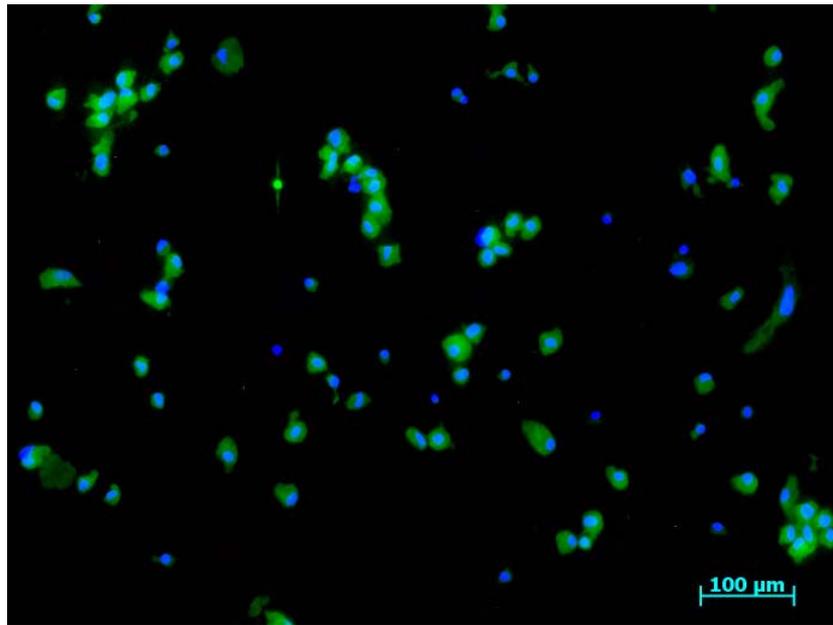


Abb. XXXIV: Immuncytochemie von hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Cytospin P0, Antikörper: Anti-MyoD Klon MoAb5.8A.

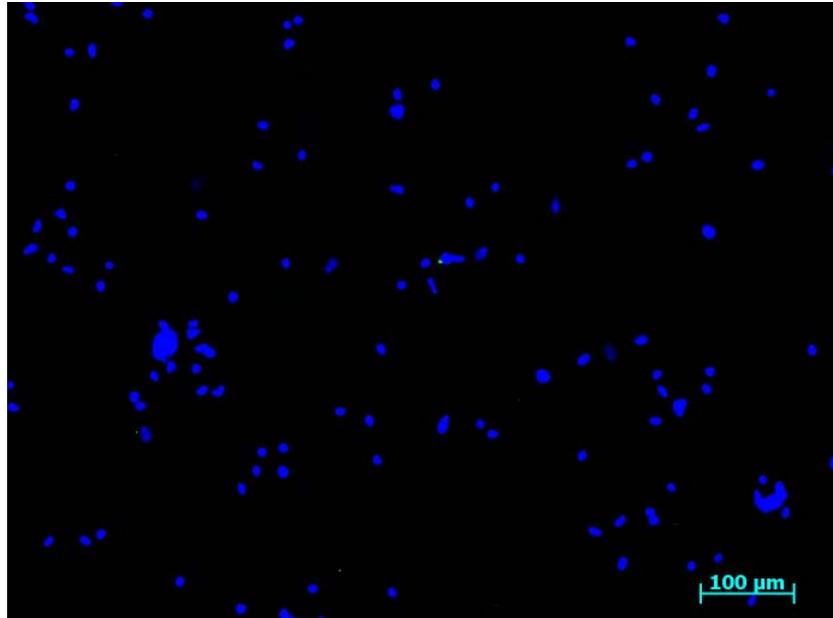


Abb. XXXV: Immuncytochemie von hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Cytospin P0, Antikörper: Anti-Myosin Klon NOQ 7.5.4D.

Abbildungen XXXVI bis XL: Nicht mit 5-Aza behandelte Zellen in Passage eins mit dem jeweiligen Primärantikörper und mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper. Grün: positiver Antigennachweis, blau: Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

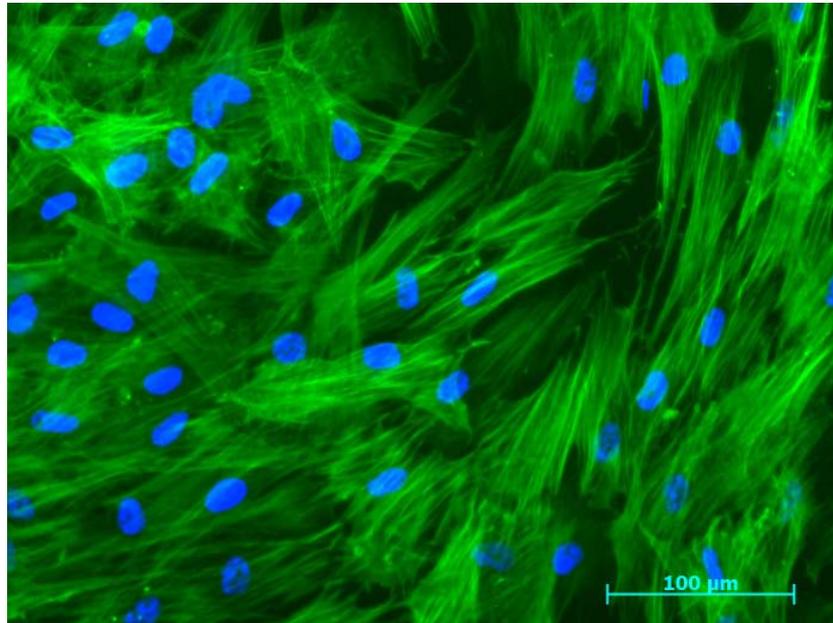


Abb. XXXVI: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4.

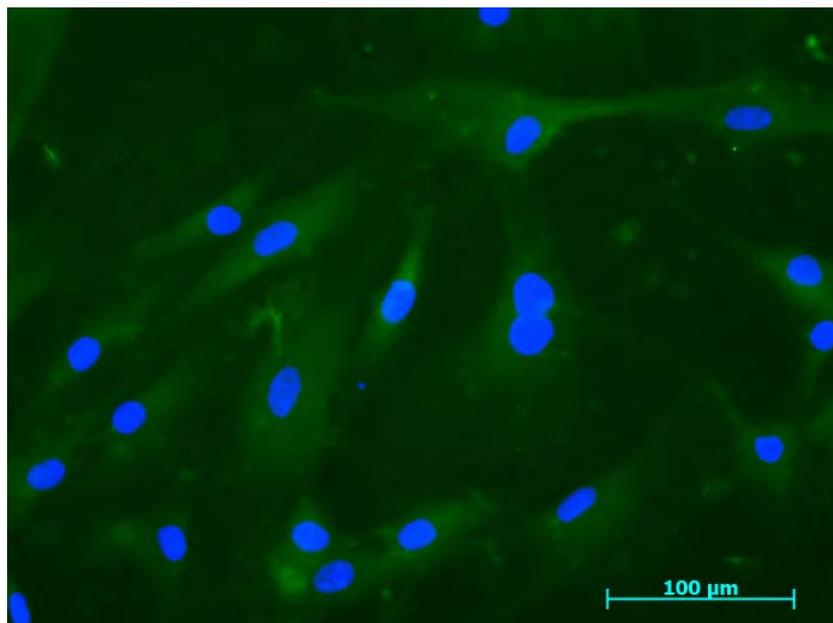


Abb. XXXVII: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7.

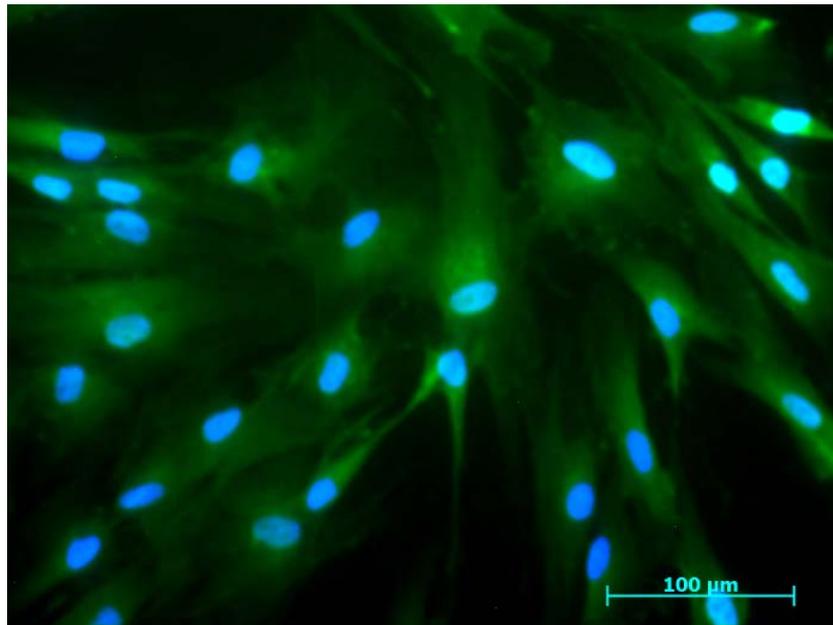


Abb. XXXVIII: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD Klon MoAb5.8A.

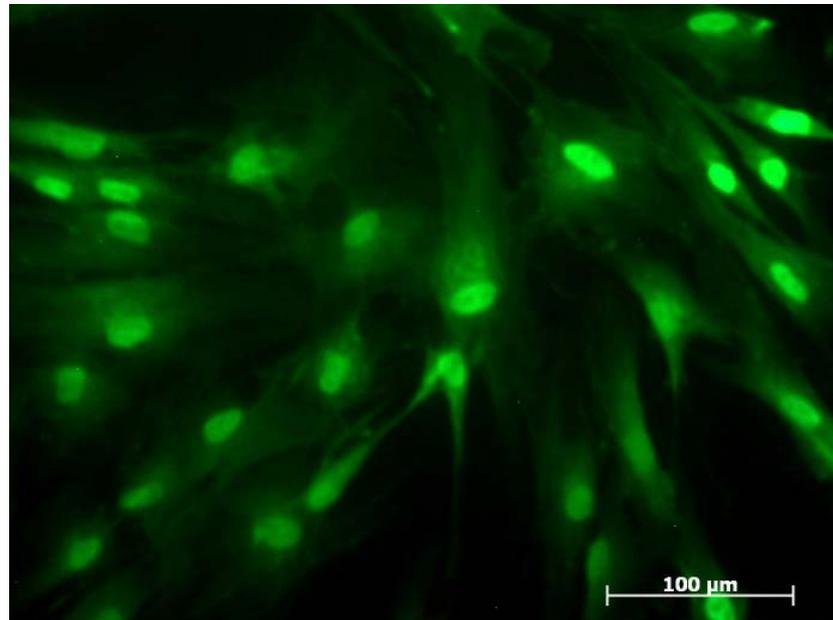


Abb. XXXIX: Immuncytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-MyoD Klon MoAb5.8A, ohne Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

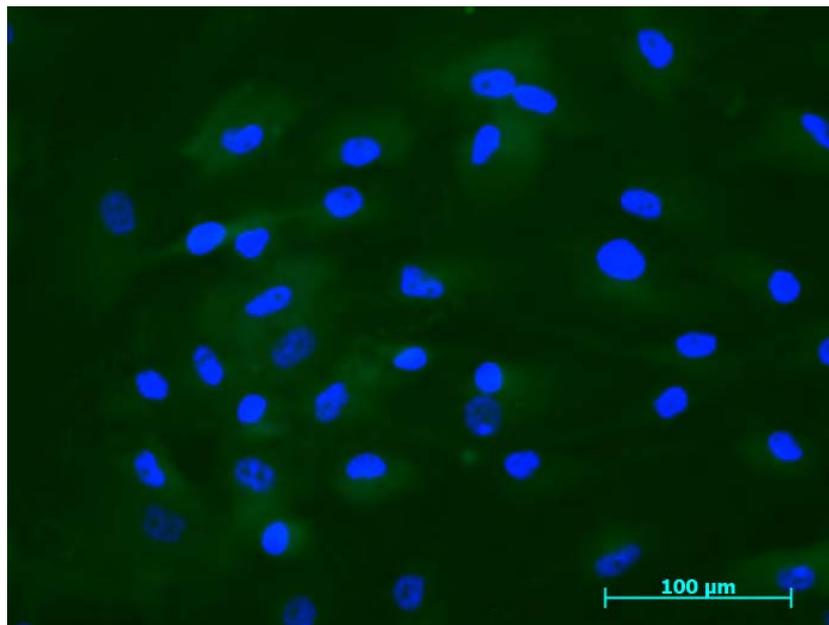


Abb. XL: Immunocytochemie bei hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, Antikörper: Anti-Myosin Klon NOQ 7.5.4D.

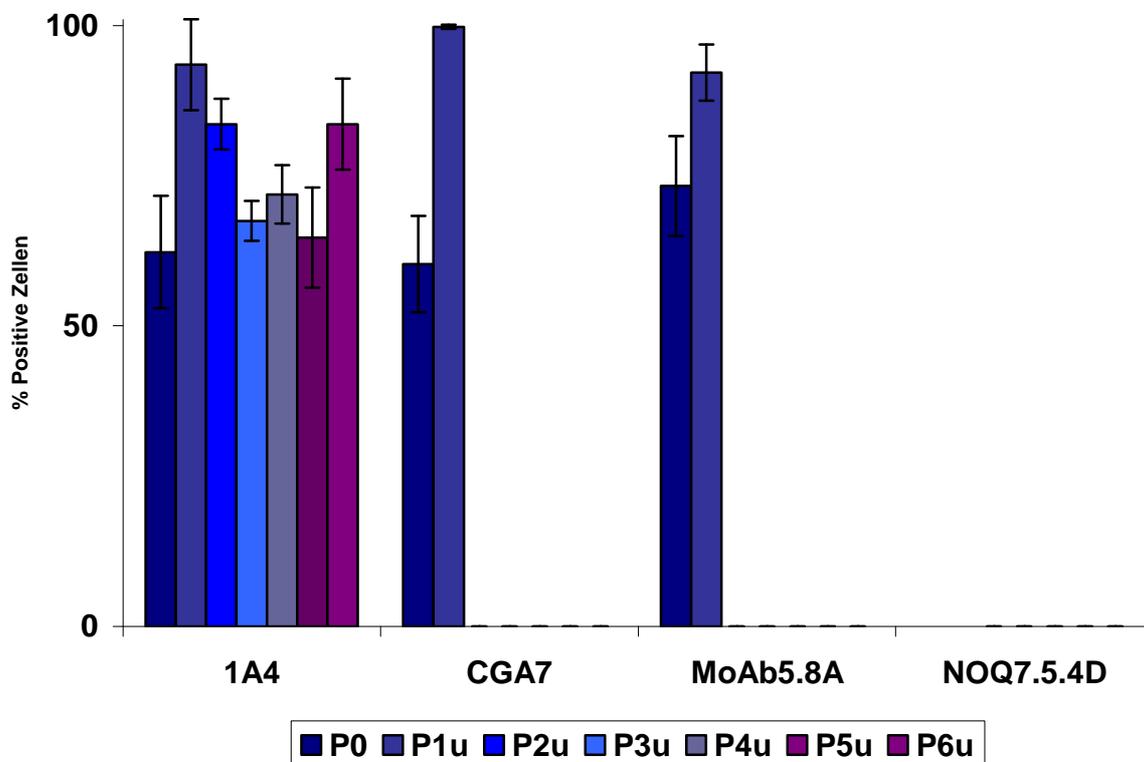


Abb. XLI: Reaktion in Prozent der untersuchten, nicht gegenüber 5-Aza exponierten Zellen von Passage 0 (P0) bis Passage 6 (P6u) auf glattmuskuläre Antigene mit Anti-alpha-Aktin-Antikörper (Klon 1A4) und Anti-alpha/gamma-Aktin-Antikörper (Klon CGA7) und auf skelettmuskuläre Antigene mit Anti-MyoD-Antikörper (Klon MoAb5.8A) und Anti-Myosin-Antikörper (Klon NOQ 7.5.4D).

4.2.3 Nachweis der applizierten Zellen in den histologischen Schnitten

Die direkt in den Blasenhalss injizierten Zellen können über den gesamten Versuchszeitraum von vier bis 56 Tagen mikroskopisch nachgewiesen werden (siehe Abbildungen XLII bis XLVI). Bei zwei Tieren können keine Zellen detektiert werden. Werden nur sehr vereinzelt PKH 26 fluoreszierende Zellen in den Gewebeschnitten ausgemacht, wird das Ergebnis mit schwach positiv bezeichnet (siehe Tabelle 4). Eine Migration applizierter Zellen im Blasengewebe kann nicht festgestellt werden.

Abbildungen XLII bis XLVI: Nachweis von MSZ nach der Applikation. Rot: PKH 26-markierte hMSZ. Die Balken entsprechen 200µm.

L: Lumen; M: Muskulatur; U: Urothel

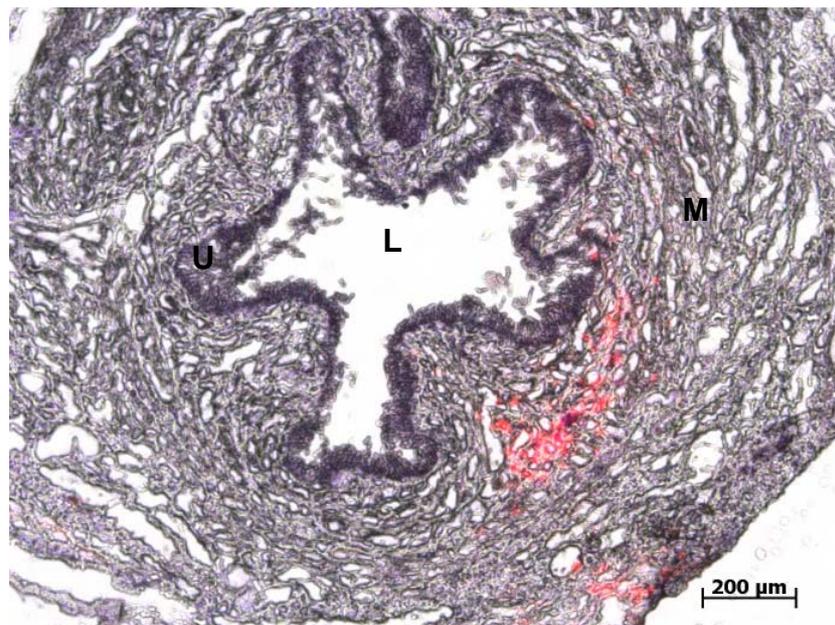


Abb. XLII: Histologie einer Rattenblase mit injizierten hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage, P3), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Ratte 26, Präparat 40.

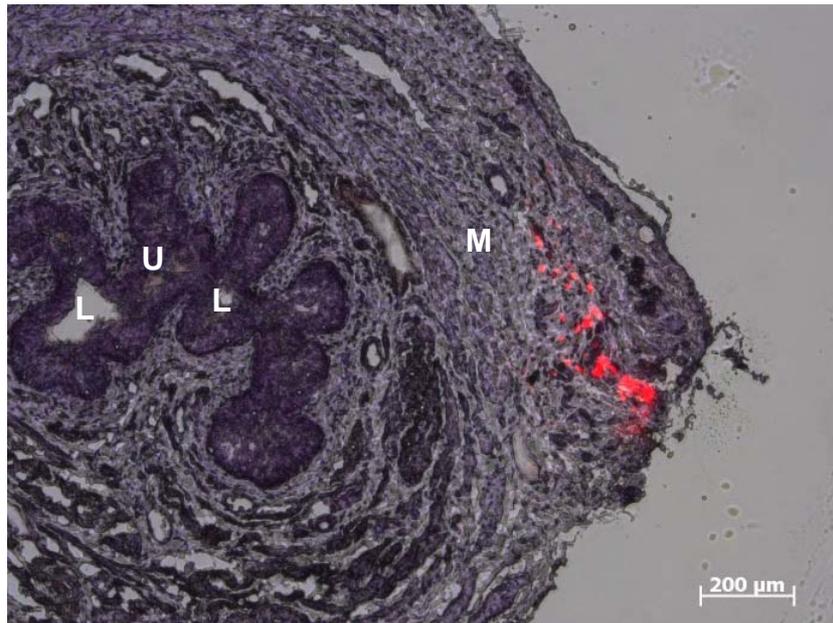


Abb. XLIII: Histologie einer Rattenblase mit injizierten hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage, P5), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Ratte 41, Präparat 67.

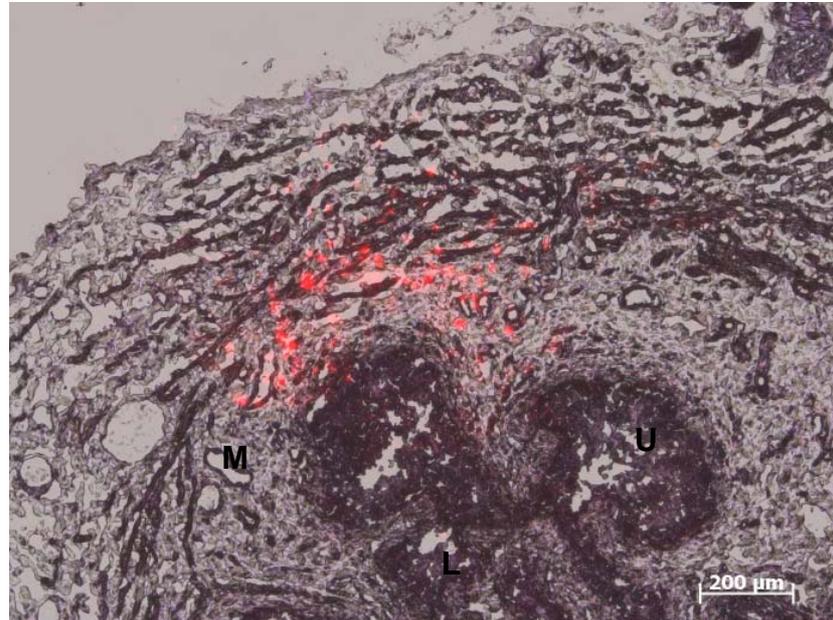


Abb. XLIV: Histologie einer Rattenblase mit injizierten hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage, P6), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Ratte 43, Präparat 54.

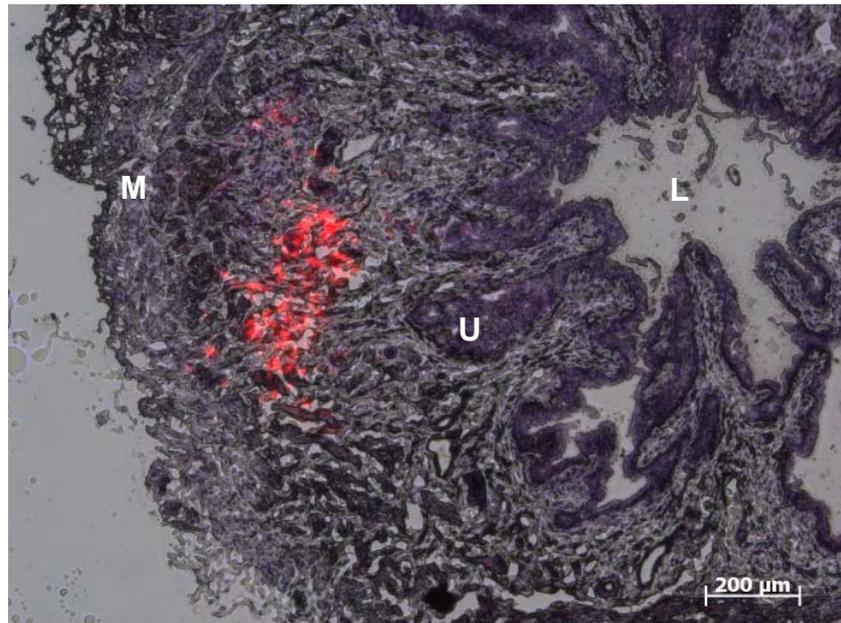


Abb. XLV: Histologie einer Rattenblase mit injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert (8 Tage, P1), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Ratte 44, Präparat 78.

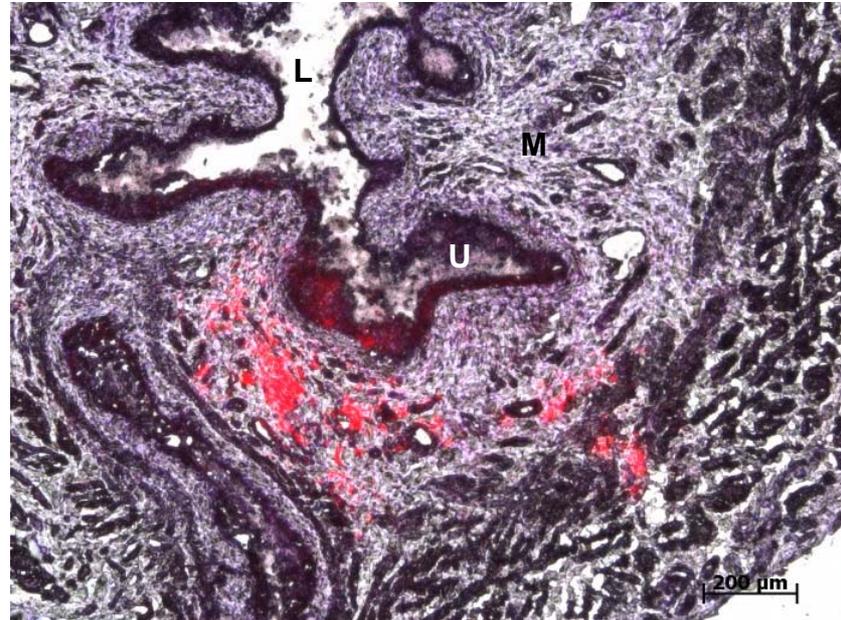


Abb. XLVI: Histologie einer Rattenblase mit injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage P1), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Ratte 48, Präparat 79.

Differenzierungs- stadium	Versuchsdauer in Tagen	Passage	Zellnachweis		
			Positiv	Schwach positiv	Negativ
Undifferenziert	4	1	3/3		
	8	1	2/2		
	12	1		2/2	
	28	1	1/2	1/2	
	56	1	1/2	1/2	
Differenziert	56	2	1/2		1/2
		3	3/3		
		4	2/3		1/3
		5	3/3		
		6	1/1		

Tabelle 4: Nachweis der applizierten Zellen in vivo in Abhängigkeit der Versuchsdauer, der Passage und des Differenzierungsstadiums.

4.2.4 Nachweis myogen differenzierter Zellen in den histologischen Schnitten

Wie für das syngene Tiermodell beschrieben (siehe Abschnitt 4.1.4), können auch im xenogenen Tiermodell nur stark fluoreszierende Gewebeschnitte für die immunhistologische Auswertung verwendet werden.

Bei der Anfärbung des Blasengewebes mit den gegen glattmuskuläre Antigene gerichteten Antikörpern (Klon 1A4 und Klon CGA7) kann die glatte Muskulatur der Blase, des Blasenhalses und der Harnröhre eindeutig dargestellt werden (siehe Abbildung XLVII bis Abbildung LII).

Abbildungen XLVII bis LII: PKH 26-markierte Zellen (rot) im umliegenden Muskelgewebe (grün); angefärbt mit dem jeweiligen Primärantikörper und mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper.
L: Lumen; M: Muskulatur; U: Urothel

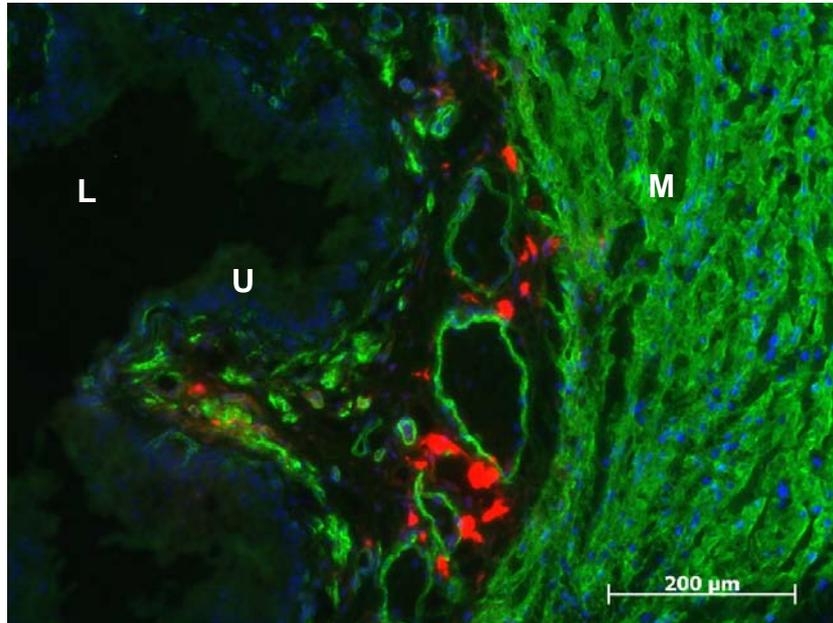


Abb. XLVII: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten, injizierten hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4, Ratte 26, Präparat 60.

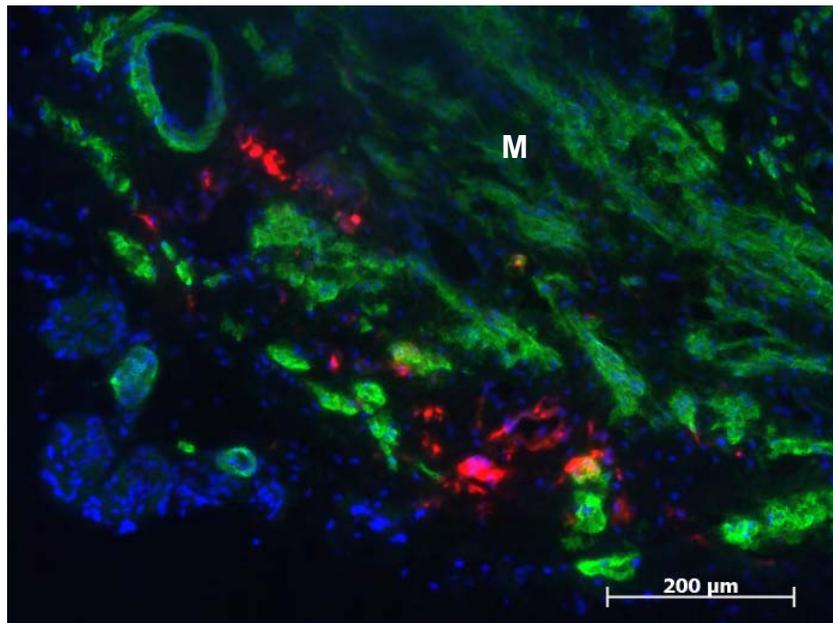


Abb. XLVIII: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten, injizierten hMSZ, gegenüber 5-Aza exponiert (56 Tage, P3), Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7, Ratte 26, Präparat 62.

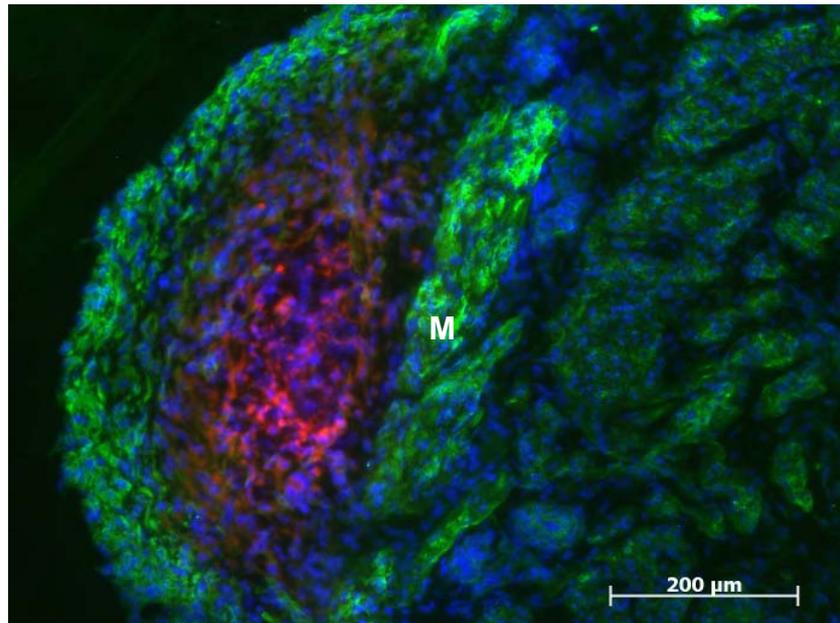


Abb. XLIX: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten, injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, (4 Tage, P1), Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4, Ratte 39, Präparat 66.

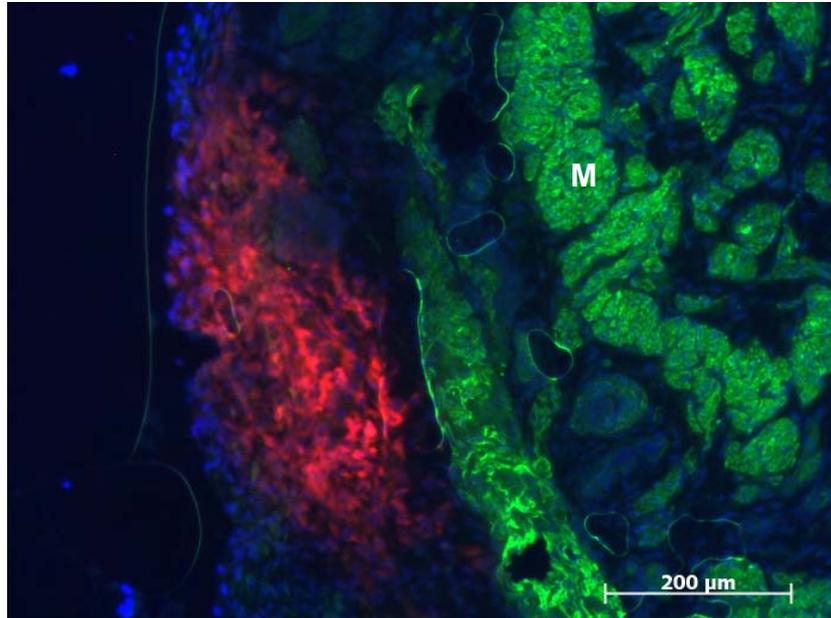


Abb. L: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten, injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, (4 Tage, P1), Antikörper: Anti-alpha/gamma-Aktin Klon CGA7, Ratte 39, Präparat 63.

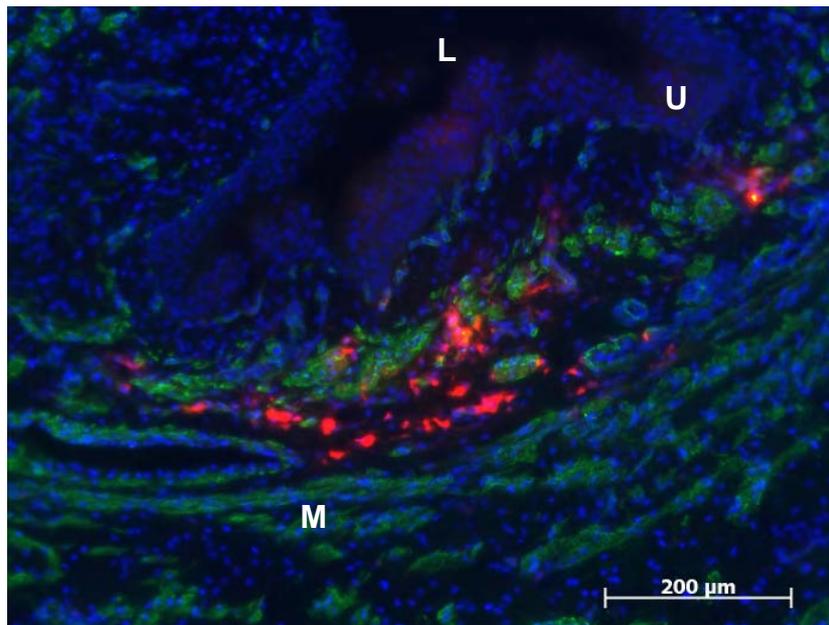


Abb. LI: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten, injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, (56 Tage, P1), Antikörper: Anti-alpha-Aktin Klon 1A4, Ratte 48, Präparat 94.

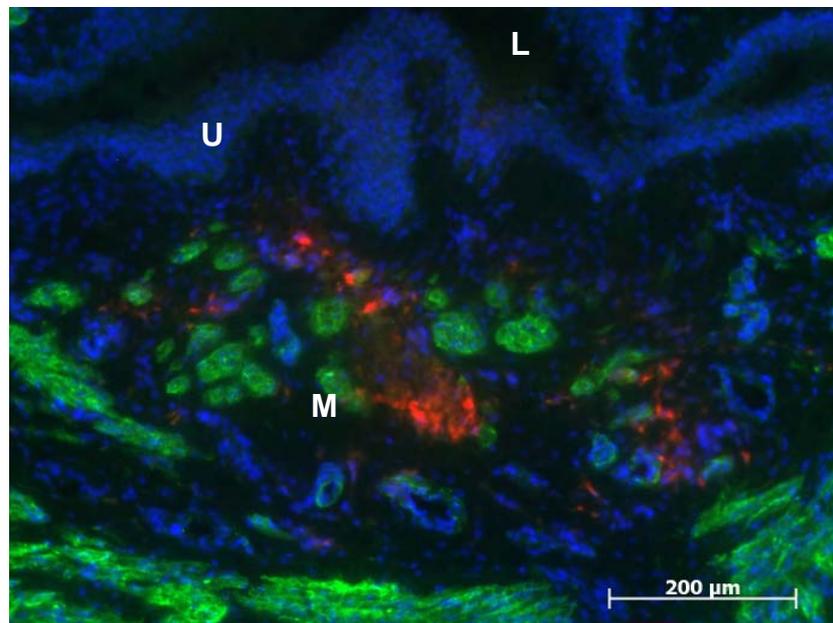


Abb. LII: Ausschnitt einer Rattenblase mit PKH 26-markierten injizierten hMSZ, nicht gegenüber 5-Aza exponiert, (56 Tage, P1), Antikörper: Anti-alpha/gamma Aktin Klon CGA7, Ratte 48, Präparat 84.

Die PKH 26-markierten Zellen können über den gesamten Versuchszeitraum von 56 Tagen in den muskulären Bereichen nachgewiesen werden. Bei keinem der verwendeten Antikörper kann im Bereich der injizierten Zellen eine Doppelfluoreszenz gezeigt werden.

5. Diskussion

5.1 Gründe für neue Therapieoptionen der Belastungsinkontinenz

Ungefähr 300 Techniken werden in der Humanmedizin für die Behandlung der Belastungsinkontinenz beschrieben, davon aber nur wenige mit ausreichendem Erfolg praktiziert [Sharifiaghdas 2005].

Mit den momentan zur Verfügung stehenden chirurgischen Techniken für die Therapie der Belastungsinkontinenz wird nur eine passive Verengung der Urethra berichtet. Die direkte Heilung bzw. Regeneration des Rhabdosphinkters wird nicht erzielt [Deng et al. 2007].

In der Tiermedizin gibt es bis jetzt noch keine chirurgische und konservative Therapiemöglichkeit, die Inkontinenz bei Hunden immer zu heilen. Wie in Kapitel 2.6.1 ausführlich beschrieben, ist eine Methode die Kollageninjektion, welche nach Arnold [1997] eine Erfolgsrate von 75 % besitzt. Weitere chirurgische Möglichkeiten sind wie erwähnt die Kolposuspensionstechnik [Holt 1985 und 1990a], Harnröhrenplastiken [Bushby und Hankes 1980; Dean et al. 1989] und Blasenhalsschlingen [Christie 1986]. Die konservative Therapie besteht in der Gabe von Östrogenen und Sympathomimetika [Blendinger et al. 1995]. Alle Therapieoptionen stellen lediglich, auch in der Tiermedizin, eine symptomatische und keine kausale Therapie dar.

5.2 Wachstum der MSZ in vitro und deren Differenzierung

5.2.1 Wachstum

MSZ von Ratten wachsen nach den Angaben verschiedener Arbeitsgruppen schwieriger als MSZ anderer Spezies [Clark 1995; Phinney 1999]. In unseren Versuchen wird kein Unterschied bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit muriner mesenchymaler Stammzellen (mMSZ) im Vergleich zu humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSZ) beobachtet. Sowohl die mMSZ als auch die hMSZ zeigen bei vergleichbarer Aussaatdichte in einer T25 Kulturflasche nach zwei Wochen Konfluenz. Die hMSZ bilden Kolonien, wobei übereinander gelagerte Zellschichten neben neu gebildeten kleineren Kolonien beobachtet werden. Wie schon von Digirolamo et al. [1999] beschrieben, zeigen sich in vitro bei den gegenüber 5-Aza

exponierten Zellen ebenfalls zwei verschiedene Zellformen. In den niedrigen Zellpassagen sind die Zellen spindelförmig. Diese proliferieren schnell und bilden große Kolonien aus. In den höheren Passagen liegen breite, abgeflachte Zellen vor, die kleine Kolonien ausbilden. Die Teilungsrate ist wesentlich verlangsamt. Es ist bekannt, dass die Proliferation kultivierter Zellen beginnt, sobald diese Zytokeratine bilden. Die Proliferation in vitro endet mit den Zell-Zellkontakten bei Konfluenz, der so genannten Kontaktinhibition [Dietrich et al. 1997; Wieser et al. 1999; Heit et al. 2001].

Die hMSZ verlieren mit fortgesetzter Passagierung allmählich ihre Fähigkeit zu proliferieren. Dies geht wiederum mit einer Änderung der Morphologie einher. Dieses Phänomen wird schon 2003 von Liu et al. beschrieben. Sie sind, gestützt auf die Aussagen anderer Autoren [Bruder et al. 1997; Digirolamo et al. 1999; Banfi et al. 2000], der Meinung, dass die Proliferationsmöglichkeit der MSZ als Population begrenzt ist. Fraglich ist, ob die MSZ durch ihre kurze Lebensspanne ihre Möglichkeit zur Selbsterneuerung nach Injektion im Gewebe beibehalten.

Im Rahmen unserer Versuche können die Zellen bis zu 163 Tage post injektionem nachgewiesen werden. Im syngenem Tiermodell kann durch die Doppelfluoreszenz, die in Blasengewebe bei drei Ratten gefunden wird, die Expression glattmuskulären alpha-Aktins der injizierten Zellen belegt werden.

5.2.2 Differenzierung von MSZ (murin und human)

Im Rahmen dieser Arbeit wird die myogene Differenzierbarkeit von MSZ in vitro untersucht. MSZ zeichnen sich durch eine multipotente Differenzierungsmöglichkeit (dreiliniertes Differenzierungspotenzial) nach Behandlung mit dem entsprechenden Differenzierungsmedium aus [Dominici et al. 2006]. Die Differenzierbarkeit von MSZ bei geeigneten Bedingungen in multiple Gewebe wird sowohl in vitro als auch in vivo beschrieben [Makino et al. 1999; Petersen et al. 1999; Kopen et al. 1999; Anderson et al. 2001]. MSZ haben die Fähigkeit, in eine Vielzahl von Geweben zu differenzieren. Die Differenzierung von MSZ in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen wird von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht [Bruder et al. 1998; Digirolamo et al. 1999; Pettinger et al. 1999; Barry et al. 2001].

Körner et al. [2006] versuchen, pluripotente Vorläuferzellen von Pferdeblut zu isolieren und diese mit mesenchymalen Knochenmarkstammzellen des Pferdes zu vergleichen. Knochenmarkstammzellen von Pferden und Menschen können zu Knorpelgewebe differenzieren, während dies in der Studie von Körner et al. [2006] mit Vorläuferzellen des Blutes von Pferden nicht gelingt.

Diese Erkenntnisse liefern die Möglichkeit für neue zellbasierte Therapieformen. Die Differenzierung von MSZ in muskuläre Zellen wird erstmals von Taylor und Jones [1982] für embryonale und mesenchymale Stammzellen und von Wakitani et al. [1995] für Rattenstromazellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen zahlreiche andere Forschergruppen [Ferrari et al. 1998; Gussoni et al. 1999].

In unseren Untersuchungen wird die Expression von alpha-Aktin, alpha/gamma-Aktin, MyoD und von skelettmuskulärem Myosin bei MSZ, die gegenüber 5-Aza exponiert sind und bei Zellen ohne 5-Aza-Behandlung in verschiedenen Passagen sowohl bei mMSZ als auch bei hMSZ untersucht.

5.3 5-Aza und dessen Möglichkeiten

5-Aza ist ein Zytostatikum, das als Antimetabolit (Purin-Metabolit) wirkt und indirekt die Methylierung der Cytosin-Base in CpG-DNA-Motiven inhibiert [Rizwana und Hahn 1999]. 5-Aza wird als Chemotherapeutikum (Vidaza[®]) zur Behandlung des Myelodysplastische Syndroms verwendet.

Ist 5-Aza intrazellulär vorhanden, wird es während der Replikation in die DNA und während der Transkription in die RNA eingebaut. Der Einbau von 5-Aza in die DNA und die RNA hemmt DNA-Methyltransferasen bzw. RNA-Methyltransferasen und verursacht dadurch eine Demethylierung entsprechender Sequenzen. Dadurch werden Proteine der Zellregulation beeinflusst, die an das DNA-/RNA-Substrat binden können.

Erste Beobachtungen in vitro zeigen, dass die Behandlung einer Fibroblasten-Zelllinie mit 5-Aza und das daraus resultierende veränderte Methylierungsmuster der genomischen DNA zu einer Umwandlung der Fibroblasten in ausdifferenzierte Myotuben führen [Constantinides et al. 1977; Taylor und Jones 1979]. Beim Vergleich beider Zelltypen wird in den Myotuben ein spezifischer Transkriptionsfaktor entdeckt, der Myogenic Determination Factor (MyoD) [Davis et al. 1987]. MyoD ist

zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Myf5 (Muskelentwicklungsfaktor) [Braun et al. 1989] für die myogene Determination von Stammzellen verantwortlich. Beide Faktoren werden somit als primäre Muskeltranskriptionsfaktoren bezeichnet [Megeney und Rudnicki 1995].

In den durchgeführten Untersuchungen wird nach Zugabe von 5-Aza weder bei den hMSZ noch bei den mMSZ in der mikroskopischen Kontrolle ein Absterben der Zellen *in vitro* beobachtet. Auch bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit von gegenüber 5-Aza exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wird kein Unterschied festgestellt. Sun et al. [2007] berichten, dass nach Zugabe von 5-Aza in der Gewebekultur zu Beginn einige Zellen absterben und die restlichen Zellen langsamer wachsen. Die Wachstumsgeschwindigkeit ändert sich bei unseren Untersuchungen nur mit steigender Passagezahl. Von Passage fünf bis Passage sechs wächst das Zeitintervall zwischen den einzelnen Passagen auf vier Wochen an, während das Intervall zwischen den Passagen eins und vier noch zwei Wochen beträgt. Die glattmuskulären Antigene alpha-Aktin und alpha/gamma-Aktin sind in MSZ der Ratte und des Menschen sowohl in den nativen Kontrollzellen als auch gegenüber 5-Aza exponierten Zellen immunocytochemisch nachweisbar. Alpha-Aktin ist in den nativen mMSZ und den gegenüber 5-Aza exponierten Zellen in 50-90 % der Zellen positiv. Bei den hMSZ liegen die Werte für dieses Antigen im Durchschnitt bei 75,3 % in den Kontrollen (P0-P6) und bei 90,9 % in den exponierten (P2-P6) Zellen. Alpha/gamma-Aktin reagiert bei den mMSZ in den Kontrollen und den gegenüber 5-Aza exponierten Zellen durchschnittlich bei 20 % der Zellen positiv. Bei den hMSZ ist der Durchschnittswert 80,1 % für die Kontrolllinien (P0 und P1) und 94,6 % für die exponierten (P2-P6) Zelllinien.

Die glattmuskulären Antigene sind bei den Kontrollzellen gleich häufig nachweisbar im Vergleich zu den gegenüber 5-Aza exponierten MSZ. Da die Kontrollzellen für die untersuchten glattmuskulären Marker ebenfalls positiv reagieren, ist es nicht notwendig, zur myogenen Differenzierung 5-Aza hinzuzuziehen.

Bei den skelettmuskulären Markern zeigt sich ein anderes Bild. Der Transkriptionsfaktor MyoD ist bei den gegenüber 5-Aza exponierten Zellen in weniger als 1 % der mMSZ positiv und in den Kontrollen nicht nachweisbar. Bei den hMSZ liegt der Wert in den gegenüber 5-Aza exponierten Zellen (P2-P6) bei im Mittel 81,1 %. Bei den Kontrollzellen kann nur in den nativen Zellen und der Passage eins

eine Reaktion mit dem Transkriptionsfaktor MyoD in 82,8 % der Zellen beobachtet werden.

Das skelettmuskuläre Myosin kann weder bei mMSZ noch bei hMSZ nachgewiesen werden. Eine Entdifferenzierung in vitro liegt somit nicht vor.

Eine myogene Differenzierung von Zellen könnte ohne 5-Aza-Behandlung durch verschiedene Medien erreicht werden. Phinney et al. [1999] entdecken in ihren Untersuchungen, dass durch Amphotericin B eine myogene Differenzierung von MSZ möglich ist. Aufgrund dieses Wissens verwenden wir in unseren Versuchen kein Fungizid. Für die Antibiose wurde PenStrep eingesetzt. Shim et al. [2004] zeigen, dass hMSZ in eine kardiomyogene Linie mit charakteristischen myokardialen Eigenschaften differenziert werden können, in dem man ein einfaches Kulturmedium, das Dulbeccos Modifizierte Eagle Medium (DMEM) ergänzt mit 10 % FBS und weiteren nicht genannten Zusätzen, benutzt. Planat-Benard et al. [2004] beschreiben die spontane Entstehung von funktionellen Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen, die von murinen mesenchymalen Fettgewebstammzellen abstammen und in halbfestem Methylzellulose-Medium, das mit Interleukin 3, Interleukin 6 und einem rekombinanten Stammzellefaktor ergänzt ist, kultiviert wurden. Nassiri et al. [2007] untersuchen in ihrer Studie die Differenzierung von Knochenmarkstammzellen in kardiomyogene und endotheliale Zellen mittels 5-Aza und einem Gefäßendothelwachstumsfaktor. Sie folgern ebenfalls, dass eine Differenzierung von Knochenmarkstammzellen vor der Transplantation nicht notwendig sei. Unter Ultraschallkontrolle beobachten sie eine Transdifferenzierung der Knochenmarkstammzellen in vivo innerhalb eines Monats zu Kardiomyozyten. Bartsch et al. [2005] injizieren postnatale Zellen der menschlichen Haut in die Muskulatur der Hintergliedmaßen von Ratten und kommen zu dem Ergebnis, dass diese Zellen in Fettgewebszellen, Knochenzellen und Muskelzellen sowohl in vitro als auch in vivo wachsen und proliferieren können.

Lee et al. [2008] untersuchen die Möglichkeit einer Differenzierung von humanen Stammzellen aus dem Fettgewebe mit 5-Aza in Herzmuskelzellen. Die Arbeitsgruppe kommt zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Gruppe von Sun et al. [2007], wonach der Einsatz von 5-Aza das Zellwachstum hemmt. Lee et al. [2008] stellen zudem eine deutliche Reduktion der Expression von kardiomyogenem alpha-Aktin fest. Sie

kommen zu dem Schluss, dass eine Behandlung mit 5-Aza für eine Differenzierung von humanen Fettstammzellen in Herzmuskelzellen alleine nicht ausreichend wäre.

Walker und Shay [1984] induzieren mit Hilfe von 5-Aza bei einer Zelllinie, die die myogene Differenzierungsmöglichkeit verloren hat, die Bildung von neuen muskulären Kolonien.

Bhagavati und Xu [2004] beschreiben einen anderen Weg der myogenen Differenzierung von MSZ aus dem Knochenmark. Sie führen ein Antibiotika-resistentes Gen auf das MyoD- und MYf5 Enhancer-Element in Stammzellen aus der Maus ein. Diese Enhancer-Elemente sind selektiv auf den skelettmuskulären Vorläuferzellen exprimiert. Die Resultate zeigen, dass durch genetische Selektion eine ausreichende Anzahl von myogenen Vorläuferzellen durch die Isolierung aus MSZ für zelltransplantierende Therapien gewonnen werden können.

5.4 Möglichkeiten der Zelltransplantation und Nachweis der Zellen

Saito et al. [2002] zeigen, dass MSZ in einem xenogenen Milieu toleriert werden und bei einem verletzten Myocard hinzugezogen werden können, um in Zellen mit kardiologischem Phänotyp zu differenzieren. Wang et al. [2007] untersuchen in ihren Forschungen zur Osteogenese die Durchführbarkeit von xenogenen Implantationen von MSZ aus dem Knochenmark von Ratten. Sie besiedeln ein künstliches HA/TCP Gerüst mit MSZ und implantieren dieses dann in den M. quadrizeps von SCID und MF1 Mäusen. Nach 11 Wochen werden die Implantate entnommen und untersucht. Bei den SCID Mäusen wird sowohl in den Kontrollmäusen als auch in den Mäusen mit MSZ keine Entzündungsreaktion festgestellt. Bei den SCID Mäusen kann eine Differenzierung der MSZ in Richtung Knochengewebe nachgewiesen werden. Bei den MF1 Mäusen weisen die Daten darauf hin, dass die Rattenstammzellen über die Dauer von 11 Wochen überlebt haben, allerdings zeigen sich starke Immunreaktionen an der Implantationsstelle. Dieses führt zu einer Beeinträchtigung der In-vivo-Osteogenese der MSZ. Bei den MF1 Mäusen kann weder eine neue Knochenformation, noch Osteoid-Gewebe nachgewiesen werden.

In unseren Versuchen wird weder im syngenem noch im xenogenem Tiermodell eine Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle beobachtet. Im syngenem Tiermodell werden transplantierte Zellen über einen Versuchszeitraum von maximal 163 Tagen

nachgewiesen. In xenogenen Tiermodell werden transplantierte Zellen über die gesamte Versuchsdauer von maximal 56 Tagen nachgewiesen.

5.4.1 Nachweis der Zellen in vivo und deren Differenzierung

Pro Tier werden ca. eine Million Zellen in den Blasenhalss bei insgesamt 39 Tieren injiziert. Der Nachweis der injizierten Zellen nach den jeweiligen Zeitintervallen erfolgt in histologischen Schnitten qualitativ durch die mikroskopische Detektion des roten Fluoreszenzfarbstoffes PKH 26, mit dem die Zellen vor Applikation markiert worden sind. Es ist mit großer Schwierigkeit verbunden, die genaue Anzahl an Zellen von der Injektionsspritze über die Kanüle in den Blasenhalss der Rattenblase zu injizieren. Die Zellen befinden sich noch kurz vor der Injektion in ca. 40 µl Medium, wovon nach der Injektion noch ein kleiner Rest technisch bedingt in der Kanüle zurück bleibt.

Die zweite undefinierte Variable liegt in der Injektionstechnik. Zur Injektion der Zellen verwenden wir 0,3 mm dicke Insulinkanülen. Diese sind aber nur unwesentlich kleiner als der Blasenhalss einer Rattenblase.

Trotz diesen technisch bedingten Schwierigkeiten der Zellinjektion kommen wir mit den oben beschriebenen Ergebnissen zu einer insgesamt guten Ausgangslage. Eine intensive Literaturrecherche in der Datenbank pubmed ergibt keine vergleichbaren Veröffentlichungen. Insbesondere liegen keine Daten vor, wie viele Zellen von anderen Arbeitsgruppen nach Zellinjektion in den Zielgeweben gefunden werden, vor.

Es kann histologisch gezeigt werden, dass die injizierten Zellen gut in das Gewebe integriert. Hierbei wird zwischen dem xenogenen und syngenem Tiermodell kein Unterschied festgestellt.

In vivo kann im syngenem Tiermodell ab einer Versuchsdauer von 58 Tagen eine Migration der injizierten MSZ anhand ihrer PKH 26-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Ausgehend vom injizierten Zellcluster wird eine gleichmäßige Verteilung im Detrusorgewebe beobachtet. Höhn et al. [2002] und Mado et al. [2004] berichten, dass sich nach einem künstlichen Herzinfarkt bei Ratten injizierte Stammzellen in Richtung der verletzten Hemisphäre bewegen und sich um das Gebiet des ischämischen Infarktes anreichern. Innerhalb der ersten Woche wandern die Zellen aus dem injizierten Gebiet aus und sieben Tage nach Injektion kann die Richtung der

zum Infarktgebiet hingewanderten Zellen beobachtet werden. Nach 14 Tagen wird hier eine Zellintegration am Zielgewebe gesehen.

Um den Phänotyp der injizierten Zellen in vivo nachzuweisen, werden die Präparate mit fluoreszierenden Zellen mittels Immunhistochemie auf die Expression muskulärer Marker untersucht. Im syngenen Tiermodell kann bei drei der insgesamt 11 untersuchten Ratten der Nachweis erbracht werden, dass die injizierten Zellen einen glattmuskulären Phänotyp besitzen. Da die Zellen schon in vitro die glattmuskulären Marker exprimiert haben, kann gefolgert werden, dass die injizierten Zellen diese Marker beibehalten. Fraglich ist, weshalb man trotz zahlreicher und intensiver immunhistochemischer Untersuchungen nur bei drei Ratten in vivo differenzierte Zellen nachweisen kann. Im xenogenen Tiermodell werden bei den injizierten Zellen weder glattmuskuläre noch oder skelettmuskuläre Antigene gefunden. Trotz sehr guter Zellcluster, v. a. in den Versuchsreihen mit vier oder acht Tagen, zeigt sich in der Immunhistochemie keine Doppelfluoreszenz, die auf den glattmuskulären oder skelettmuskulären Phänotyp hinweist. Inwieweit hier aufgrund des artfremden Milieus eine Entdifferenzierung stattgefunden hat, bedarf weiterer Untersuchungen.

Mehrere neue Untersuchungen deuten an, dass transplantierte MSZ mit dem umliegenden Gewebe zusammenwirken können, in dem sie parakrine Faktoren abgeben und dadurch den Regenerationsprozess unterstützen [Caplan und Dennis 2006; Chen et al. 2008].

Kawada et al. [2004] berichten über die In-vivo-Differenzierung von transplantierten MSZ in Kardiomyozyten nach einem Herzinfarkt in einem Mäusemodell. Shake et al. [2002] und Mangi et al. [2003] zeigen, dass MSZ, die in das Myocard injiziert werden, einen kardiomyogenen Phänotyp in einem Ratten- und Schweinemodell ausbilden. Cao et al. [2006] injizieren murine embryonale Stammzellen in das Myocard von Nacktratten und weisen das Überleben, die Proliferation und die Migration dieser Zellen nach. Zhang et al. [2005] berichten über die In-vivo-Differenzierung von Knochenmarkstammzellen aus der Maus in Hepatozyten nach deren Injektion in die Leber. Die Arbeitsgruppe von Sgodda et al. [2007] weisen In-vitro- und In-vivo-Differenzierungen von MSZ aus dem Rattenfettgewebe in Leberzellen nach. Kruglyakov et al. [2006] finden heraus, dass MSZ nach Differenzierung mit 5-Aza in

vitro spontane Kontraktionen zeigen und sich nach Transplantation zu Kardiomyozyten, die sich in das Myocard integrieren, weiterentwickeln. Eine Möglichkeit, weshalb differenzierte Zellen in einem relativ geringen Ausmaß nachgewiesen werden kann, ist eine Entdifferenzierung der injizierten Zellen in vivo. Yoon et al. [2004] belegen, dass nach einer direkten Transplantation von nichtselektierten Knochenmarkstammzellen in das Myocard kurz nach einem Infarkt diese Zellen Verknöcherungsreaktionen im Myocard auslösen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass MSZ, die ein hohes Knochenbildungspotential besitzen [Friedestein et al. 1970 und 1976] und im Knochenmark liegen [Chamberlain et al. 2007; Baksh et al. 2005] an den Verknöcherungen beteiligt sind. Dies belegt die Notwendigkeit einer Selektion zu transplanzierender MSZ in vitro. Die Möglichkeit neuer Therapieformen mittels Stammzellen werden in Kapitel 5.6.1 diskutiert.

5.5 PKH 26-Markierung von MSZ zur Injektion in den Blasenhal

Die MSZ werden in den Blasenhal von Ratten injiziert und sollen dort über den Versuchszeitraum von vier bis zu 163 Tagen verbleiben und anschließend wieder gefunden werden. Um injizierte MSZ nach der Inkubationszeit für die Auswertung eindeutig identifizieren zu können, ist es notwendig, die Zellen vorher zu markieren. Entscheidend für die Auswahl eines Markierungssystems ist die Frage, ob die Kopplung selbst die Funktion der Zelle beeinträchtigt oder gar stört und ob der Farbstoff für die Detektion intensiv genug ist und ausreichend lange in oder an der Zelle verbleibt.

PKH 26 ist ein fluoreszierendes Molekül, das aus einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette, einem Linkermolekül und einem Fluorochrom gebildet wird. Die lipophile Kohlenwasserstoffkette löst sich in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Dies führt zu einer festen Bindung. Verwendet wird PKH 26 zur Markierung von Phagozyten und Erythrozyten [Horan et al. 1990], Lymphozyten [Ashley et al. 1993; Khalaf et al. 1993; Samlowski et al. 1991], Endothelzellen [Messina et al. 1992], Bakterien [Raybourne und Bunning 1994], Neuronen und Gliazellen [Haas et al. 2000], Hepatozyten [Bruns et al. 2005], Knochenmarkstammzellen [Matsunuma et al. 2006] und Myoblasten [Strasser et al.

2004]. Samlowski et al. [1991] zeigen, dass eine Langzeitmarkierung von Leukozyten mit PKH 26 keine Auswirkungen auf die Zellvitalität hat. Ashley et al. [1993] ermitteln die Vitalität von PKH 26-gefärbten Leukozyten, indem sie die Summe der Zellen mit der mittleren Fluoreszenz der Zellen vergleichen und dadurch ein Maß für die gesamte Fluoreszenz (100 %) am Anfang der Kultur und zu bestimmten Zeitpunkten erhalten, die sich nur verringert, wenn durch Zelltod Zellen ausgeschieden werden.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [Wiedemann et al. 2008] zur Stabilität von PKH 26 bei markierten Urothelzellen *in vitro* zeigt, dass es mit zunehmender Zellpassage zu einer Abnahme PKH 26-positiver Zellen kommt. Es ist durch diese Untersuchungen davon auszugehen, dass bei der Zellteilung jede Tochterzelle Anteile des Markers PKH 26, der in der Membran der Elternzelle verankert ist, bekommt. Boutonnat et al. [1998] verwenden nicht-proliferierende periphere Blutzellen, um die Stabilität der Markierung mit PKH 26 zu testen. Sie zeigen, dass sich die PKH 26-Fluoreszenz nach sechs Tagen Kulturdauer nicht signifikant von der Fluoreszenz von Tag Null unterscheidet.

Haas et al. [2000] können PKH 26-markierte transplantierte Nervenzellen noch nach vier Monaten nachweisen, allerdings proliferieren Nervenzellen nicht *in vivo*. Matsunuma [2006] detektieren noch nach 14 Tagen PKH 26-markierte Knochenmarkzellen und Bruns et al. [2005] gefärbte Leberzellen nach sieben Tagen. Die Arbeitsgruppe von Dell'Accio et al. [2002] weisen PKH 26-markierte Chondrozyten bis zu 98 Tage nach Implantation *in vivo* nach.

In unseren Untersuchungen können bei den Langzeitversuchen im syngenen Tiermodell mit bis zu 163 Tagen noch immer mit PKH 26 markierte transplantierte Zellen im zu untersuchenden Gewebe gefunden werden.

In Anbetracht der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen *in vitro* und der Ausprägung der entsprechenden Marker in der Immunocytochemie, sind für eine mögliche Transplantation Zellen in Passage drei am besten geeignet. Dies gilt für Zellen, die in Passage eins mit 5-Aza exprimiert werden. In den späteren Passagen verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit wie oben erwähnt deutlich und auch die Ausprägung der entsprechenden Marker nimmt ab.

Bei einer Injektion von Zellen, die nicht mit 5-Aza behandelt werden, sind die Zellen aus Passage eins und zwei die geeignetsten. Ab Passage drei verlieren die Zellen ihre glatt- bzw. skelettmuskuläre Ausprägung in vitro.

Für die Injektion von MSZ in niedrigen Passagen ist nach unseren Untersuchungen keine Exposition mit 5-Aza notwendig. Für eine persistierende Expression der glattmuskulären und skelettmuskulären Marker in den höheren Passagen ab P3 ist allerdings eine Differenzierung mit 5-Aza erforderlich. Im Hinblick auf eine Applikation beim Menschen oder beim Tier ist von Vorteil, dass 5-Aza als Therapeutikum (Vidaza[®]) für die Klinik zugelassen ist.

5.6 Behandlung der Belastungsinkontinenz

Konventionelle chirurgische Techniken zur Therapie der Belastungsinkontinenz beim Menschen wie die Kolposuspensionstechnik und die Slingmethoden haben Heilungsraten von ca. 80 % innerhalb des ersten Jahres. Bei der Kolposuspensionstechnik kommt es gewöhnlich zu einer Abnahme der Kontinenzrate innerhalb von fünf Jahren auf 82 % [Alcalay et al 1995; Bergman und Elia 1995] und nach 10 Jahren auf 55-59 % [Kjohede und Ryden 1994; Alcalay et al. 1995]. Die Slingmethoden haben die gleichen Ergebnisse wie die Kolposuspensionstechnik. Allerdings gibt es bei diesen Methoden weniger Informationen über die Langzeitentwicklung [Norton und Brubaker 2006]. Injektionen von Teflon oder Silikon haben eine deutlich geringere Heilungsrate von ca. 50 % [Chapple et al. 2005; Norton und Brubaker 2006] und sind durch Nebenwirkungen wie Teilchenwanderung, Entstehung von Granulomen und Fettembolien [Kershen et al. 2002] gekennzeichnet. In einem Versuch mit Hunden wird ebenfalls die Wanderung von Silikon nach periurethraler Injektion als Therapieform der Inkontinenz beobachtet [Henly et al. 1995]. In Hinblick auf die begrenzte Effektivität und die Nebenwirkungen der momentanen Therapien sind neue Behandlungsmethoden wünschenswert.

5.6.1 Neue, zellbasierte Therapieformen

In den letzten Jahren werden die Möglichkeiten des Tissue Engineering in der Urologie erforscht. Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Partridge et al. [1978 und

1989] im Tiermodell mit Mäusen weiß man, dass nach einer Injektion von Muskelvorläuferzellen in sich regenerierende Muskulatur, diese Vorläuferzellen mit den Myofibrillen des Empfängertieres fusionieren. 1994 wird aus der Arbeitsgruppe von Atala die Verwendung von kultivierten autologen Chondrozyten zur Behandlung der Belastungsinkontinenz beschrieben. Atala et al. [1994] entnehmen im Schweinmodell Chondrozyten an der Ohroberfläche, kultivieren diese und injizieren die Zellen in Alginat als Trägermaterial in die suburethrale Region. Mittels Zystographie kann ein verminderter Reflux nach Chondrozyteninjektion belegt werden. Am Ende des Versuchszeitraumes nach zwei, vier, sechs, und 12 Wochen werden die Zellen histologisch wiedergefunden. Die Bildung von Knorpelgewebe ist in 34 von 36 Fällen zu sehen. Die Autoren sehen keine Migration des injizierten Materials. Das injizierte Volumen bleibt am Injektionsort konstant und es werden auch keine immunologischen Reaktionen mit dem umliegenden Gewebe beobachtet. Auch in unseren Tiermodellen ist die Bildung von Zellnestern ersichtlich und die Zellen werden über den gesamten Versuchszeitraum im Blasengewebe wiedergefunden. Diese Daten belegen das Konzept zellbasierter Therapieformen.

Chancellor et al. [2000] zeigen in einem Rattenmodell, dass Myoblasten von diesen Ratten, die in die Urethra und die Blase injiziert werden, überleben und in Myotuben differenzieren. Die Bildung von Myotuben veranlasst die Gruppe um Chancellor die Hypothese aufzustellen, dass die Myoblasteninjektion eine mögliche Therapieform der Belastungsinkontinenz sein könnte. Um die Verteilung und Variabilität der injizierten Myoblasten nachverfolgen zu können, werden diese mit einem speziellen β -Galaktosidasegen und mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Um Entzündungsreaktionen zu vermeiden, werden die Tiere nach drei bis vier Tagen getötet und die Gewebe entnommen. In unseren beiden Tiermodellen werden nicht nur in den Kurzzeitversuchen sondern auch in den Langzeitversuchen bis zu 163 Tagen keine Entzündungsreaktionen gesehen. Auch die Hämatoxylin-Färbung zeigt in den histologischen Schnitten keine Leukozyteneinwanderung im Bereich der injizierten Zellen. Dies belegt die Möglichkeit einer Injektion von Zellen ohne das Risiko von immunologischen Abstoßungsreaktionen.

Aufgrund ihrer positiven Ergebnisse führt die Arbeitsgruppe um Chancellor die Methode beim Menschen durch. Sie injizieren muskuläre Vorläuferzellen transurethral oder periurethral in die Urethra. Nach einer mittleren Beobachtungszeit

von 16,5 Monaten wurden bei fünf der acht behandelten Frauen Verbesserungen der Inkontinenz beobachtet, wobei eine Patientin vollständig kontinent war. Bei zwei Patientinnen zeigt sich eine Verbesserung der Belastungsinkontinenz nach einer zweiten Injektion vier bis acht Monate nach der ersten Stammzellinjektion. Zystoskopisch kann ein Jahr nach Injektion keine Gewebeveränderung der Urethra dargestellt werden [Carr et al. 2008].

Yokoyama et al. [2001] injizieren Skelettmuskelursprungszellen von Mäusen in den unteren Harntrakt von Mäusen. Es wird überprüft, ob diese Zellen nach fünf, 35 und 70 Tagen wieder zu finden sind und sich in Myotuben und Myofibrillen differenzieren. Nach einem Monat stellt die Arbeitsgruppe fest, dass sich beinahe alle Skellettmuskelursprungszellen in Myotuben oder Myofibrillen differenzieren. In unseren Versuchen kann nach Injektion von hMSZ wie auch mMSZ keine Differenzierung zu skelettmuskulären Zellen in vivo durch immunhistochemische Untersuchungen nachgewiesen werden. Möglicherweise da die Zellen in glattmuskuläres Gewebe integriert sind. Bei den In-vitro-Untersuchungen ist der Transkriptionsfaktor MyoD bei den gegenüber 5-Aza exponierten mMSZ bei weniger als einem Prozent der untersuchten Zellen positiv. In den nicht gegenüber 5-Aza exponierten Zellen wird kein MyoD nachgewiesen. Im xenogenen Tiermodell gibt es bei den gegenüber 5-Aza exponierten humanen Zellen in den Passagen zwei bis sechs im Durchschnitt bei 81,1 % der Zellen einen positiven Nachweis der MyoD-Expression. In den nativen hMSZ können nur in der Primärkultur und in der ersten Passage eine MyoD-Expression mit 82,7 % im Durchschnitt gefunden werden. Yokoyama et al. [2001] beschreiben, dass Myotuben postmitotisch aufhören zu wachsen und deshalb nicht zu tumorösen Entartungen oder Obstruktionen führen können. Diese Daten können in unseren Untersuchungen bestätigt werden, da weder in vivo bei Entnahme der Blase noch bei der histologischen Auswertung der Blasen Obstruktionen des Blasenlumens oder tumoröse Umfangsvermehrungen im Bereich der injizierten Zellen gefunden werden.

Einen ähnlichen Ansatz wählen auch Yiou et al. [2002]. Der neue Therapieansatz für die Behandlung der Belastungsinkontinenz wird ebenfalls in einem Rattenmodell untersucht. Die Arbeitsgruppe entnimmt skelettmuskuläre Vorläuferzellen aus den Gliedmaßen, markiert sie mit PKH 26 und injiziert diese Zellen in den urethralen Sphinkter desselben Tieres. Der Sphinkter wird zuvor mittels Injektion einer

myotoxischen Substanz (Netexin) zerstört. Nach sieben Tagen bzw. einem Monat werden die Tiere getötet. Durch die PKH 26-Markierung können die Zellen bis zu einem Versuchszeitraum von einem Monat im injizierten Gebiet wieder gefunden werden. Die injizierten Zellen haben sich gut in das umliegende Gewebe integriert. Eine gute Integration in das Zielgewebe können wir mit unseren Untersuchungen bestätigen. Schon im Kurzzeitversuch nach zwei Tagen können wir in den histologischen Schnitten eine gute Integration der Zellen beobachten. Ab einer Versuchsdauer von 58 Tagen kommt es in unserem syngenen Tiermodell zu einer Verteilung der Zellen im Blasengewebe. Die Arbeitsgruppe von Yiou et al. [2002] findet in der experimentellen Gruppe mit Muskelvorläuferzellen am Tag sieben eine Vergrößerung des Durchmessers der Myofibrillen und eine größere Anzahl von neu gebildeten Myofibrillen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach einem Monat werden sowohl in deren Kontrollgruppen als auch in experimentellen Gruppen wieder die gleichen Werte der Durchmesser der Myofibrillen gemessen wie vor der Zerstörung des urethralen Sphinkters. Daraus folgert die Arbeitsgruppen, dass die Regeneration des Sphinkters ca. einen Monat andauert und durch die Injektion von Muskelvorläuferzellen beschleunigt wird.

Cannon et al. [2003] untersuchen ebenfalls die Injektion von allogenen Muskelvorläuferzellen ($1-1,5 \times 10^6$) in einer denervierten Rattenurethra. Trotz Denervierung kann nach Applikation der Muskelvorläuferzellen eine Muskelkontraktion mit einem Wert von ca. 87 % der physiologischen Ausprägung erzielt werden. Immunhistochemisch wird eine große Anzahl von skelettmuskulären Fasern an der Injektionsstelle nachgewiesen.

Als weiterer Therapieansatz zur Behandlung von Belastungsinkontinenz wird in einem Schweinmodell von Strasser et al. [2004] den Tieren eine Skelettmuskelbiopsie entnommen, daraus im Labor autologe Myoblasten und Fibroblasten isoliert und dann vermehrt. Die Zellen werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH 26 markiert und anschließend Ultraschall-gezielt in den Rhabdosphinkter bzw. die Harnröhre problemlos injiziert. Bei größeren Tieren ist diese Technik sehr gut durchzuführen. In Rattenversuchen allerdings ist diese Technik aufgrund der Größe der Tiere nur sehr erschwert anzuwenden. Da wir nicht

die Applikationstechnik untersuchen, sondern die Integration und das Überleben applizierter Zellen, entschieden wir uns, die Zellen offen-operativ direkt in den Blasenboden zu spritzen. Strasser et al. [2004] können in ihren histologischen Untersuchungen wie auch wir zeigen, dass die Zellen die Versuchsdauer von bis zu ca. 23 Wochen überleben. Allerdings wird nichts über die Anzahl der wieder gefundenen Zellen berichtet. Histologisch können die Autoren neu gebildete Muskelfasern nachweisen. Bei der Messung der Urethradruckprofile zeigt sich, dass sich die Harnröhrenverschlussdrücke postoperativ um durchschnittlich 41 % gesteigert haben. Diese Messungen werden in unserem Rattenmodell aufgrund der Größe der Tiere nicht durchgeführt. Möglicherweise könnte der Harnröhrenverschlussdruck in unserem Modell aber durch die Injektion der Kanüle in den Sphinkter gestiegen sein.

Dieselbe Arbeitsgruppe [Mitterberger et al. 2007b] untersucht die dosisabhängigen Veränderungen nach der Injektion von unterschiedlichen Anzahlen an Myoblasten aus einer Muskelbiopsie in den Rhabdosphinkter weiblicher Schweine. Die Zellzahlen, die Ultraschall-gezielt injiziert werden, liegen zwischen $1,5 \times 10^6$ und $7,8 \times 10^7$. In der histologischen Aufarbeitung werden für alle injizierten Konzentrationen Zellen nachgewiesen. Dieser Befund deckt sich mit unseren Ergebnissen, wonach PKH 26-markierte Zellen gut im Zielgewebe wieder zu finden sind. Ferner wird über keinerlei Entzündungen, Infektionen oder Narbenbildungen im Bereich der injizierten Zellen berichtet. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls mit unseren Daten, wonach selbst im xenogenen Tiermodell in den immunsupprimierten Tieren keine derartigen Veränderungen beobachtet werden.

Die Anzahl der Zellen, die wir sowohl im syngenem als auch im xenogenem Tiermodell injizieren, liegt bei $1,0 \times 10^6$ Zellen in 40 μ l Medium pro Tier. Dies ist in Anbetracht der kleinen Tiere und des kleinen Blasenhalses völlig ausreichend. Mitterberger et al. [2007b] beschreiben ein Anwachsen urethraler Verschlussdrücke und eine deutlich größere Anzahl von neu gebildeten muskulären Fasern mit wachsenden Zellzahlen.

Die Arbeitsgruppe um Strasser und Mitterberger [Strasser et al. 2007a und 2007b; Mitterberger et al. 2007a] stellt als erste klinische Ergebnisse nach Injektion von Myoblasten und Fibroblasten zur Behandlung der Belastungsinkontinenz beim Menschen vor. Strasser et al. [2007a und 2007b] veröffentlichen in ihrer Studie das

Ergebnis von 91 Patienten nach der Behandlung ihrer Belastungsinkontinenz. Von diesen 91 Patienten werden 63 Patienten (42 Frauen und 21 Männer) mit autologen Myoblasten und Fibroblasten behandelt die aus Skelettmuskelbiopsien aus dem Oberarm entnommen, kultiviert und vermehrt werden und anschließend Ultraschallgezielt in die urethrale Submukosa (Fibroblasten) bzw. in den Rhabdosphinkter (Myoblasten) injiziert werden. Die restlichen 28 Patienten (21 Frauen und 7 Männer) bekommen die herkömmliche Behandlung mit einer endoskopischen Injektion von Kollagen. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten ist die Harninkontinenz bei 50 (39 Frauen und 11 Männer) der Patienten die mit autologen Myoblasten und Fibroblasten behandelt sind, geheilt, während nur zwei weibliche Patienten nach der Kollageninjektion komplett geheilt sind. In Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen führt auch das schon klinisch angewandte Modell dieser Arbeitsgruppe zu keinen Obstruktionen im Harntrakt. Der Harnabfluss ist nicht beeinträchtigt durch die Injektion der Zellen. Die Arbeitsgruppe berichtet über weitere Ergebnisse bei 119 weiblichen Patienten [Mitterberger et al. 2007a], denen mit der gleichen Methode [Strasser et al. 2007a und 2007b] aus dem Oberarm autologe Myoblasten und Fibroblasten entnommen werden und nach Vermehrung Ultraschallgezielt in die urethrale Submukosa (Fibroblasten) bzw. in den Rhabdosphinkter (Myoblasten) injiziert werden. Alle Patientinnen leiden unter einer per Urodynamik bestätigten Belastungsinkontinenz, die mit einer geringgradigen Hypermobilität der Urethra oder der Harnblase oder einer Insuffizienz des inneren Sphinkters einhergeht. Ein Jahr nach der Myoblasteninjektion sind 79 % der Patientinnen komplett kontinent, 13 % berichten über eine starke Verbesserung der Inkontinenz und bei 8 % der Patientinnen zeigt sich nur eine geringe Verbesserung.

Wie diese Zahlen andeuten, kann diese Behandlungsmethode eine neue effektive Möglichkeit zur Heilung der Inkontinenz in der Humanmedizin und Tiermedizin sein. Das Problem bei der Studie von Mitterberger et al. [2007a] ist, dass alle Patientinnen vor der Injektion Beckenbodengymnastik und nach der Injektion transvaginale Elektrostimulation zur Verbesserung der Kontinenz bekommen. Darüber hinaus wird bei der Injektion der Fibroblasten als Trägersubstanz Kollagen verwendet. Es ist deshalb nicht erwiesen, dass eine Verbesserung der Kontinenz allein durch die injizierten Fibroblasten und Myoblasten erreicht wird. Sievert und Stenzl [2007d] loben die Arbeit von Strasser et al. [2007a und 2007b] als einen der größten Erfolge

in der rekonstruktiven Urologie im letzten Jahrzehnt. Sie merken aber an, dass mit spermatogonalen Stammzellen die darüber hinaus noch leichter zu gewinnen sind, eventuell noch bessere Erfolge erzielt werden könnten.

Nach einem Bericht von Lubbaddeh [2008] und Niederer [2008] wird Strasser vorgeworfen, dass seine Studien gravierende Mängel aufweisen und er keine ausreichenden Genehmigungen für seine Versuche bei der zuständigen Ethikkommission eingeholt habe. Es handle sich um eine „virtuelle Studie“, die nachträglich über die Daten von Patienten gestülpt worden sei. Die in die Kritik geratene Publikation von Strasser et al. [2007b] ist von der britischen Fachzeitschrift „Lancet“ im September 2008 zurückgezogen worden [Kleinert und Horton 2008].

Otto et al. [2008] zeigt eine erfolgreiche RepARATION der Sphinkter-Funktion nach Injektion von skelettmuskulären Stammzellen. Die Stammzellen werden aus dem linken M. deltoideus von männlichen Patienten entnommen. Es werden 43 Patienten untersucht, bei denen ein iatrogener Sphinkterdefekt vorliegt. Alle 43 Patienten haben eine Inkontinenz Grad III. Die entnommenen Stammzellen werden kultiviert und im Durchschnitt 61 Tage nach Biopsieentnahme wieder endoskopisch in den Sphinkter injiziert. Nach durchschnittlich einem Jahr post injektionem sind vier Patienten komplett kontinent. Bei 19 Patienten wird eine Verbesserung zu Inkontinenz Grad I erzielt. Bei 20 Patienten kommt es allerdings zu keiner Verbesserung der Inkontinenz.

Wichtig für die Tiermedizin kann eine aktuelle Arbeit von Eberli et al. [2008] sein, in der bei Hunden allogene Muskelvorläuferzellen in der Region des Sphinktermuskels injiziert werden. Der Sphinkter ist vier Wochen zuvor mikrochirurgisch entfernt worden. Sechs Monate nach Injektion der Zellen steigt der Sphinkter-Druck wieder auf ungefähr 80 % des ursprünglichen Wertes an, während der Druck bei den Tieren, bei denen keine Zelinjektion vorgenommen wird, auf ungefähr 20 % des ursprünglichen Wertes abfällt. Histologisch können ein Überleben der Zellen nachgewiesen und in der Region des Sphinkters neu gebildete, innervierte Muskelfasern gesehen werden.

5.7 Fazit und Ausblick

In unseren Versuchen wird die Möglichkeit einer kausalen Behandlung mittels MSZ als neue Therapieform der Belastungsinkontinenz dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass die dafür notwendigen Stammzellen mit geringem Aufwand isoliert werden können und sich anschließend im Zellkulturlabor bis zu den notwendigen Zellzahlen vermehren.

Nach der Injektion der Stammzellen in den Blasenhalss der Ratten können wir ein Überleben der Zellen, eine gute Integration in das umgebende Muskelgewebe und in den Langzeitversuchen bei einzelnen Tieren eine Verteilung der Zellen im gesamten Blasensphinkter beobachten. Entzündungsreaktionen werden nicht nachgewiesen. Dieser Ansatz wird in der Humanmedizin bereits zur Behandlung der Belastungsinkontinenz eingesetzt [Otto et al. 2006; Strasser et al. 2007a und 2007b]. Nach einer aktuellen Veröffentlichung [Eberli et al. 2008] scheint auch ein Einsatz in der Tiermedizin in greifbare Nähe gerückt.

Vor einem Einsatz in der Klinik ist allerdings im Großtiermodell die Wirksamkeit der injizierten Stammzellen bei vorhandener Inkontinenz mittels urodynamischer Messungen und histologischer Untersuchungen zu belegen.

Vor der Therapie der Sphinkterinkompetenz in der Tiermedizin ist zu prüfen, inwieweit es möglich ist, beim Hund Stammzellen zu gewinnen, anschließend im Labor zu vermehren und dann mittels eines minimalinvasiven Eingriffs in den Blasensphinkter zu injizieren.

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen könnte der eingeschlagene Weg in der Humanmedizin bei leichten Formen der Belastungsinkontinenz und in der Tiermedizin bei der Sphinkterinkompetenz die Möglichkeit einer Restitutio ad integrum bieten.

6. Zusammenfassung

Belastungsinkontinenz wird durch morphologische und funktionale Defekte des Harnblasensphinkters durch Operationen oder vaginale Geburten sowie durch eine mit dem Lebensalter korrelierte Abnahme von Zellen des Rhabdosphinkters infolge physiologischer Apoptose verursacht. Mesenchymale Stammzellen (MSZ) haben das Potential, in Muskelzellen zu differenzieren. Sie sind deshalb für eine zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz von Interesse. Das Ziel der Studie sind Untersuchungen an murinen MSZ (mMSZ) und humanen MSZ (hMSZ) aus dem Knochenmark zur myogenen Differenzierung *in vitro* und zur Integration von in den Blasenhalss transplantierten MSZ bzw. hieraus differenzierten Muskelzellen in einem syngenem und xenogenem Rattenmodell.

Nach Isolierung von mMSZ aus dem Knochenmark durch Plastikadhärenz werden diese in Passage (P) 1 für die Induktion myogener Zellen 24 Stunden gegenüber 5-Azacytidin (5-Aza) exponiert. Zellen in P2 und P3 werden mit monoklonalen Antikörpern auf die Expression myogener Marker immunocytochemisch untersucht. Glattmuskuläres alpha-Aktin (Klon 1A4) ist in 50-90 % und alpha/gamma-Aktin (Klon CGA7) in 20 % der Zellen exprimiert. Der Nachweis skelettmuskulärer Marker ergibt mit einem Antikörper gegen MyoD (Klon MoAb5.8A) eine Reaktion in einzelnen Zellen. Die Expression von Myosin (Klon NOQ 7.5.4D) kann nicht nachgewiesen werden. Somit werden mMSZ bei einer Exposition gegenüber 5-Aza *in vitro* insbesondere in glattemuskuläre Zellen differenziert. Die Kontrollen zeigen eine vergleichbare Expression der myogenen Marker. Für den Nachweis *in vivo* werden die zur myogenen Differenzierung behandelten mMSZ mit dem Vitalfarbstoff PKH 26 markiert und direkt in den Blasenhalss der Versuchstiere gespritzt. Die Integration wird nach 2, 58, 65, 135 und 163 Tagen histologisch und immunhistochemisch mit den gleichen Antikörpern wie in der Immunocytochemie untersucht. Die transplantierten Zellen kann für jeden Versuchszeitpunkt nachgewiesen werden. In einzelnen Tieren kann nach 58 Tagen auch eine gleichmäßige Verteilung im Blasenhalssgewebe festgestellt werden. In den Gewebeschnitten von drei Ratten kann ein glattemuskulärer Phänotyp den injizierten

Zellen zugeordnet werden. Entzündungsreaktionen und Tumorbildungen werden nicht beobachtet.

Nach Isolierung von hMSZ aus dem Knochenmark durch Plastikadhärenz werden konfluente Kulturen in P1 für 24 Stunden mit 5-Aza differenziert. Die Expression von glattmuskulärem alpha-Aktin und alpha/gamma-Aktin sowie skelettmuskulärem MyoD und Myosin wird immunocytochemisch in P2 bis P6 und in unbehandelten Kontrollen in P0 bis P6 untersucht. Für den Nachweis der direkt in den Blasen Hals immundefizienter Nacktratten injizierten hMSZ werden diese direkt vor der Applikation ebenfalls mit PKH 26 markiert. Die Integration in das Zielgewebe wird nach 56 Tagen und bei den Kontrollen mit nativen hMSZ auch nach 4, 8, 12 und 28 Tagen histologisch überprüft und die integrierten hMSZ immunologisch charakterisiert. Die Histologie zeigt gut abgrenzbare Gruppen transplantierte Zellen in den Geweben des Blasen Halses über den gesamten Versuchszeitraum. Entzündungsreaktionen und tumoröse Entartungen werden nicht nachgewiesen. Glattmuskuläres alpha-Aktin und alpha/gamma-Aktin sowie skelettmuskuläres MyoD werden in nicht gegenüber 5-Aza exponierten MSZ in P0 in 62 %, 60 % bzw. 73 % und in P1 in 94 %, 100 % bzw. 92 % nachgewiesen; in P2 bis P6 ist nur noch alpha-Aktin exprimiert (65-84 %). Hingegen zeigen gegenüber 5-Aza exponierte hMSZ für diese Marker einheitliche Expressionsmuster in P2 bis P6 mit einem Nachweis von alpha-Aktin in 86-97 %, alpha/gamma-Aktin in 81-100 % und MyoD in 63-100 % der Zellen. Skelettmuskuläres Myosin ist in beiden Gruppen nicht nachweisbar. In der Immunhistochemie der Präparate können muskuläre Antigene nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur Differenzierung von hMSZ aus dem Knochenmark in glatte- und Skelettmuskelzellen zeigen, dass eine Exposition gegenüber 5-Aza nicht notwendig ist. Allerdings ist sie für eine dauerhafte Expression in vitro erforderlich.

Die Tiermodelle unterstreichen die Verwendung autologer MSZ für die Behandlung der Belastungsinkontinenz beim Menschen und ebenso auch beim Tier. In weiteren Studien werden die myogene Differenzierung in vivo und die Integration in den Rhabdosphinkter in einem xenogenen Großtiermodell genauer erforscht wobei auch Untersuchungen zur Verbesserung der Sphinkterfunktion durchgeführt werden.

7. Summary

Urinary incontinence is caused by morphological and functional defects of the sphincteric muscle, which are a result of surgery, vaginal birth, as well as an age-dependent decline of rhabdosphincter cells caused by physiological apoptosis. Mesenchymal stem cells (MSC) have the potential to differentiate into muscle cells. Therefore, they are of interest for a cell-based therapy of urinary incontinence. The aim of this study is to examine myogenic differentiation in vitro of bone marrow-derived murine MSC (mMSC) and human MSC (hMSC) and the integration of the MSC or therefrom differentiated muscle cells transplanted into the bladder neck in a syngenic and xenogenic rat model.

Bone marrow-derived mMSC are isolated by plastic adherence. To induce myogenic differentiation mMSC in culture passage (P) 1 are exposed for 24 hours to 5-azacytidin (5-Aza). Cells in P2 and P3 are examined by immunocytochemistry with monoclonal antibodies for the expression of myogenic markers. Smooth muscle alpha-actin (clone 1A4) is identified in 50-90 %. Smooth muscle alpha/gamma-actin (clone CGA7) is expressed in 20 % of the cells. The detection of skeletal muscle antigen with an antibody against skeletal muscle MyoD (clone MoAb5.8A) results in a reaction in individual cells. The expression of skeletal slow muscle myosin (clone NOQ 7.5.4D) can not be detected. Therefore, the mMSC are differentiated particularly in smooth muscle cells by exposure to 5-Aza in vitro. The controls revealed a similar expression pattern of the myogenic markers. For the verification in vivo the mMSC treated for myogenic differentiation are marked with PKH 26, a red fluorescent cell linker, and injected directly into the bladder neck of the experimental animals. The integration is examined histologically after 2, 58, 65, 135, and 163 days. The rats' bladders are examined histologically and immunohistochemically, using the same antibodies as in immunocytochemistry. The transplanted cells can be detected for every given point in time throughout the experiment. After 58 days it is also possible to detect an even distribution in the bladder neck tissue of individual animals. In the bladder neck tissue of three rats a smooth muscle phenotype can be allocated to the injected cells. There is neither inflammation nor tumourous malformation in the target tissue.

Bone marrow-derived hMSC are isolated by the method of plastic adherence. Confluent cultures in P1 are differentiated with 5-Aza for 24 hours. The expression of smooth muscle alpha-actin and alpha/gamma-actin, as well as skeletal muscle MyoD and myosin is examined immunocytochemically in P2 to P6 and in untreated controls in P0 to P6. For the detection of the directly injected hMSC into the bladder neck of athymic nude rats, the cells are also marked with PKH 26 prior to the injection. The integration into the host tissue is examined histologically after 56 days, whereas the controls with native hMSC are also examined after 4, 8, 12, and 28 days. The integrated hMSC are characterised immunohistologically. The histology shows well-defined groups of transplanted cells in the bladder neck tissue over the entire period of the experiment. Inflammation or tumourous tissue are not found. Smooth muscle alpha-actin and alpha/gamma-actin as well as skeletal muscle MyoD is detected in MSC not exposed to 5-Aza in P0 in 62 %, 60 % and 73 %, respectively of the cells and is detected in P1 in 94 %, 100 %, and 92 %, respectively of the cells. In P2 to P6 only alpha-actin is expressed (65-84 %). However, hMSC exposed to 5-Aza show a consistent expression pattern from P2 to P6 with a verification of alpha-actin in 86-97 %, alpha/gamma-actin in 81-100 %, and MyoD in 63-100 % of the cells. Skeletal muscle myosin is not detected in both groups. In the immunohistochemistry for the histological specimens, there is no explicit evidence for muscular antigens. The examination, that is carried out in order to differentiate bone marrow-derived hMSC into smooth muscle and skeletal muscle cells shows, that an exposure to 5-Aza is not necessary. However, it is found that an exposure to 5-Aza is essential for a permanent expression in vitro.

The animal models highlight the use of autologous MSC for treating urinary incontinence in human beings, as well as in animals. Further studies will investigate the myogenic differentiation in vivo and the integration into the rhabdosphincter in a xenogenic large animal model. In conducting such further studies an examination into the improvement of the function of the sphincteric muscle will be a key component.

8. Literaturverzeichnis

Abrams P., Blaivas J. G., Stanton S. L. und Andersen J. T., The standardisation of terminology of lower urinary tract function. The International Continence Society Committee on Standardisation of Terminology. Scand J Urol Nephrol Suppl. 1988; 114:5-19.

Abrams P., Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity. Urology. 2003; 62(5 Suppl 2):28-37; discussion 40-2.

Abrams P., Cardozo L., Fall M., Griffiths D., Rosier P., Ulmsten U., Van Kerrebroeck P., Victor A., Wein A. und Standardisation Sub-Committee of the International Continence Society, The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. Urology. 2003; 61(1):37-49.

Alcalay M., Monga A. und Stanton S. L., Burch colposuspension: a 10–20 year follow up. Br J Obstet Gynaecol. 1995; 102(9):740-5.

Alison M. und Sarraf C., Hepatic stem cells. J Hepatol. 1998; 29(4):676-82.

Anderson D. J., Gage F. H. und Weissman I. L., Can stem cells cross lineage boundaries? Nat Med. 2001; 7:393-5.

Arbeiter K., Harnblaseninkontinenz nach der Ovariohysterektomie bei der Hündin. Kleintierpraxis. 1986; 31:215-22.

Arnold S., Arnold P., Hubler M., Casal M. und Rüschi P., Incontinentia urinae bei der kastrierten Hündin: Häufigkeit und Rassedisposition. Schweiz Arch Tierheilkd. 1989a; 131(5):259-63.

Arnold S., Jäger P., DiBartola S. P., Lott-Stolz G., Hauser B., Hubler M., Casal M., Fairburn A. und Rüschi P., Treatment of urinary incontinence by endoscopic injection of teflon. *J Am Vet Med Assoc.* 1989b; 195(10):1369-74.

Arnold S., Urinary incontinence in castrated bitches. 2. Diagnosis and treatment. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1997a; 139(7):319-24.

Arnold S., Inkontinenz bei kastrierten Hündinnen. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1997b; 139(6):271-6.

Ashley D. M., Bol S. J., Waugh C. und Kannourakis G., A novel approach to the measurement of different in vitro leukaemic cell growth parameters: the use of PKH GL fluorescent probes. *Leuk Res.* 1993; 17(10):873-82.

Atala A., Kim W., Paige K. T., Vacanti C. A. und Retik A. B., Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol.* 1994; 152(2 Pt 2):641-3; discussion 644.

Atala A., Tissue engineering for bladder substitution. *World J Urol.* 2000; 18(5):364-70.

Atala A., Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res.* 2004; 7(1):15-31.

Atala A., Stem Cells - Brave new World? *J Urol.* 2005; 174(6):2085.

Atala A., Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(2):83-96.

Baessler K. und Schuessler B., Childbirth-induced trauma to the urethral continence mechanism: review and recommendations. *Urology.* 2003; 62(4 Suppl 1):39-44.

Baksh D., Davies J. E. und Zandstra P. W., Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. *Blood*. 2005; 106(9):3012-9.

Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R. und Quarto R., Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*. 2000; 28:707-15.

Barry F., Boynton R. E., Liu B. und Murphy J. M., Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001; 268(2):189-200.

Bartsch G., Yoo J. J., De Coppi P., Siddiqui M. M. Schuch G., Pohl H. G., Fuhr J., Perin L., Soker S. und Atala A., Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*. 2005; 14(3):337-48.

Bergman A. und Elia G., Three surgical procedures for genuine stress incontinence: five-year follow-up of a prospective randomized study. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173(1):66-71.

Berry F. P. und Murphy J. M., Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4):568-84.

Bhagavati S. und Xu W., Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318(1):119-24.

Bieback K., Kern S., Klüter H. und Eichler H., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22(4):625-34.

Blanpain C., Lowry W. E., Geoghegan A., Polak L. und Fuchs E., Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004; 118(5):635-48.

Blendinger C., Blendinger K. und Bostedt H., Die Harninkontinenz nach Kastration bei der Hündin 2. Mitteilung: Therapie. *Tierarztl Prax*. 1995; 23(4):402-6.

Boutonnat J., Barbier M., Rousselle C., Muirhead K. A., Mousseau M., Seigneurin D. und Ronot X., Usefulness of PKHs for studying cell proliferation. *C R Acad Sci III*. 1998; 321(11):901-7.

Braun T., Bober E., Buschhausen-Denker G., Kohtz S., Grzeschik K. H. und Arnold H. H., Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J*. 1989; 8(12):3617-25.

Bruder S. P., Jaiswal N. und Haynesworth S. E., Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64:278-294.

Bruder S. P., Kraus K. H., Goldberg V. M. und Kadiyala S., The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; 80(7):985-96.

Bruns H., Kneser U., Holzhüter S., Roth B., Kluth J., Kaufmann P. M., Kluth D. und Fiegel H. C., Injectable liver: a novel approach using fibrin gel as a matrix for culture and intrahepatic transplantation of hepatocytes. *Tissue Eng*. 2005; 11(11-12):1718-26.

Bump R. C. und Norton P. A., Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1998; 25(4):723-46.

Bushby P. A. und Hankes G. H., Sling urethroplasty for the correction of urethral dilation and urinary incontinence. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1980; 16:115-8.

Buzelin J. M., Female urinary incontinence. Which assessments? Which treatment? *Ann Urol (Paris)*. 1998; 32(2):83-8.

Cannon T. W., Lee J. Y., Somogyi G., Pruchnic R., Smith C. P., Huard J. und Chancellor M. B., Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology*. 2003; 62(5):958-63.

Cao F., Lin S., Xie X., Ray P., Patel M., Zhang X., Drukker M., Dylla S. J., Connolly A. J., Chen X., Weissman I. L., Gambhir S. S. und Wu J. C., In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 2006; 113(7):1005-14.

Caplan A. I., Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*. 1991; 9(5):641-50.

Caplan A. I., The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994; 21(3):429-35.

Caplan A. I. und Dennis J. E., Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; 98(5):1076-84.

Carr L. K., Steele D., Steele S., Wagner D., Pruchnic R., Jankowski R., Erickson J., Huard J. und Chancellor M. B., 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008; 19(6):881-3.

Cassiede P., Dennis J. E., Ma F. und Caplan A. I., Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*. 1996; 11(9):1264-73.

Chamberlain G., Fox J., Ashton B. und Middleton J., Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007; 25(11):2739-49.

Chancellor M. B., Yokoyama T., Tirney S., Mattes C. E., Ozawa H., Yoshimura N., de Groat W. C. und Huard J., Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. *Neurourol Urodyn.* 2000; 19(3):279-87.

Chapple C. R., Wein A. J., Brubaker L., Dmochowski R., Pons M. E., Haab F. und Hill S., Stress incontinence injection therapy: what is best for our patients? *Eur Urol.* 2005; 48(4):552-65.

Chen L., Tredget E. E., Wu P. Y. und Wu Y., Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE.* 2008; 3(4):e1886.

Christie B. A., Proceedings of the postgraduate committee in veterinary science. The University of Sydney. 1986; 85:62.

Clark B. R. und Keating A., Biology of bone marrow stroma. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 770:70-8.

Constantinides P .G., Jones P. A. und Gevers W., Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature.* 1977; 26;267(5609):364-6.

Corcos J., Beaulieu S., Donovan J., Naughton M., Gotoh M. und Symptom Quality of Life Assesment Committee of the First International Consultation on Incontinence, Quality of life assessment in men and women with urinary incontinence. *J Urol.* 2002; 168(3):896-905.

Davis R. L., Weintraub H. und Lassar A. B., Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987; 51(6):987-1000.

Dean P. W., Novotny M. J. und O'Brien D. P., Prosthetic sphincter for urinary incontinence: results in three cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1989; 25:447-54.

Dell'Accio F., Vanlauwe J., Bellemans J., Neys J., De Bari C. und Luyten F. P., Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res.* 2003; 21(1):123-31.

Deng D. Y., Rutman M., Raz S. und Rodriguez L. V., Presentation and management of major complications of midurethral slings: Are complications under-reported? *Neurourol Urodyn.* 2007; 26(1):46-52.

Densmore M., Incontinence in the female patient. *J Fam Pract.* 1982; 14(5):935-6, 938, 940 passim.

Dietrich C., Wallenfang K., Oesch F. und Wieser R., Differences in the mechanisms of growth control in contact-inhibited and serum-deprived human fibroblasts. *Oncogene.* 1997; 15(22):2743-7.

Digirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R. und Prockop D. J., Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999; 107(2):275-81.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. J. und Horwitz E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.

Eberli D., Yoo J. J., Soker S. und Atala A., Muscle progenitor cells for the restoration of irreversibly damaged sphincter function. *Eur Urol Suppl.* 2008; 7(3):317.

Elia G. und Bergman A., Estrogen effects on the urethra: beneficial effects in women with genuine stress incontinence. *Obstet Gynecol Surv.* 1993; 48(7):509-17.

Evans M. J. und Kaufman M. H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819):154-6.

Feil G., Christ-Adler M., Maurer S., Corvin S., Rennekampff H. O., Krug J., Hennenlotter J., Kuehs U., Stenzl A. und Sievert K. D., Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa. *Eur Urol.* 2006; 50(6):1330-7.

Feil G., Maurer S., Nagele U., Krug J., Bock C., Sievert K. D. und Stenzl A., Immunoreactivity of p63 in monolayered and in vitro stratified human urothelial cell cultures compared with native urothelial tissue. *Eur Urol.* 2008; 53(5):1066-72.

Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. und Mavilio F., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279(5356):1528-30.

Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K. und Lalykina K. S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3(4):393-403.

Friedenstein A. J., Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976; 47:327-59.

Fuchs J. R., Nasser B. A. und Vacanti J. P., Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72(2):577-91.

Gage F. H., Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000; 287(5457):1433-8.

Gluckman E., Ex vivo expansion of cord blood cells. *Exp Hematol.* 2004; 32(5):410-2.

Grewal S. S., Kahn J. P., MacMillan M. L., Ramsay N. K. und Wagner J. E., Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood*. 2004; 103(3):1147-51.

Gronthos S., Graves S. E., Ohta S. und Simmons P. J., The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994; 84(12):4164-73.

Guan K., Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 2006; 440(7088):1199-203.

Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M. und Mulligan R. C., Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401(6751):390-4.

Haas S. J., Bauer P., Rolfs A. und Wree A., Immunocytochemical characterization of in vitro PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem*. 2000; 102(3):273-80.

Hampel C., Wienhold D., Benken N., Eggersmann C. und Thüroff J. W., Prevalence and natural history of female incontinence. *Eur Urol*. 1997; 32 Suppl 2:3-12.

Heit I., Wieser R. J., Herget T., Faust D., Borchert-Stuhlträger M., Oesch F. und Dietrich C., Involvement of protein kinase Cdelta in contact-dependent inhibition of growth in human and murine fibroblasts. *Oncogene*. 2001; 20(37):5143-54.

Henly D. R., Barrett D. M., Weiland T. L., O'Connor M. K., Malizia A. A. und Wein A. J., Particulate silicone for use in periurethral injections: local tissue effects and search for migration. *J Urol*. 1995; 153(6):2039-43.

Hodgkinson C. P., Relationships of the female urethra and bladder in urinary stress incontinence. *Am J Obstet Gynecol*. 1953; 65(3):560-73.

Hoehn M., Küstermann E., Blunk J., Wiedermann D., Trapp T., Wecker S., Föcking M., Arnold H., Hescheler J., Fleischmann B. K., Schwindt W. und Bührle C., Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(25):16267-72.

Hoelzler M. G. und Lidbetter D. A., Surgical management of urinary incontinence. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(4):1057-73.

Holt P. E., Importance of urethral length, bladder neck position and vestibulovaginal stenosis in sphincter mechanism incompetence in the incontinent bitch. Res Vet Sci. 1985; 39(3):364-72.

Holt P. E., Long-term evaluation of colposuspension in the treatment of urinary incontinence due to incompetence of the urethral sphincter mechanism in the bitch. Vet Rec. 1990a; 127(22):537-42.

Holt P. E., Urinary incontinence in dogs and cats. Vet Rec. 1990b; 127(14):347-50.

Holt P. E., Urinary incontinence in the bitch. Vet Rec. 1990c; 127(24):604.

Holt P. E. und Thrusfield M. V., Association in bitches between breed, size, neutering and docking, and acquired urinary incontinence due to incompetence of the urethral sphincter mechanism. Vet Rec. 1993; 133(8):177-80.

Holt P. E., Coe R. J. und Hotston Moore A., Prostatopexy as a treatment for urethral sphincter mechanism incompetence in male dogs. J Small Anim Pract. 2005; 46(12):567-70.

Horan P. K. und Slezak S. E., Stable cell membrane labelling. Nature 1989; 340(6229): 167-8.

Horan P. K., Melnicoff M. J., Jensen B. D. und Slezak S. E., Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* 1990; 33: 469-90.

Huard J., Yokoyama T., Pruchnic R., Qu Z., Li Y., Lee J. Y., Somogyi G. T., de Groat W. C. und Chancellor M. B., Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction. *Gene Ther.* 2002; 9(23):1617-26.

Hübner W., Operative Therapie der männlichen Inkontinenz. *J Urol Urogynaekol.* 2004; 11 (1): 27-31.

Hunskar S., Lose G., Sykes D. und Voss S., The prevalence of urinary incontinence in women in four European countries. *BJU Int.* 2004; 93(3):324-30.

Hunskar S., Epidemiology of urinary (UI) and fecal incontinence (FI) and pelvic organ prolaps (POP). *Incontinence*, ed. Abrams P., Cardozo L., Khoury S. 2005, Plymouth Mass, USA: Health Publication.

Huppelsberg J. und Walter K., *Kurzlehrbuch der Physiologie.* 2005, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 285.

Ingelman-Sundberg A., Operative treatment of female urinary incontinence. *Ann Chir Gynaecol.* 1982; 71(4):208-20.

Janssens L. A. A. und Janssens G. H. R. R., Bilateral flank ovariectomy in the dog-surgical technique and sequelae in 72 animals. *J. Small Anim. Pract.* 1991; 32:249-52.

Janssens L. A. A., Comparisons between stress incontinence in women and sphincter mechanism incompetence in the female dog. *Vet Rec.* 1997; 141(24):620-5.

Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A. und Verfaillie C. M., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893):41-9.

Kadiyala S., Young R. G., Thiede M. A. und Bruder S. P., Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997; 6(2):125-34.

Kasper C. und Stahl S., *Tissue Engineering*. *Biospektrum*. 2001; 7(5):460-1.

Kawada H., Fujita J., Kinjo K., Matsuzaki Y., Tsuma M., Miyatake H., Muguruma Y., Tsuboi K., Itabashi Y., Ikeda Y., Ogawa S., Okano H., Hotta T., Ando K. und Fukuda K., Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004; 104(12):3581-7.

Kershen R. T., Dmochowski R. R. und Appell R. A., Beyond collagen: injectable therapies for the treatment of female stress urinary incontinence in the new millennium. *Urol Clin North Am*. 2002; 29(3):559-74.

Khalaf A. N., Wolff-Vorbeck G., Bross K., Kerp L. und Petersen K. G., In vivo labelling of the spleen with a red-fluorescent cell dye. *J Immunol Methods*. 1993; 165(1):121-5.

Kiilhoma P., Chancellor M. B., Makinen J., Hirsch I. H. und Klemi P. J., Complications of Teflon injection for stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn*. 1993; 12(2):131-7.

Kjølhede P. und Rydén G., Prognostic factors and long-term results of the Burch colposuspension. A retrospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1994; 73(8):642-7.

Kleinert S. und Horton R., Retraction--autologous myoblasts and fibroblasts for treatment of stress urinary incontinence: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008; 372(9641):789-90.

Koerner J., Nesic D., Romero J. D., Brehm W., Mainil-Varlet P. und Grogan S. P., Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24(6):1613-9.

Kopen G. C., Prockop D. J. und Phinney D. G., Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:10711-6.

Kramer J., Böhrnsen F., Schlenke P. und Rohwedel J., Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine. *Transplant Proc*. 2006; 38(3):762-5.

Kruglyakov P. V., Sokolova I. B., Zin'kova N. N., Viide S. K., Aleksandrov G. V., Petrov N. S. und Polyntsev D. G., In vitro and in vivo differentiation of mesenchymal stem cells in the cardiomyocyte direction. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 142(4):503-6.

Kuroyanagi Y., Regenerative medicine for skin. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*. 2006; 43(3):326-9.

Kyles A. E., Vaden S., Hardie E. M. und Stone E. A., Vestibulovaginal stenosis in dogs: 18 cases (1987-1995). *J Am Vet Med Assoc*. 1996; 209(11):1889-93.

Lee J. Y., Cannon T. W., Pruchnic R., Fraser M. O. Huard J. und Chancellor M. B., The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2003; 14(1):31-7; discussion 37.

Lee W. C., Sepulveda J. L., Rubin J. P. und Marra K. G., Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells. *Int J Cardiol*. 2008 Jan 15. [Epub ahead of print]

Lewis M. R., Hughes B. und Bates A. L., Influence of styryl quinoline compounds on the growth of sarcomas native in rats of the Wistar inbred strain. *Growth*. 1955; 19(4):323-9.

Liu Y., Song J., Liu W., Wan Y., Chen X. und Hu C., Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: Does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res*. 2003; 58(2):460-8.

Lubbadeh J., Medizin-Skandal kostet Uni-Rektor den Job. *Spiegel online*. www.spiegel.de (22.08.2008).

Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S., Cardiomyocytes can be generated from stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.

Mangi A. A., Noiseux N., Kong D., He H., Rezvani M., Ingwall J. S. und Dzau V. J., Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003; 9(9):1195-201.

Martin G. R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(12):7634-8.

Matsunuma H., Kagami H., Narita Y., Hata K., Ono Y., Ohshima S. und Ueda M., Constructing a tissue-engineered ureter using a decellularized matrix with cultured uroepithelial cells and bone marrow-derived mononuclear cells. *Tissue Eng*. 2006; 12(3):509-18.

Maurer S., Feil G. und Stenzl A., In vitro stratified urothelium and its relevance in reconstructive urology. *Urologe A*. 2005; 44(7):738-42.

McGuire E. J., Lytton B., Pepe V. und Kohorn E. I., Stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol*. 1976; 47(3):255-64.

Megeney L. A. und Rudnicki M. A., Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995; 73(9-10):723-32.

Messina L. M., Podrazik R. M., Whitehill T. A., Ekhterae D., Brothers T. E., Wilson J. M., Burkel W. E. und Stanley J. C., Adhesion and incorporation of lacZ-transduced endothelial cells into the intact capillary wall in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(24):12018-22.

Meyer S., de Grandi P., Kuntzer T., Hürlimann P. und Schmidt N., Birth trauma: its effect on the urine continence mechanisms. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch.* 1993; 33(4):236-42.

Minguell J. J., Erices A. und Conget P., Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001; 226(6):507-20.

Mitterberger M., Marksteiner R., Margreiter E., Pinggera G. M., Colleselli D., Frauscher F., Ulmer H., Fussenegger M., Bartsch G. und Strasser H., Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *BJU Int.* 2007a; 100(5):1081-5.

Mitterberger M., Pinggera G. M., Marksteiner R., Margreiter E., Plattner R., Klima G., Bartsch G. und Strasser H., Functional and histological changes after myoblast Injektion in the porcine Rhabdosphinkter. *Eur Urol.* 2007b; 52(6):1736-43.

Modo M., Mellodew K., Cash D., Fraser S. E., Meade T. J., Price J. und Williams S. C., Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage.* 2004; 21(1):311-7.

Muschler G. F., Nakamoto C. und Griffith L. G., Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A(7):1541-58.

Nassiri S .M., Khaki Z., Soleimani M., Ahmadi S. H., Jahanzad I., Rabbani S., Sahebjam M., Ardalan F. A. und Fathollahi M. S., The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction. J Biomed Sci. 2007; 14(6):745-55.

Nickel R. F., Stockhaus C., Teske E. und Meyer H., Klinische Aspekte von Tumoren des Harnapparates bei Hund und Katze. Kleintierpraxis. 1997; 42:199-216.

Nickel R. F., Wiegand U. und van den Brom W. E., Evaluation of a transpelvic sling procedure with and without colposuspension for treatment of female dogs with refractory urethral sphincter mechanism incompetence. Vet Surg. 1998; 27(2):94-104.

Niederer A., Forschungskandal in Innsbruck. NZZ online. www.nzz.ch (16.08.2008)

Ninkovic M., Strasser H., Schwabegger A. H., Bartsch G., und Stenzl A., The concept of functioning free skeletal muscle transfer in combination with tissue engineering for bladder substitution. World J Urol. 2000; 18(5):359-63.

Norton P. und Brubaker L., Urinary incontinence in women. Lancet. 2006; 367(9504):57-67.

Okkens A. C., Kooistra H. S. und Nickel R. F., Comparison of long-term effects of ovariectomy versus ovariectomy in bitches, J Reprod Fertil Suppl. 1997; 51:227-31.

Otto T., Therapie der Sphinkterinsuffizienz III. Grades mit autologen Skelettmuskelzellen. Urologe 45(Suppl 1). 2006; 42.

Otto T., Eimer C. und Gerullis H., Repair of iatrogenic sphincter damage and urinary incontinence by autologous skeletal muscle derived cells (mdc). J Urol Suppl. 2008; 179(4):484.

Park S. R., Oreffo R. O. und Triffitt J. T., Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone*. 1999; 24(6):549-54.

Partridge T. A., Grounds M. und Sloper J. C., Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature*. 1978; 273(5660):306-8.

Partridge T. A., Morgan J. E., Coulton G. R., Hoffman E. P. und Kunkel L. M., Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989; 337(6203):176-9.

Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. M., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S. und Goff J. P., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 248:1168-70.

Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L. und Prockop D. J., Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72:570-85.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. und Marshak D. R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411):143-7.

Planat-Bénard V., Menard C., André M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J. M., Pénicaud L. und Casteilla L., Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004; 94(2):223-9.

Politano V. A. Small M. P., Harper J. M. und Lynne C. M., Periurethral teflon injection for urinary incontinence. *Trans Am Assoc Genitourin Surg*. 1973; 65:54-7.

Potten C. S., Stem Cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998; 353(1370):821-30.

Power S. C., Eggleton K. E., Aaron A. J., Holt P. E. und Cripps P. J., Urethral sphincter mechanism incompetence in the male dog: importance of bladder neck position, proximal urethral length and castration. *J Small Anim Pract.* 1998; 39(2):69-72.

Prometheus, Lernatlas der Anatomie 2. 2005, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 236-7.

Raybourne R. B. und Bunning V. K., Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect Immun.* 1994; 62(2):665-72.

Reichmann E., Gobet R. und Schneider J., Tissue Engineering: Utopie oder Realität. *J Urol Urogynäkol* 2005; 12 (4):24-7.

Rizwana R. und Hahn P. J., CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 24):4513-9.

Robinson D. und Cardozo L. D., The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. *Urology.* 2003; 62(4 Suppl 1):45-51.

Ruckstuhl B., Die Incontinentia urinae bei der Hündin nach Kastration. *Zuchthygiene.* 1976; 11:132.

Ruckstuhl B., Urinary incontinence in bitches as a late consequence of castration. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1978; 120(3):143-8.

Saito T., Kuang J. Q., Bittira B., Al-Khaldi A., Chiu R. C., Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg.* 2002; 74(1):19-24; discussion 24.

Samlowski W. E., Robertson B. A., Draper B. K., Prystas E., McGregor J. R., Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J Immunol Methods*. 1991; 144(1):101-15.

Schumacher S., Epidemiologie und Ätiologie der Harninkontinenz im Alter, *Urologe A*. 2007; 46(4):357-8, 360-2.

Scott F. B., Bradley W. E. und Timm G. W., Treatment of urinary incontinence by an implantable prosthetic sphincter. *Urology*. 1973; 1(3):252-9.

Sgodda M., Aurich H., Kleist S., Aurich I., König S., Dollinger M. M., Fleig W. E. und Christ B., Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2007; 313(13):2875-86.

Shake J. G., Gruber P. J., Baumgartner W. A., Senechal G., Meyers J., Redmond J. M., Pittenger M. F. und Martin B. J., Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73(6):1919-25.

Sharifiaghdas F., Surgical management of stress urinary incontinence. *Urol J*. 2005; 2(4):175-82.

Shim W. S., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y. L., Tan Y. S., Sin Y. K., Lim C. H., Chua T., Teh M., Liu T. C. und Sim E., Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324(2):481-8.

Sievert K. D., Amend B., Anastasiadis A., Nagele U., Seibold J. und Stenzl A., Implantation of an urethral artificial sphincter in a female patient. *Eur Urol Suppl*. 2007a; 6(2):294.

Sievert K. D., Amend B., Wilson S. K., Anastasiadis A., Nagele U., Kuczyk M. und Stenzl A., Fast implantation of an artificial urethral sphincter through a peno-scrotal approach. *Eur Urol Suppl.* 2007b; 6(2):295.

Sievert K. D., Amend B., Renninger M., Selent C., Feil G., Hennenlotter J., Skutella T., Möhle R., Northoff H. und Stenzl A., Stellenwert der Stammzelltherapie für die Behandlung der Belastungsinkontinenz. *Urologe A.* 2007c; 46(3):264-7.

Sievert K. D. und Stenzl A., Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial. *Int Braz J Urol.* 2007d; 33(4):586-7.

Skalak R. und Fox C. F., (eds), *Tissue Engineering*, Alan R.Liss Inc., New York. 1988

Stenzl A., Ninkovic M., Kölle D., Knapp R., Anderl H., und Bartsch G., Restoration of voluntary emptying of the bladder by transplantation of innervated free skeletal muscle. *Lancet.* 1998; 351(9114):1483-5.

Stenzl A., Strasser H., Klima G., Eder I., Frauscher F., Klocker H., Bartsch G. und Ninkovic M., Reconstruction of the lower urinary tract using autologous muscle transfer and cell seeding: current status and future perspectives. *World J Urol.* 2000; 18(1):44-50.

Stenzl A., Ninkovic M., Ashammakhi N., Eder I. E. und Bartsch G., Rekonstruktion des unteren Harntrakts. *Entwicklungen am Beginn des neuen Jahrtausends.* *Urologe A.* 2001; 40(5):368-75.

Stenzl A., Urethral reconstruction: new materials but old problems? *Eur Urol.* 2003; 44(5):610.

Stenzl A. und Sievert K. D., Are we ready for a home-grown urinary sphincter? *Eur Urol.* 2007; 52(6):1574-5. Epub 2007 Jun 26.

Stöcklin-Gautschi N. M., Hässig M., Reichler I. M., Hubler M. und Arnold S., The relationship of urinary incontinence to early spaying in bitches. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; 57:233-6.

Strasser H., Tiefenthaler M., Steinlechner M., Bartsch G. und Konwalinka G., Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells, *Lancet.* 1999; 354(9182):918-9.

Strasser H., Marksteiner R., Margreiter E., Pinggera G. M., Mitterberger M., Fritsch H., Klima G., Rädler C., Stadlbauer K. H., Fussenegger M., Hering S. und Bartsch G., Stammzelltherapie der Harninkontinenz. *Urologe A.* 2004; 43(10):1237-41.

Strasser H., Marksteiner R., Margreiter E., Mitterberger M., Pinggera G. M., Frauscher F., Fussenegger M., Kofler K. und Bartsch G., Transurethral ultrasonography-guided injection of adult autologous stem cells versus transurethral endoscopic injection of collagen in treatment of urinary incontinence. *World J Urol.* 2007a; 25(4):385-92. Epub 2007 Aug 14.

Strasser H., Marksteiner R., Margreiter E., Pinggera G. M., Mitterberger M., Frauscher F., Ulmer H., Fussenegger M., Kofler K. und Bartsch G., Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007b; 369(9580):2179-86. Erratum in: *Lancet.* 2008; 371(9611):474. Retraction in: Kleinert S. und Horton R. *Lancet.* 2008; 372(9641):789-90.

Sun Z., Chen Z. und Wang B., In vitro differentiation of rat mesenchymal stem cells into skeletal muscle cells induced by myoblast differentiation factor and 5-azacytidine. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2007; 21(12):1371-5.

Tapp A. J., Cardozo L. D., Versi E. und Studd J. W., The prevalence of variation of resting urethral pressure in women and its association with lower urinary tract function. *Br J Urol.* 1988; 61(4):314-7.

Taylor S. M. und Jones P. A., Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979; 17(4):771-9.

Taylor S. M. und Jones P. A., Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol*. 1982; 111(2):187-94.

Thrusfield M. V., Association between urinary incontinence and spaying in bitches. *Vet Rec*. 1985; 116(26):695.

Tocci A. und Forte L., Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J*. 2003; 4(2):92-6.

Toma C., Pittenger M. F., Cahill K. S., Byrne B. J. und Kessler P. D., Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; 105(1):93-8.

Usas A. und Huard J., Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007; 28(36):5401-6.

Van Geelen J. M., Lemmens W. A., Eskes T. K. und Martin C. B. Jr., The urethral pressure profile in pregnancy and after delivery in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*. 1982; 144(6):636-49.

Wagner J. E. und Verfaillie C. M., Ex vivo expansion of umbilical cord blood hemopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 2004; 32(5):412-3.

Wakitani S., Saito T. und Caplan A. I., Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995; 18(12):1417-26.

Walker C. und Shay J. W., 5-Azacytidine induced myogenesis in a differentiation defective cell line. *Differentiation*. 1984; 25(3):259-63.

Walters M. D., Realini J. P. und Dougherty M., Nonsurgical treatment of urinary incontinence. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1992; 4(4):554-8.

Wang Y., Chen X., Armstrong M. A. und Li G., Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res.* 2007; 25(7):926-32.

Watt F. M., Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998; 353(1370):831-7.

Wefer B., Seif C., van der Horst C., Jünemann K. P. und Braun P. M., Botulinumtoxin-A-Injektion bei therapierefraktärer Giggle Inkontinenz *Urologe A.* 2007; 46(7):773-5.

Weissman I. L., Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 2000; 287(5457):1442-6.

White R. N., Urethropexy for the management of urethral sphincter mechanism incompetence in the bitch. *J Small Anim Pract.* 2001; 42(10):481-6.

Wiedemann J., Selent C., Gustafsson E., Schäfer J., Feil G., Seibold J., Sievert K. D. und Stenzl A., In vitro investigations on urothelial cell suspensions for an urethral stricture therapy in a large animal modell. *J Urol Suppl.* 2008; 179(4):15.

Wiegand U. und Nickel R. F., Zur Prognose bei der Behandlung von ektoischen Ureteren beim Hund. *Kleintierpraxis.* 1996; 41:153-234.

Wieser R. J., Faust D., Dietrich C. und Oesch F., p16INK4 mediates contact-inhibition of growth. *Oncogene.* 1999; 18(1):277-81.

Wiesmann H. P. Joos U. und Meyer U., Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(6):523-30.

Yiou R., Dreyfus P., Chopin D. K., Abbou C. C. und Lefaucheur J. P., Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int.* 2002; 89(3):298-302.

Yiou R., Yoo J. J. und Atala A., Failure of differentiation into mature myotubes by muscle precursor cells with the side-population phenotype after injection into irreversibly damaged striated urethral sphincter. *Transplantation.* 2005; 80(1):131-3.

Yokoyama T., Huard J., Pruchnic R., Yoshimura N., Qu Z., Cao B., de Groat W. C., Kumon H. und Chancellor M. B., Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle. *Urology.* 2001; 57(4):826-31.

Yoon Y. S., Park J. S., Tkebuchava T., Luedeman C. und Losordo D. W., Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004; 109(25):3154-7.

Zhang Y., Fan Y., Zhao L. und Tang H., Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2005; 22(3):521-4.

9. Anhang

9.1 Nachweis der PKH26-Fluoreszenz im syngenem Tiermodell (Lewis Ratten)

1. Tiere 58 Tage; P4; N = 2 Tiere

D: N = 1	1/1 neg.	0/1 pos.
K: N = 1	0/1 neg.	1/1 pos.
Gesamt: N = 2	1/2 neg.	1/2 pos.

2. Tiere 65 Tage; P3; N = 1 Tiere

K: N = 1	0/1 neg.	1/1 pos.
Gesamt: N = 1	0/1 neg.	1/1 pos.

3. Tiere 135 Tage; P2; N = 4 Tiere

D: N = 2	2/2 neg.	0/2 pos.
K: N = 2	0/2 neg.	2/2 pos.
Gesamt: N = 4	2/4 neg.	2/4 pos.

4. Tiere 156 Tage; P3; N = 1 Tiere

D: N = 1	1/1 neg.	0/1 pos.
Gesamt: N = 1	1/1 neg.	0/1 pos.

5. Tiere 163 Tage; P3; N = 3 Tiere

D: N = 2	1/2 neg.	1/2 pos.
K: N = 1	0/1 neg.	1/1 pos.
Gesamt: N = 3	1/3 neg.	2/3 pos.

9.2 Nachweis der PKH26-Fluoreszenz im xenogenen Tiermodell (Nacktratten)*1. Tiere 4 Tage; P1; N = 3 Tiere*

K: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

Gesamt: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

2. Tiere 8 Tage; P1; N = 2 Tiere

K: N = 2 0/2 neg. 2/2 pos.

Gesamt: N = 2 0/2 neg. 2/2 pos.

3. Tiere 12 Tage; P1; N = 2 Tiere

K: N = 2 0/2 neg. 0/2 pos. Schwach pos. 2/2

Gesamt: N = 2 0/2 neg. 0/2 pos. Schwach pos. 2/2

4. Tiere 28 Tage; P1; N = 2 Tiere

K: N = 2 0/2 neg. 1/2 pos. Schwach pos. 1/2

Gesamt: N = 2 0/2 neg. 1/2 pos. Schwach pos. 1/2

5. Tiere 56 Tage; P1; N = 2 Tiere

K: N = 2 0/2 neg. 1/2 pos. Schwach pos. 1/2

Gesamt: N = 2 0/2 neg. 1/2 pos. Schwach pos. 1/2

6. Tiere 56 Tage; P2; N = 2 Tiere

D: N = 2 1/2 neg. 1/2 pos.

Gesamt: N = 2 1/2 neg. 1/2 pos.

7. Tiere 56 Tage; P3; N = 3 Tiere

D: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

Gesamt: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

8. Tiere 56 Tage; P4; N = 3 Tiere

D: N = 3 1/3 neg. 2/3 pos.

Gesamt: N = 3 1/3 neg. 2/3 pos.

9. Tiere 56 Tage; P5; N = 3 Tiere

D: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

Gesamt: N = 3 0/3 neg. 3/3 pos.

10. Tiere 56 Tage; P6; N=1 Tier

D: N = 1 0/1 neg. 1/1 pos.

Gesamt: N = 1 0/1 neg. 1/1 pos.

Erklärung der Abkürzungen

K: Kontrollen (native MSZ ohne Exposition gegenüber 5-Aza)

D: Differenziert (MSZ nach Exposition gegenüber 5-Aza)

N: Anzahl Tiere

P: Passage

pos.: positiv

neg.: negativ

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Kramer danke ich sehr für seine Bereitschaft, die extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität zu vertreten, für seine rasche Korrektur und seine immer gewährte Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. A. Stenzl bedanke ich mich für die Bereitstellung und Betreuung des Themas, sein großes Interesse an den Ergebnissen und der Entwicklung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. K.-D. Sievert bin ich für die gute Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und für die gewinnbringenden Diskussionen bei der schriftlichen Gestaltung zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ganz besonders Herrn Dr. rer. nat. G. Feil für die freundliche Unterstützung und die hervorragende Betreuung und Beratung bei der Ausarbeitung des Themas sowie bei der Anfertigung und Korrektur dieser Arbeit.

Bei den Mitarbeitern des Labors der Medizinische Klinik Abteilung II des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Möhle bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft. Mein Dank gilt hier insbesondere Herrn A. Lächele für die Beschaffung und Aufzucht der benötigten Stammzellen.

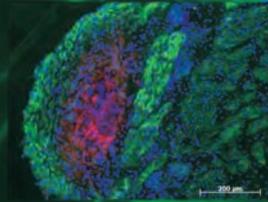
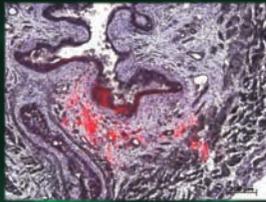
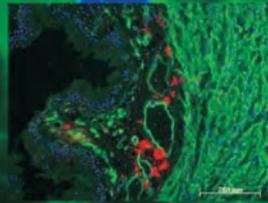
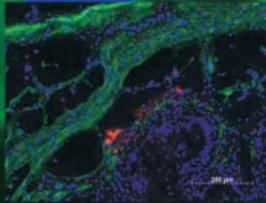
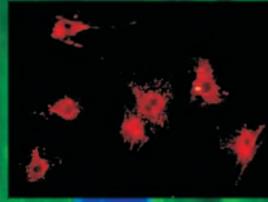
Dem gesamten Labor für Tissue Engineering besonders Frau S. Maurer, Frau J. Krug und Frau C. Bock danke ich für die vielseitigen Hilfestellungen und die großzügige Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichten, mich immer unterstützten und jederzeit bei der Durchführung meiner Dissertationsarbeit hilfreich zur Seite standen.

Zum Schluss sei noch meine liebe Julia erwähnt, die während der gesamten Zeit der Promotion immer Verständnis und sehr viel Geduld für mich hatte. Sie hat mich bei den praktischen Versuchen jederzeit tatkräftig unterstützt. Ich danke Ihr dafür.

11. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5395-8

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 119539 56