

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

(Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar)

# **Einfluss von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor auf die traumatisierte periphere Skelettmuskulatur der Ratte**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Ioannis Stratos

aus Athen

Rostock, 29.06.2009

Gutachter:

Prof. Dr. med. B. Vollmar, Rostock

Prof. Dr. med. T. Mittlmeier, Rostock

P.D. Dr. med. K. Schaser, Berlin

Tag der Verteidigung: 19.01.2010

---

*An  
meine Familie*

---

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	3
II. Abkürzungen.....	6
III. Zusammenfassung .....	8
IV. Summary .....	9
1 Einleitung .....	10
1.1 Die periphere Skelettmuskulatur und das Muskeltrauma .....	10
1.2 Pathophysiologie des Muskeltraumas .....	12
1.3 Therapiekonzepte nach Muskeltrauma.....	17
1.4 Wachstumsfaktoren und Muskelregeneration .....	19
1.5 Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor und sein Rezeptor.....	19
1.6 Klinische Anwendungen von G-CSF .....	21
1.7 Pleiotrope Eigenschaften von G-CSF .....	21
2 Ziel der Studie.....	23
3 Material und Methoden .....	24
3.1 Experimentelles Modell.....	24
3.2 Untersuchungsmethoden.....	25
3.2.1 Muskelkraft .....	25
3.2.2 Immunhistochemische und histologische Untersuchungen.....	28
3.2.2.1 BrdU Immunhistochemie .....	28
3.2.2.2 CAE Histologie.....	29
3.2.2.3 TUNEL Histologie .....	30
3.2.2.4 Histologische Auswertung .....	30
3.2.2.5 BrdU/Laminin und BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie .....	32
3.2.2.6 Sirius-Red Histologie .....	33
3.2.2.7 Muskelgewebefraktion .....	34
3.2.3 Laboranalysen .....	35
3.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf.....	35
3.4 Statistische Analyse.....	36
4 Ergebnisse.....	37

---

4.1	Allgemeine Beobachtungen.....	37
4.2	Muskelkraft .....	37
4.2.1	Kurzkontraktion.....	37
4.2.2	Tetanie.....	38
4.2.3	Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie.....	39
4.3	Proliferation.....	40
4.4	Apoptose.....	43
4.5	Leukozyteninfiltration .....	44
4.6	Muskelgewebefraktion .....	45
4.7	Kollagendeposition .....	46
4.8	Systemische Leukozytenzahl .....	48
4.9	Systemische Creatin-Kinase-Konzentration .....	48
4.10	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	49
5	Diskussion .....	51
5.1	Diskussion von Material und Methode.....	51
5.1.1	Etablierte Modelle zur Untersuchung der Muskelregeneration.....	51
5.1.1.1	<i>In-vitro</i> Muskeltraumamodelle.....	51
5.1.1.2	Humane Muskeltraumamodelle .....	51
5.1.1.3	Tierexperimentelle Muskeltraumamodelle .....	52
5.1.2	Muskeltraumainduktion mittels instrumentierter Klemme .....	53
5.1.3	Die Ratte als Versuchstier .....	53
5.1.4	Muskelregeneration bei Tieren .....	53
5.1.5	G-CSF: Dosis und Applikation .....	54
5.1.6	Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung .....	56
5.1.7	Diskussion der Untersuchungstechniken.....	56
5.1.7.1	Muskelkraft .....	56
5.1.7.2	Muskelzellproliferation .....	57
5.1.7.3	Satellitenzellproliferation.....	59
5.1.7.4	Apoptose und Nekrose .....	60
5.1.7.5	Lokale und systemische Leukozytenzahl .....	62
5.1.7.6	Systemische Marker des Muskelschadens.....	63
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	64
5.2.1	Muskelfunktion nach Trauma und G-CSF-Applikation.....	64
5.2.2	Ratio von Kurzkontraktion-zu-Tetanie nach Trauma und G-CSF-Behandlung... 65	
5.2.3	Zelluläre Prozesse nach Muskeltrauma und G-CSF-Applikation.....	65
5.2.3.1	Proliferation.....	65

5.2.3.2	Apoptose und Nekrose .....	67
5.2.3.3	Fibrose und Narbenbildung .....	68
5.2.3.4	Leukozyteninfiltration .....	69
5.2.4	Systemische Leukozytenzahl nach Trauma und G-CSF-Behandlung.....	70
5.2.5	Stammzellmobilisation und Geweberegeneration nach G-CSF-Applikation.....	71
5.3	Limitationen und Ausblick .....	72
6	Thesen.....	74
7	Literatur.....	76
8	Danksagung.....	88
9	Curriculum Vitae .....	89
10	Eidesstattliche Erklärung .....	91

---

## II. Abkürzungen

-OH	Hydroxylgruppe
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Bcl	B-cell lymphoma
BrdU	Bromodeoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-CSF-R	Rezeptor vom Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HGF	hepatocyte growth factor
i.p.	intraperitoneal
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht

---

kg	Kilogramm
L	Liter
M. soleus	Musculus soleus
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
N	Newton
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus
NaCl	Kochsalz
o.g.	oben genannte
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
s	Sekunde
STAT	signal transducers and activators of transcription
TGF	transforming growth factor
U/L	Einheiten pro Liter
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

### III. Zusammenfassung

Eine unzureichende Regeneration der Skelettmuskulatur nach Trauma verhindert oft den Heilungsprozess und geht mit Funktionsdefiziten und Bindegewebsformation einher. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, in wieweit der hämatopoetische Wachstumsfaktor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur nach Trauma in Wistar Ratten fördert. Hierfür wurde der linke M. soleus kontusioniert und anschließend täglich entweder G-CSF (20µg/kg i.p.) oder NaCl (0.6ml/kg i.p.) (n=30 Tiere pro Gruppe) injiziert. Sham-operierte Tiere ohne Muskeltrauma dienten als Kontrolle (n=15 Tiere). Die Kontraktionskapazität des M. soleus wurde *in-vivo* durch die Kurzkontraktion und die Tetanie an den Tagen 4, 7, und 14 nach Trauma analysiert. Das asservierte Muskelgewebe diente zur Bestimmung der Satellitenzellproliferation [Bromodeoxyuridin (BrdU)/Laminin und BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie] und der Zellapoptose (TUNEL-Analyse). Die Analyse der Muskelkraft zeigte eine Wiederherstellung der Kontraktionskapazität von 26±2, 35±3 und 53±3% (Kurzkontraktion) und von 20±3, 24±2 und 37±2% (Tetanie) über den 14-tägigen experimentellen Verlauf bei den NaCl-behandelten Tieren. Die G-CSF Therapie führte zu einem zusätzlichen Anstieg der Kontraktionskapazität an den Tagen 7 (Kurzkontraktion: 42±2%; Tetanie: 34±2%) und 14 (Kurzkontraktion: 62±3%; Tetanie: 43±3%) nach Trauma. Diese verbesserte Muskelfunktion ging am 4. Tag mit einem signifikanten Anstieg der Satellitenzellproliferation (BrdU-positive Zellen/mm<sup>2</sup>: 27±6 vs. NaCl: 12±3) und einer mäßigen Reduktion der Zellapoptose (TUNEL-positive Zellen/mm<sup>2</sup>: 11±2 vs. NaCl: 16±3) einher. Zusammenfassend kann man sagen, dass G-CSF histologisch das Überleben und die Proliferation von Muskelzellen fördert und eine schnellere und bessere funktionelle Restauration der Skelettmuskulatur nach Trauma bewirkt. Deshalb könnte G-CSF einen attraktiven adjuvanten Therapieansatz im Management von Patienten mit schwerem Weichteiltrauma darstellen.

## IV. Summary

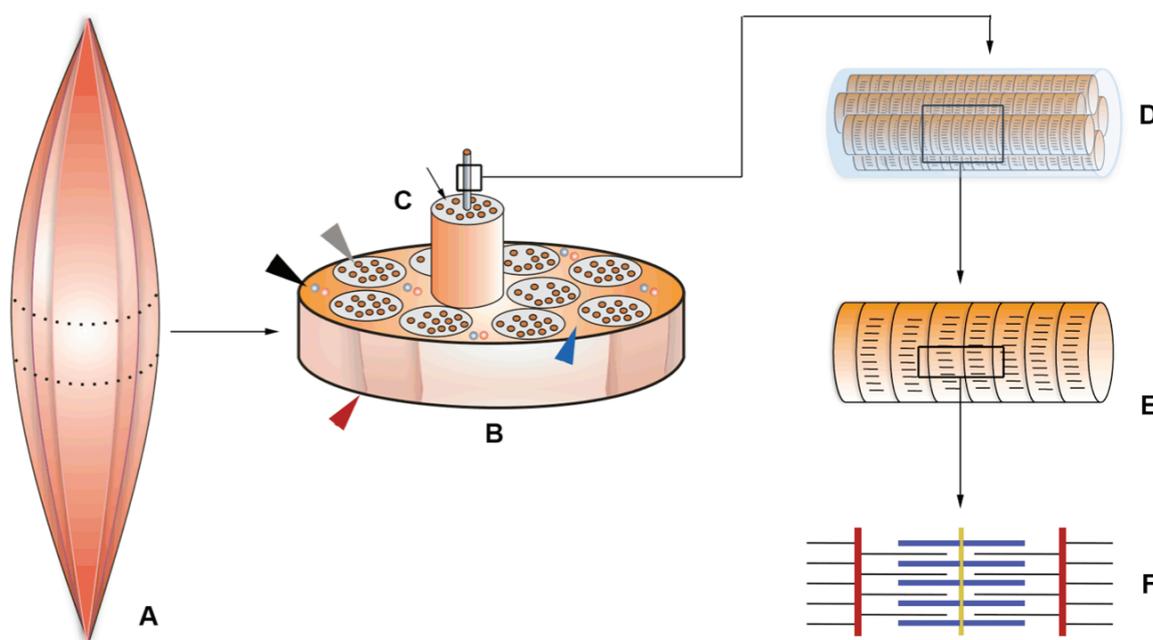
Insufficiency of skeletal muscle regeneration often impedes the healing process with functional deficiencies and scar formation. We tested the hematopoietic growth factor, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), with respect to its efficacy to improve functional muscle regeneration following skeletal muscle injury in Wistar rats. After crush injury to the left soleus muscle, animals received daily G-CSF (20mg/kg i.p.) or vehicle solution (0.6ml/kg i.p.) (n = 30 animals per group each). Sham-operated animals without muscle injury served as controls (n = 15 animals). After *in-vivo* assessment of the fast-twitch and tetanic contraction capacity of the soleus muscles at days 4, 7, and 14 post-injury, sampling of muscle tissue served for analysis of satellite cell proliferation [bromodeoxyuridine (BrdU)/laminin and BrdU/desmin double immunohistochemistry] and cell apoptosis (TUNEL-analysis). Muscle strength analysis revealed recovery of contraction forces to 26±2, 35±3 and 53±3% (twitch force) and to 20±3, 24±2 and 37±2% (tetanic force) within the 14-day observation period in vehicle-treated animals. Of interest, G-CSF increased contractile forces with markedly higher values at day 7 (twitch force: 42±2%; tetanic force: 34±2%) and day 14 (twitch force: 62±3%; tetanic force: 43±3%). This enhancement of muscle function was preceded by a significant increase of satellite cell proliferation (BrdU-positive cells/mm<sup>2</sup>: 27±6 vs. vehicle: 12±3) and a moderate decrease of cell apoptosis (TUNEL-positive cells/mm<sup>2</sup>: 11±2 vs. vehicle: 16±3) at day 4. In conclusion, G-CSF histologically promoted viability and proliferation of muscle cells and functionally enhanced recovery of muscle strength. Thus, G-CSF might represent a therapeutic option to optimize the posttraumatic course of muscle tissue healing.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die periphere Skelettmuskulatur und das Muskeltrauma

Der Körper eines gesunden Menschen besteht insgesamt aus mehr als 600 verschiedenen Muskeln. Beim Mann macht die Muskulatur ca. 40%, bei der Frau rund 23% der gesamten Körpermasse aus. Aufgrund der Eigenschaft zur Kontraktion und Kraftproduktion ermöglichen uns unsere Muskeln zu atmen, zu gehen und unseren täglichen Aktivitäten nachzugehen.

Die Skelettmuskulatur besteht aus vielkernigen Muskelfasern mit einem Durchmesser von 10-100µm. Die Vielkernigkeit resultiert aus der embryonalen Verschmelzung von mehreren hundert einkernigen Myoblasten zu einem Synzytium.



**Abbildung 1.1:**

Der Skelettmuskel (A) besteht aus lang gestreckten Muskelfaserbündel (B; graue Pfeilspitze), welche vom Perimysium (B; blaue Pfeilspitze) umhüllt werden. Diese Muskelfaserbündel bezeichnet man als Sekundärbündel und werden von Nerven und Kapillaren durchsetzt (B; schwarze Pfeilspitze). Alle Sekundärbündel sind durch das Epimysium (B; rote Pfeilspitze) zusammengefasst und werden von der Faszie in der jeweiligen anatomischen Form zusammen gehalten. Ein Muskelfaserbündel (C) besteht aus mehreren langen Muskelfasern/Muskelzellen (D), welche von Endomysium umspinnen werden (C; schwarzer Pfeil). Zur Kontraktion besitzen die Muskelzellen mehrere Myofibrillen (E), welche aus hintereinander geschalteten Sarkomeren (F) bestehen. Durch Interaktion der beiden Proteine eines Sarkomers, Aktin (F; schwarze Filamente) und Myosin (F; blaue Filamente), kann eine Muskelzelle ihre Länge reduzieren und somit kontrahieren.

Die einzelnen Muskelfasern werden vom Endomysium bedeckt. Diese bindegewebige Schicht besteht aus einer Basallamina und aus retikulären Fasern (Abbildung 1.1). In den Bindegewebsscheiden zwischen den Muskelfasern findet sich ein dichtes Netzwerk aus Kapillaren sowie Lymphgefäßen und Nervenfasern. Der Muskel als Ganzes wird vom Epimysium, einer derben Bindegewebshülle, umgeben. Vom Epimysium aus erstrecken sich dünne Bindegewebssepten ins Innere des Muskels, die als Perimysium Bündel von Muskelfasern umschließen (Abbildung 1.1).

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit der Muskelfaser und führt auf mikroskopischer Ebene die Muskelkontraktion durch. Jedes Sarkomer ist aus kontraktilen Proteinen aufgebaut, die sich zu Filamenten zusammensetzen, welche hauptsächlich aus Aktin und Myosin bestehen.

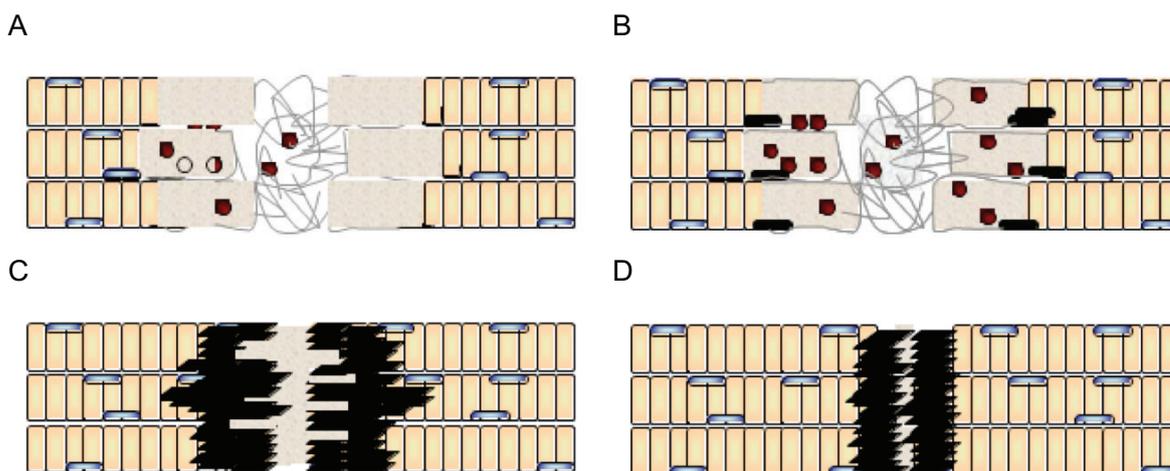
Wenn eine Muskelverletzung auftritt, wird unsere tägliche Aktivität durch Funktionsverlust eingeschränkt. Als Muskelverletzung wird der Funktionsverlust der Muskulatur bezeichnet, der nach direkten oder indirekten Verletzungen des Gewebes auftritt.

Muskelverletzungen gehören zu den häufigsten Verletzungen des menschlichen Körpers und können mit chronischen Schmerzen oder bleibenden Behinderungen einhergehen. Unfallasoziierte Verletzungen betreffen zum größten Teil die untere Extremität und müssen unter Umständen operativ versorgt werden. Muskelverletzungen werden je nach Entstehungsmechanismus in Zerrung, Laceration oder Kontusion eingeteilt. Die jeweilige Schwere und das Ausmaß der Weichteilschädigung besitzen dabei zentrale Bedeutung für das therapeutische Management und die Prognose des Patienten [Oestern und Tscherner 1983].

Der Muskelverletzung liegt ursächlich per Definition eine externe Krafteinwirkung zu Grunde und wird im klinischen Alltag als offen oder geschlossen bezeichnet. Bei den geschlossenen Verletzungen bleibt die Kontinuität der Haut erhalten, bei den offenen Verletzungen wird diese unterbrochen. Eine Muskelkontusion kann nicht nur durch eine direkte stumpfe externe Kraft verursacht werden, sondern auch durch ein von innen raumforderndes Knochenfragment oder Hämatom. Solche Verletzungsmuster treten hauptsächlich bei geschlossenen Frakturen auf. Das klinische Bild variiert von Prellmarken über Hämatome bis hin zu Spannungsblasen und später entsprechenden Hautnekrosen. Offene Verletzungen hingegen gehen meistens mit Muskeldurchtrennungen und Schäden des umliegenden Gewebes einher. Eine isolierte Muskelverletzung ist äußerst selten, da das Trauma, welches den Muskelschaden verursacht, meistens mit begleitenden ausgedehnten Weichteilschäden einhergeht. Je nach Ausmaß und Lokalisation der externen Krafteinwirkung können neben der Muskulatur auch Knochen, Haut, Sehnen, Gefäße oder Nerven betroffen sein.

## 1.2 Pathophysiologie des Muskeltraumas

Nach einem Muskeltrauma kommt es zu einer deutlichen ischämischen und inflammatorischen Schädigung der Myozyten aufgrund des Versagens der nutritiven mikrovaskulären Perfusion und der erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit konsekutiver endothelialer Barrierefunktionsstörung und interstitieller Ödembildung. Diese Prozesse werden später von Regeneration und Narbenbildung gefolgt (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung und zeitlicher Ablauf der Muskelregeneration: Am 1. und 2. Tag (A) werden die nekrotischen Muskelfragmente von Makrophagen phagozytiert und Fibroblasten bilden in der geschädigten Zone Kollagen. Vom 3. Tag bis zum 5. Tag (B) proliferieren die Satellitenzellen und das Bindegewebe in der geschädigten Zone wird fester. Am 7. Tag (C) regenerieren die Muskelzellen und Narbengewebe bildet sich aus. Erst ab dem 14. Tag nach Trauma (D) kondensiert das Narbengewebe. Ab dem 21. Tag verbinden sich die regenerierten Muskelfasern mit der neu geformten Narbe. *Abbildung modifiziert nach Jarvinen und Mitarbeiter [Jarvinen et al. 2005]*

Pathophysiologisch lassen sich drei Phasen unterscheiden [Jarvinen et al. 2005]:

- I. Destruktionsphase: Ruptur und Nekrose der Muskelfasern, Hämatombildung und Infiltration des Gewebes mit inflammatorischen Zellen.
- II. Wiederherstellungsphase: Phagozytose von nekrotischem Gewebe, Muskelfaserregeneration mit zeitgleicher Bindegewebsformation und Einwachsen von Kapillaren in das traumatisierte Gewebe.
- III. Umbauphase: Wiederherstellung und Regeneration der Muskelfasern, Erhöhung der Reißfestigkeit des traumatisierten Muskels, Reorganisation des Narbengewebes und funktionelle Wiederherstellung des Muskels.

## Destruktionsphase

Nach direkter Krafteinwirkung auf die Muskulatur kommt es makroskopisch zur Hämatombildung mit partieller oder vollständiger Durchtrennung der Muskelkontinuität. Intramuskuläre Strukturen wie Gefäße und Nerven werden beim Trauma durchtrennt. Bei intakter Muskelfaszie bildet das extravasierte Blut ein intramuskuläres Hämatom aus und bewirkt einen Anstieg des intramuskulären Drucks. Ein extramuskuläres Hämatom tritt auf, wenn die Integrität der Muskelfaszie durch das Trauma nicht mehr gewährleistet ist und das extravasierte Blut direkten Zugang zum interstitiellen oder intrafasziellen Gewebe erlangt, ohne dabei den intramuskulären Druck zu erhöhen [Jarvinen et al. 2005].

Beim Muskeltrauma werden die Muskelzellen irreversibel geschädigt. Mikroskopisch zeigt sich eine Ruptur der Muskelfaser durch einen offenen Zytoplasma-Muskelzell-Stumpf [Hurme et al. 1991]. Damit die geschädigten Muskelfasern das Trauma überleben und die Nekrose umgehen, bildet sich am offenen Muskelfaser-Ende eine membranähnliche Struktur, die als „Kontraktionsbande“ bezeichnet wird [Hurme et al. 1991]. Diese Membran besteht hauptsächlich aus kondensiertem zytoskeletalem Material und schließt förmlich das offene Ende der Membran wenige Stunden nach Traumainduktion ab. Damit wird eine Ausbreitung der Nekrose verhindert und gleichzeitig eine schützende Barriere geformt, unter welcher die zerstörte Zytoplasmamembran wiederhergestellt werden kann [Hurme et al. 1991].

Neben Muskelfasern werden auch Blutgefäße traumatisiert und inflammatorische Zellen des Blutes infiltrieren das geschädigte Gewebe. Die inflammatorische Reaktion per se wird zu einer späteren Phase von den Satellitenzellen und vom nekrotischen Gewebe induziert [Chazaud et al. 2009]. Diese Zellen sezernieren posttraumatisch zahlreiche Wundhormone, welche die chemotaktische Extravasation von inflammatorischen Zellen bewirken.

Während der akuten Phase des Muskeltraumas wandern hauptsächlich polymorphnukleäre Leukozyten in das geschädigte Gewebe ein. Die Monozyten werden in Makrophagen transformiert und initiieren somit hauptsächlich durch Freisetzung von lysosomalen Enzymen die Phagozytose von nekrotischem Gewebe [Jarvinen und Lamb 2005]. Die Myozyten, die das Trauma überlebt haben, bilden ein „Gerüst“, das den vitalen Satellitenzellen erlaubt neue Muskelzellen auszubilden. Während dieser Prozedur phagozytieren die Makrophagen die nekrotischen Fragmente und gewährleisten gleichzeitig das Überleben der Satellitenzellen [Chazaud et al. 2003].

Die inflammatorischen Zellen dringen posttraumatisch ins Gewebe ein und versuchen das gebildete Hämatom abzubauen [Jarvinen und Lamb 2005]. Die aus dem Blut stammenden Proteine Fibrin und Fibronectin reagieren miteinander und formen somit

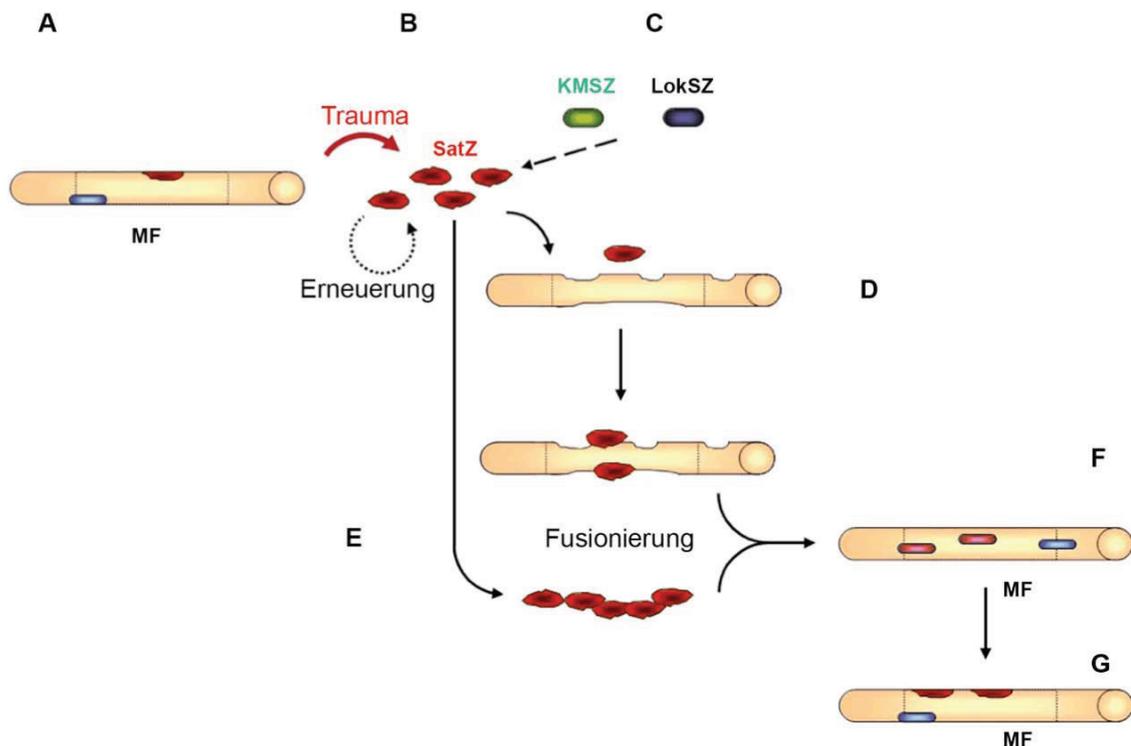
ein relativ unreifes Granulationsgewebe, die sogenannte extrazelluläre Matrix, welche den einwandernden Fibroblasten als Gerüst dient [Bunn et al. 2004]. Einige dieser eindringenden Fibroblasten können sogar von Zellen stammen, die aktiv zur Muskelregeneration beitragen [Huard et al. 2003]. Das neugeformte Gewebe verleiht dem geschädigten Muskel die nötige Stabilität, um die Spannung, die durch die Kontraktionskräfte hervortritt, zu tolerieren [Lehto et al. 1985]. Fibroblasten initiieren die Synthese der Proteoglykane der extrazellulären Matrix, um die Integrität des Bindegewebes zu stärken [Hurme et al. 1991]. Während der ersten Tage werden extrazelluläre Matrixproteine gebildet, welche elastische Eigenschaften besitzen und etwa 10 Tage nach dem Trauma dem Bindegewebe eine relativ große Reißfestigkeit verleihen [Jarvinen et al. 2005].

Zahlreiche Zytokine und Wachstumshormone werden im traumatisierten Muskel exprimiert. Diese Faktoren sind Mitose-fördernde Proteine, die auf myozytäre Vorläuferzellen und Satellitenzellen proliferativ wirken.

### **Wiederherstellungsphase**

Nach der Destruktionsphase beginnt die Regeneration der Muskelfasern und die Formation von Bindegewebe. Obwohl die Muskelfasern als irreversibel postmitotische Zellen gelten, ist zur Wiederherstellung des Kontraktionsapparats eine Regeneration dieser Zellen durch spezielle Mechanismen möglich. Hierbei spielen undifferenzierte Reservezellen, die sich im Spalt zwischen Basal- und Plasmamembran der Muskelfaser aufhalten und als Satellitenzellen bezeichnet werden, eine entscheidende Rolle [Mauro 1961]. In der erwachsenen Muskulatur finden sich Satellitenzellen normalerweise im Ruhezustand, d.h. sie nehmen nicht an mitotischen Prozessen teil. Als Antwort auf verschiedene Reize, wie z.B. Verletzungen, werden Satellitenzellen reaktiviert und kehren in den Zellzyklus zurück [Grounds 1998]. Die Satellitenzellen proliferieren, differenzieren sich zu Myoblasten und verbinden sich untereinander, um ein Synzytium zu bilden (Abbildung 1.3). Die Synzytien fusionieren am Ende mit den Muskelfasern, die das Muskeltrauma überlebt haben [Charge und Rudnicki 2004].

In den Skelettmuskelzellen können zwei Hauptgruppen von Satellitenzellen identifiziert werden [Ehrhardt und Morgan 2005]. Zum einen gibt es die klassischen Satellitenzellen, die sich gleich nach dem Trauma in Myoblasten differenzieren können. Die zweite Zellpopulation wird als aktivierte Satellitenzellen bezeichnet, welche zuerst proliferieren und sich dann in Myoblasten differenzieren (Abbildung 1.3). Durch diese Prozedur werden die vorhandenen Reserven des Muskels an Satellitenzellen erneuert [Zammit et al. 2004 a; Zammit et al. 2004 b].



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Muskelregeneration. Bei den normalen Muskelfasern (MF) (A) kommt es nach Trauma (B) zur Erneuerung durch Aktivierung und Proliferation der vorhandenen Satellitenzellen (SatZ). Stammzellen aus dem Knochenmark (KMSZ) und lokale Stammzellen im Muskel (LokSZ) differenzieren sich zu Satellitenzellen und tragen zur Muskelregeneration bei (C). Die Satellitenzellen fusionieren mit den geschädigten Muskelfasern (D) oder miteinander (E) und bilden neue Muskelfasern mit zentral gelegenen Kernen (F). Später bewegen sich diese Kerne dezentral und nehmen in den Muskelfasern ihre typische periphere Lokalisation ein (G).

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass die einzige Quelle der Muskelregeneration die Satellitenzelle sei. Aktuelle Studien haben jedoch gezeigt, dass weitere Populationen multipotenter Stammzellen den traumatisierten Muskel wiederherstellen können. Zu diesen Zellen gehören die im Muskel ortsständigen Stammzellen und die in der peripheren Blutbahn zirkulierenden Stammzellen [Charge und Rudnicki 2004]. So ist z.B. bekannt, dass isolierte Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, aus neuronalem Gewebe und mesenchymalem Gewebe zur Regeneration der Muskulatur beitragen [Charge und Rudnicki 2004]. Darüber hinaus ist berichtet, dass die aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen nicht nur zur Muskelregeneration beitragen, sondern sich auch in Satellitenzellen differenzieren können [LaBarge und Blau 2002]. Außerdem gibt es im Bindegewebe des Muskels weitere Populationen von Muskelvorläuferzellen mit der Kapazität der Differenzierung zu Myoblasten [Charge und Rudnicki 2004]. Unbestritten ist jedoch, dass das Regenerationspotential der vorhin erwähnten Vorläuferzellen und Stammzellen verglichen mit der Regeneration durch

Satellitenzellen wesentlich geringer ist [LaBarge und Blau 2002]. Deshalb bleibt es bis heute fraglich, ob diese Stamm- und Vorläuferzellen wesentlich zur Muskelregeneration beitragen können [Grounds et al. 2002].

Zeitgleich mit den Satellitenzellen proliferieren die Fibroblasten und bilden zahlreiche Kollagenfasern aus, um am zuvor erwähnten „Gerüst“ des Muskels beizutragen. Dabei ist ein Gleichgewicht der Proliferation von Satellitenzellen und Fibroblasten eine der Grundvoraussetzungen für die optimale Wiederherstellung der Kontraktionsfunktion des Muskels. Ziel dieser Vorgänge ist es eine narbenfreie Muskelregeneration durchzuführen. Die Mehrheit der Muskeltraumata heilt ohne Formation von einschränkendem Bindegewebe. Dennoch kann es vorkommen, dass bei besonders großen Schädigungen die Proliferation der Fibroblasten der Satellitenzellproliferation überlegen ist und es zu einer dichten Bindegewebsbildung kommt. Die Narbe stellt bei solchen Fällen eine mechanische Barriere dar, welche die Regeneration der Myozyten an der Übergangszone zwischen gesundem und traumatisiertem Gewebe verhindert [Jarvinen und Lamb 2005; Jarvinen et al. 2005].

Ein vitaler Prozess der Skelettmuskulatur nach Verletzung ist die Vaskularisierung des traumatisierten Areals. Dieser Vorgang stellt eines der ersten Regenerationszeichen dar und wird als eine wesentliche Voraussetzung der Wiederherstellung der Funktionalität des Muskels beschrieben [Jarvinen et al. 2005]. Neue Kapillaren werden gebildet, indem Sprossen aus den Gefäßen der ungeschädigten Peripherie in das geschädigte Gewebe einwachsen [Jarvinen und Lamb 2005]. Ziel dieses Vorgangs ist es eine adäquate Oxygenierung zu gewährleisten, die den Zellmetabolismus der regenerierenden Muskelfasern möglich macht [Jarvinen und Lamb 2005]. Ähnlich wie bei der Vaskularisation kann die Regeneration durch unzureichende intramuskuläre Innervation gehemmt werden [Hurme et al. 1991]. Die Reinnervation erfolgt hierbei durch das Wachsen eines neuen Axons distal des Schadens.

### **Umbauphase**

Nach kompletter Muskelruptur kann die Kraft zwischen dem Muskelursprung und Muskelansatz nicht übertragen werden und beide Muskelstümpfe dehnen sich während der Kontraktionsphase an der Rißstelle weiter auseinander. Die freien Enden der Muskelfaser versuchen in das Narbengewebe einzudringen und nehmen dabei eine charakteristische Konusformation ein [Jarvinen et al. 2005]. Dabei wird den Muskelfasern erlaubt sich seitlich an der extrazellulären Matrix festzubinden, um dadurch die Stabilität des Gewebes zu unterstützen [Kaariainen et al. 2000]. Somit wird eine zweite Ruptur verhindert [Kaariainen et al. 2000]. Eine wesentliche Rolle spielen die Kräfte, welche bei

Kontraktion am Muskel ansetzen. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass das Phänomen der seitlichen Adhäsion in Abwesenheit von mechanischen Zugkräften nicht auftritt [Kaariainen et al. 2001].

Bei der späteren Regenerationsphase bildet sich zwischen dem proximalen und distalen Muskelstumpf Bindegewebe aus, welches ähnliche Eigenschaften und gleiche Adhäsionsmoleküle wie ein Muskelsehnenansatz besitzt [Jarvinen et al. 2005]. Dadurch werden zwei individuelle Sehnen-Muskel-Sehnen Einheiten gebildet, welche vom gleichen Nerv innerviert werden und gleichzeitig kontrahieren können. [Jarvinen et al. 2005]. Zu einem späteren Zeitpunkt wird das dazwischenliegende Narbengewebe graduell reduziert und die stumpfen Muskelfaserteile sehr eng zueinander gebracht. Allerdings werden sich diese Stümpfe der Muskelzellen nicht wiedervereinigen können [Vaittinen et al. 2002].

### 1.3 Therapiekonzepte nach Muskeltrauma

Die unmittelbaren therapeutischen Maßnahmen nach dem Muskelschaden werden im Akronym „RICE“ zusammengefasst. Laut „RICE“ sollte das traumatisierte Gewebe mit Immobilisation (rest), Kälte (ice), Kompression (compression) und Hochlagerung der traumatisierten Extremität (elevation) behandelt werden [Jarvinen et al. 2005]. Obwohl die Kombination der o.g. Behandlungsprinzipien nicht evidenzbasiert ist, sondern mehr auf empirischen sportmedizinischem Wissen beruht, ist die Wertigkeit der individuellen Behandlungsmaßnahmen in experimentellen Studien schon mehrmals gezeigt und bestätigt worden [Bleakley et al. 2006]. Die Kryotherapie scheint mit geringerer Inflammation und Hämatombildung einherzugehen. Zusätzlich wird die Regeneration durch Kühlung beschleunigt [Deal et al. 2002]. Insbesondere scheint die Kombination aus Kompressionen und Kryotherapie einen positiven Effekt auf den Muskel zu haben [Jarvinen et al. 2005]. Im Gegensatz dazu bewirkt die Kompressionstherapie alleine eine Reduktion des intramuskulären Blutflusses im geschädigten Areal und hat somit einen fragwürdigen Einfluss auf die Muskelregeneration nach Trauma [Thorsson et al. 1997]. Der durch Hochlagerung der betroffenen Extremität über Herzehene beobachtete positive Effekt lässt sich durch den reduzierten hydrostatischen Druck und die dadurch bedingte Verringerung des interstitiellen Ödems und der extravasalen Flüssigkeit erklären.

Sollte innerhalb der ersten Tage keine Besserung auftreten, ist die Wahrscheinlichkeit einer ausgedehnten Muskelschädigung groß. Hierbei ist eine detaillierte klinische Untersuchung wichtig, welche besonderes Augenmerk auf die Durchblutung, Motorik und Sensibilität der Extremität in Kombination mit einer Ultraschalluntersuchung legt, um die Wahrscheinlichkeit eines Kompartmentsyndroms auszuschließen. Chirurgische Entlastung der Hämatome stellen daher keine Seltenheit

dar [Jarvinen et al. 2005].

### **Immobilisation und Belastungsaufbau der geschädigten Muskulatur**

Bei den meisten Muskelverletzungen ist eine frühzeitige Rehabilitation wichtig, um die maximale funktionelle Wiederherstellung der verletzten Muskulatur zu gewährleisten. Dies wird im klinischen Alltag zum einen durch frühzeitige Immobilisation (Unterstützung der Muskelfaserheilung) und zum anderen durch spätere Mobilisation des Patienten (Unterstützung der Angiogenese) mittels schmerzadaptierter Vollbelastung erzielt [Jarvinen 1976].

### **Medikamentöse Therapie**

Die positive Wirkung der nichtsteroidalen Antiphlogistika auf die verletzte Muskulatur wurde in experimentellen Studien gezeigt [Obremsky et al. 1994; Thorsson et al. 1998]. Des Weiteren ist bekannt, dass diese Medikamente analgetisch wirken [Paoloni und Orchard 2005] und einen mildernden Effekt auf die inflammationsbedingten Schmerzen haben [Almekinders 1999]. Zusätzlich ließ sich klinisch ein positiver Einfluss der nichtsteroidalen Antiphlogistika auf die Muskelregeneration nach Muskeltrauma nachweisen [O'Grady et al. 2000]. Trotzdem bedarf es weiterer Studien zur genaueren Klärung der zugrunde liegende Mechanismen [Jarvinen et al. 2005] der oben genannten Medikamente.

### **Operative Therapie**

Muskeltraumata werden initial meist konservativ behandelt. Eine chirurgische Intervention sollte nur dann in Betracht gezogen werden, wenn die Vitalität der Skelettmuskulatur oder der Extremität durch ein intramuskuläres Hämatom oder Kompartmentsyndrom gefährdet wird [Jarvinen et al. 2005].

### **Adjuvante Therapie**

Zur Behandlung des Muskeltraumas stehen adjuvante Therapieoptionen zur Verfügung, wie die Ultraschallbehandlung und die hyperbare Sauerstofftherapie. Beide Ansätze finden gelegentliche Anwendung nach Muskeltrauma, dennoch ist der wissenschaftliche Hintergrund ihrer Wirkung ungeklärt [Jarvinen et al. 2005].

## 1.4 Wachstumsfaktoren und Muskelregeneration

Die Muskelregeneration ist ein komplexer Prozess, der von intrinsischen und extrinsischen Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Mechanismen, die durch Wachstumsfaktoren kontrolliert oder gesteuert werden, umfassen die Aktivierung von Satellitenzellen und deren Migration in das traumatisierte Gewebe sowie die Proliferation der Muskelvorläuferzellen und deren Differenzierung zu Muskelfasern.

Es ist bekannt, dass Muskeln nach Kontusionsverletzungen biologisch aktive Moleküle in den extrazellulären Matrixraum freisetzen, die einen proliferativen Einfluss auf die Satellitenzellen haben [Bischoff 1990]. Es wurden mehrere Wachstumsfaktoren beschrieben, die für eine schnellere Genesung des traumatisierten Muskels verantwortlich gemacht werden. So ist z.B. gezeigt worden, dass die Faktoren Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor-I und -II (IGF-I und -II) die Proliferation und Differenzierung der Satellitenzellen *in-vitro* und *in-vivo* fördern [Hawke und Garry 2001]. Des Weiteren zeigen der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), der Transformierende-Wachstumsfaktor (TGF), der Leukämie-inhibierende Faktor (LIF) und das Interleukin-6 (IL-6) einen proliferativen Einfluss auf die Satellitenzellen [Hawke und Garry 2001]. Viele dieser Wachstumsfaktoren fördern allerdings nicht nur die Satellitenzellproliferation, sondern auch die Bildung von Narbengewebe im traumatisierten Gewebe [Huard et al. 2002]. Die Regeneration der Muskelzellen und die Formation von Bindegewebe stellen grundsätzlich zwei separate Prozesse dar, die sich gegenseitig unterstützen und gleichzeitig miteinander konkurrieren [Jarvinen et al. 2005]. Diese Wundhormone fördern die Muskelregeneration, ohne dabei die Muskelfunktion einzuschränken.

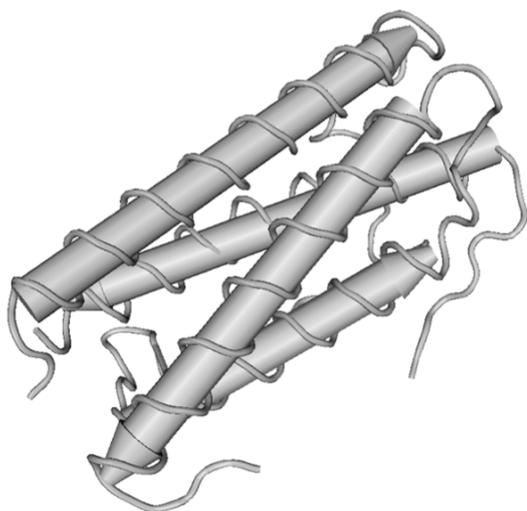
Die Applikation von Wachstumsfaktoren zur posttraumatischen Muskelregeneration ist von der klinischen Anwendung noch weit entfernt, obgleich deren Effizienz bei tierexperimentellen Muskeltraumamodellen bereits gezeigt wurde. Wachstumsfaktoren könnten somit einen vielversprechenden adjuvanten Therapieansatz zu den herkömmlichen Behandlungsmaßnahmen darstellen. Ziel derzeitiger wissenschaftlicher Untersuchungen im Bereich der Traumatologie ist es, die bereits vorhandene Regenerationskapazität der peripheren traumatisierten Skelettmuskulatur mit bestimmten Wachstumsfaktoren gezielt zu fördern.

## 1.5 Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor und sein Rezeptor

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) ist ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktor, der das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Granulozyten-Vorläuferzellen fördert und reife Neutrophile aus dem

Blut funktionell aktiviert [Demetri und Griffin 1991]. Er gilt als der potenteste Wachstumsfaktor, der eine End-Differenzierung der myeloisch-leukämischen Zelllinie zu Granulozyten und Makrophagen *in-vivo* und *in-vitro* induzieren kann [Demetri und Griffin 1991]. G-CSF reguliert weiterhin eine Reihe von Funktionen reifer neutrophiler Granulozyten, unter anderem Chemotaxis, Migration und Superoxidanion-Produktion. G-CSF fördert die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen hauptsächlich durch Aktivierung der Janus-Kinase (JAK), Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription (STAT) sowie des Ras/mitogenaktivierenden Proteins (MAP). Außerdem spielt hierbei die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)/Proteinkinase-B Signalkaskade eine Rolle [Solaroglu et al. 2006].

Auf molekularbiologischer Ebene besteht G-CSF aus vier antiparallelen alpha-Helices, 174 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 19kDa (Abbildung 1.4). Eine Vielfalt von Zellen, so auch Stammzellen aus dem Knochenmark, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten können nach entsprechendem Stimulus G-CSF produzieren. G-CSF wird ebenfalls von mehreren Tumoren exprimiert [Baba et al. 1995; Ichiishi et al. 2000].



**Abbildung 1.4:** Dreidimensionale Abbildung des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF). Dargestellt sind die 4 antiparallel zueinander gerichteten alpha-Helices des Moleküls.

*Abbildung modifiziert nach Lovejoy und Mitarbeiter [Lovejoy et al. 1993]*

G-CSF wirkt durch direkte Bindung an seinem Rezeptor (CD114 oder G-CSF-R). Dieser Rezeptor wird auf mehreren hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert. Der G-CSF-R ist auf Myeloblasten, Neutrophilen, Neuronen, Herzmuskelzellen, Gliazellen, Endothelzellen und kleinzelligen Lungentumoren zu finden [Bussolino et al. 1989; Avalos 1996]. Kataoka und Mitarbeiter haben weiterhin gezeigt, dass G-CSF-R auf murinen Myoblasten exprimiert wird [Kataoka et al. 2003].

In Europa stehen für G-CSF zwei rekombinant hergestellte Moleküle zur Verfügung.

Das Filgrastim wird in *Escherichia coli* produziert und besteht aus 175 Aminosäuren, d.h. dem natürlich vorkommenden humanen G-CSF, inklusive eines zusätzlichen N-terminalen Methioninmoleküls. Lenograstim besteht aus den natürlichen 174 Aminosäuren mit einem Kohlenhydratanteil von 4% und wird in Hamsterovarzellen produziert. Filgrastim fehlt eine Glykosylierung, welche bei Lenograstim besteht. Trotz Unterschieden in der Pharmakologie und Pharmakokinetik werden die Substanzen aufgrund des gleichen Wirkungsspektrums [Tanaka et al. 1997] in der Klinik weitgehend identisch angewandt.

## **1.6 Klinische Anwendungen von G-CSF**

Das G-CSF wurde am 21.2.1991 eingeführt, um die Inzidenz von Infektionen bei myelosupprimierten Patienten zu reduzieren. Eine im klinischen Alltag sehr bedeutende Eigenschaft des G-CSF ist die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in das Blut, wie bei gesunden Stammzellspendern oder auch bei chemo- bzw. strahlenbehandelten Patienten [Demetri und Griffin 1991]. G-CSF findet ebenfalls Anwendung nach myelosuppressiver Chemotherapie bei akuten Leukämien und beim myelodysplastischen Syndrom. Syndrome, wie schwere kongenitale zyklische und idiopathische Neutropenien, sowie eine andauernde Neutropenie bei Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion, können ebenfalls mit G-CSF-behandelt werden [Tamura 1999].

G-CSF wird weiterhin als Medikament gegeben, wenn aufgrund einer Chemotherapie bei Krebserkrankungen die Anzahl neutrophiler Granulozyten auf zu niedrige Werte abzusinken droht und dadurch die Gefahr für Infektionen ansteigt. G-CSF wird in den meisten Fällen vor Auftreten einer Leukozytopenie prophylaktisch gegeben [Page und Liles 2008]. In der üblichen Dosierung verkürzt G-CSF auch die Entwicklungszeit von den Vorläuferzellen zu den reifen neutrophilen Granulozyten von ca. 7 auf 1.5 Tage.

## **1.7 Pleiotrope Eigenschaften von G-CSF**

Tierexperimentelle, aber auch humane Studien der letzten zehn Jahre haben gezeigt, dass G-CSF nicht nur ein potenter hämatopoetischer Wachstumsfaktor ist [Takano et al. 2003; Franzke 2006; Xiao et al. 2007]. G-CSF ist eine pleiotrope Substanz, die das Remodeling und die Funktion des Herzens nach Myokardinfarkt verbessert und die Morbidität reduziert [Takagi et al. 2005]. Es wird angenommen, dass G-CSF bei der Regeneration von Kardiomyozyten und Blutgefäßen hauptsächlich durch Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark wirkt [Takano et al. 2003]. Ebenfalls wurden

neuroprotektive, anti-apoptotische und anti-inflammatorische Eigenschaften von G-CSF auf das zentrale Nervensystem beobachtet [Solaroglu et al. 2006]. Weiterhin sind angiogene Wirkungen von G-CSF nach Ischämie/Reperfusionsschaden des zentralen Nervensystems, am Herzen, der Skelettmuskulatur und der Niere beschrieben. G-CSF scheint darüber hinaus die Frakturheilung zu fördern [Kaygusuz et al. 2006] und die funktionelle Wiederherstellung des Rückenmarks nach direktem Trauma zu verbessern [Koda et al. 2007; Nishio et al. 2007]. G-CSF fördert weiterhin das Überleben nach schweren Verbrennungen und reduziert die Häufigkeit von Wundinfektion [O'Reilly et al. 1994; Molloy et al. 1995]. Weiterhin wirkt G-CSF modulierend auf das Immunsystem und wird therapeutisch bei Autoimmunkrankheiten angewendet [Xiao et al. 2007].

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass G-CSF grundsätzlich protektiv und regenerativ wirkt und somit einen potentiellen Therapieansatz auch bei Muskelverletzungen darstellen könnte.

## 2 ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden experimentellen Untersuchungen war es, die Wirkung und Effektivität von G-CSF auf die periphere Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma zu analysieren. Dabei wurde auf folgende Punkte näher eingegangen:

- Biomechanische Untersuchung des Kontraktionsvermögens und der Muskelkraft des geschädigten Muskels nach Gabe von G-CSF.
- Immunhistochemische Analyse der proliferierenden Zellen und insbesondere der Satellitenzellen im traumatisierten Muskelgewebe nach G-CSF-Applikation.
- Histologische Analyse von Apoptose, Nekrose und Kollagendeposition im Muskel nach Trauma und Gabe von G-CSF.
- Analyse der lokalen Leukozyteninfiltration im Muskel nach Trauma und G-CSF-Behandlung.

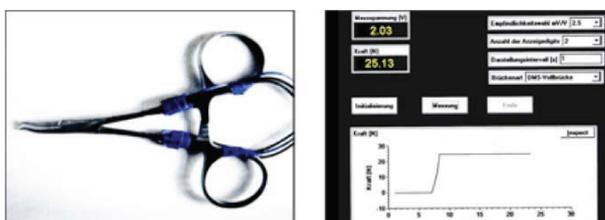
### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Experimentelles Modell

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 275–325g durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes, bei 12h Tag-Nacht-Rhythmus und unter Bereitstellung von Laborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten. Das Forschungsvorhaben war von der Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-046/06) genehmigt worden. Die Versuche erfolgten eine Woche nach Akklimatisation der Tiere an die Laborbedingungen.

#### Operationsverlauf zur Traumainduktion

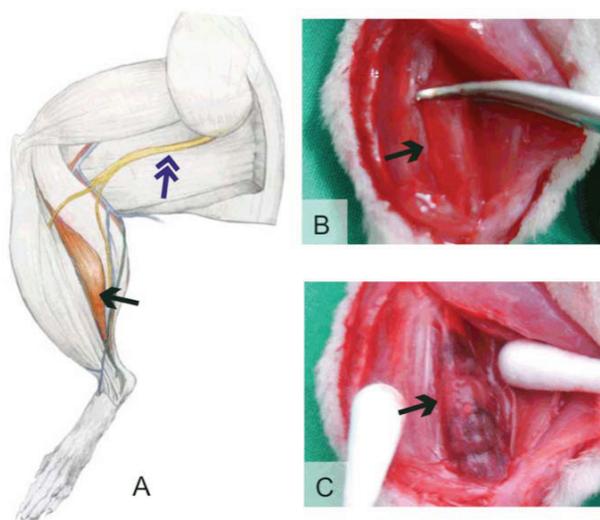
Nach Randomisierung und Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen wurden die Tiere mittels i.p. Injektion von Pentobarbital-Natrium 6% (55mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Die Tiere wurden am linken Hinterlauf rasiert, mit Povidon-Iod desinfiziert (Betasisodona<sup>®</sup>, Mundipharma, Limburg Deutschland) und anschließend in Bauchlage positioniert. Mittels Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizintechnische Geräte, Pfaffing, Deutschland) wurde die Körperkerntemperatur konstant bei 36-37°C gehalten. Alle Eingriffe wurden unter nicht sterilen Bedingungen mit Hilfe mikrochirurgischer Instrumente durchgeführt.



**Abbildung 3.1:** Darstellung der instrumentierten Klemme (links), mit welcher das Muskeltrauma induziert wurde. Die am Muskel angewandte Kontusionskraft wurde in Echtzeit von der Klemme abgeleitet und digital gemessen (rechts).

Die Haut des linken Hinterlaufes wurde postero-lateral in der Längsachse auf einer imaginären Linie zwischen Patella und Sprunggelenk auf einer Länge von ca. 2.5cm inzidiert. Nach Präparation und Darstellung der Faszie wurde diese in der Länge des Zugangs eröffnet. Daran anschließend erfolgte die Präparation der Beugemuskulatur (M. gastrocnemius / M. soleus). Dazu wurde der laterale Bauch des M. gastrocnemius soweit

mobilisiert, dass der M. soleus frei gelegt und mittels einer instrumentierten Klemme kontusioniert werden konnte (Abbildung 3.1). Die Klemme war an den Branchen leicht gebogen, um den Muskel in voller Breite erfassen zu können. Die am Muskel angewandte Kontusionskraft wurde durch die instrumentierte Klemme über das Messgerät DMC plus (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland) und einer speziell entwickelten Softwareanwendung in Echtzeit gemessen. Die Kalibrierung des Messgerätes und Entwicklung der Software erfolgte am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock. Der Muskel wurde manuell mit einer Kraft von 25N, zehnmal für je 10s jeweils über seine ganze Länge gequetscht (Abbildung 3.2-B und 3.2-C).



**Abbildung 3.2:** Darstellung des linken M. soleus (Pfeil) und des N. ischiadicus (Doppelpfeil) (A). Die Traumainduktion des linken M. soleus (Pfeil) wird mittels der instrumentierter Klemme durchgeführt. Dargestellt ist in (B) die erste der insgesamt zehn Quetschungen. Makroskopisches Resultat direkt nach Traumatisierung des Muskels durch zehn aufeinander folgende Quetschungen (C). Das Muskelareal mit dem zentralen Nervgefäßbündel (Pfeil) ist vom Trauma ausgespart (C).

Um die Innervation und Vaskularisation des M. soleus zu gewährleisten, wurde der zentrale Teil des Muskels, in welchen das Nervgefäßbündel eintritt, von der Kontusion ausgeschlossen (Abb. 3.2-C). Nach sorgfältigem Abspülen der Wunde mit steriler Kochsalzlösung wurde erst die oberflächliche Muskelfaszie und dann die Haut mit 4-0 Vicryl Naht (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) vernäht. Anschließend wurde die Wunde mit Povidon-Iod desinfiziert. Nach der Operation erwachten die Tiere in ihrem Käfig aus der Narkose und hatten dort freien Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter.

## 3.2 Untersuchungsmethoden

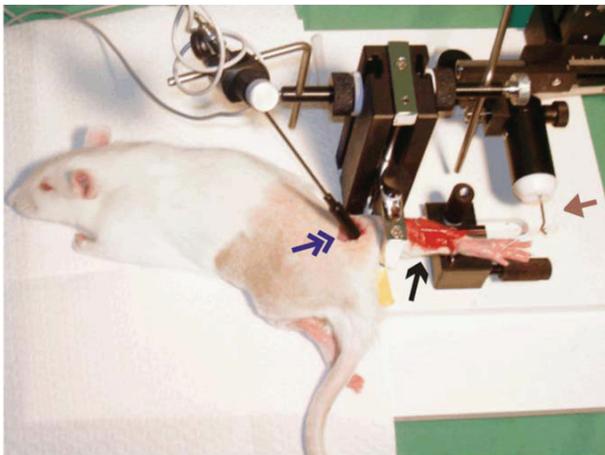
### 3.2.1 Muskelkraft

Die biomechanische Testung erfolgte mittels der kontraktiven Funktionsmessung des M. soleus. Dazu wurde mit Hilfe einer speziellen Versuchsanordnung der M. soleus

indirekt gereizt und die dabei auftretenden kontraktile Kräfte, wie nachfolgend beschrieben, erfasst.

### Erfassung der Muskelkraft

Hierfür wurden die Tiere erneut mittels Pentobarbital-Natrium narkotisiert und am Hinterlauf beidseits rasiert. Die Kraft des traumatisierten M. soleus (linke Seite) wurde prozentual zur Kraft der gesunden Seite (rechte Seite) ausgedrückt. Demzufolge war es notwendig die Muskelkraftmessung bei allen Versuchstieren beidseitig durchzuführen. Die chirurgische Präparation und Muskelkraftmessung erfolgte zuerst an der gesunden rechten Seite und dann an der traumatisierten linken Seite.



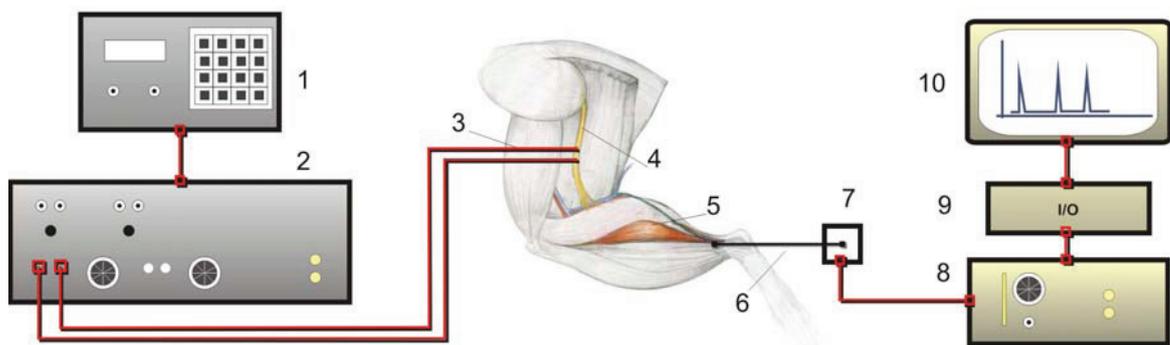
**Abbildung 3.3:** Darstellung der experimentellen Vorrichtung zur Muskelkraftmessung. Nach Darstellung des M. soleus und des N. ischiadicus wird die Ratte in Bauchlage auf der Platte der Messvorrichtung platziert und die Pfote an der Halterung entsprechend eingespannt. Der M. soleus (schwarzer Pfeil) wird indirekt über den N. ischiadicus (Doppelpfeil) gereizt. Die Kontraktionskraft wird über den Messwandler (brauner Pfeil) digital aufgenommen und am Computer aufgezeichnet.

An jedem Hinterlauf der Ratte wurden zwei Schnitte vorgenommen. Über einen 1 cm langen Schnitt im mittleren Drittel des Oberschenkels wurde die Haut mit einer stumpfen Schere eröffnet. Anschließend wurden die Muskelbäuche am Oberschenkel stumpf abgespreizt, um in der Tiefe den N. ischiadicus darstellen zu können. Über einen zweiten 2.5cm langen Schnitt am Unterschenkel wurden die Haut und die Muskelfaszie inzidiert, der M. soleus - wie zuvor beschrieben - erneut mobilisiert und die Achillessehne dargestellt. Die Sehne wurde vom Ansatz des M. gastrocnemius und proximal der Ferse durchtrennt, so dass der distale Ansatz des M. soleus frei gelegt war. Das Versuchstier wurde dann von der Heizplatte umgelagert und in Bauchlage auf die Muskelkraftmessvorrichtung (NM-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) platziert. Das Knie und die Ferse wurden an den entsprechenden Halterungen fixiert und der distale Teil des M. soleus mit einem 4-0 Vicryl Faden am Messwandler (FSG-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) der Muskelkraftmessvorrichtung verbunden (Abbildung 3.3).

Die Elektrode wurde am N. ischiadicus eingerastet und bipolar durch den

Impulsgeber und die Steuerungseinheit stimuliert (CRS-ST-02-O, Experimetria, Budapest, Ungarn). Um eine Kurzkontraktion des M. soleus zu erzeugen, wurden 9mA / 75Hz über den N. ischiadicus geleitet, fünfmal für eine Zeit von jeweils 0.1s und 5s-Pausenintervallen zwischen den Pulsen. Als nächstes wurde an der gleichen Vorrichtung die maximale Muskelkraft des M. soleus gemessen, mit 9mA / 75Hz 5 mal für jeweils 3s pro Stimulation und 5s-Pausenintervallen zwischen den Pulsen. In allen Fällen wurde dadurch eine Tetanie erreicht (Abbildung 3.3 und 3.4).

Um die Kontraktionskraft des M. soleus zu messen (Abbildung 3.4), wurde das Signal der Zugkraft des Muskel durch den Messwandler am Empfänger übermittelt und dort auch verstärkt (CRS-SG Experimetria, Budapest, Ungarn). Das analoge Signal wurde dann durch ein Modem (LabJack U12, LabJack Corporation, Lakewood USA) digitalisiert und die Werte mit einer speziell entwickelten Visual Basic Anwendung (Visual Basic 6, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) erfasst und gespeichert.



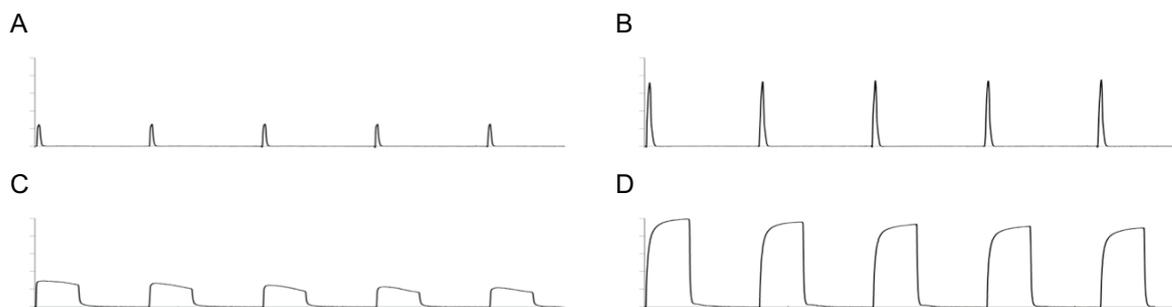
**Abbildung 3.4:** Die Elektrode (3) wird am N. ischiadicus (4) eingerastet und bipolar durch den Impulsgeber (2) und die Steuerungseinheit (1) stimuliert. Um die Kontraktionskraft des M. soleus (5) zu messen, wird die Zugkraft des Muskel durch den Messwandler (6, 7) an den Empfänger (8) übermittelt und dort auch verstärkt. Das analoge Signal wird digitalisiert (9) und am Computer (10) visualisiert.

Anschließend wurde die Ratte von der Messvorrichtung auf die Heizplatte umgelagert. An der linken unteren Extremität wurde - wie zuvor beschrieben - der N. ischiadicus dargestellt. Die Haut und die Muskelfaszie wurden inzidiert, nachdem die Fäden vom ersten Eingriff entfernt worden waren. Anschließend wurde der M. soleus mit der Achillessehne dargestellt. Schließlich erfolgte die Kraftmessung der linken hinteren Extremität.

Nach Abschluss der Muskelkraftuntersuchung wurden die Tiere, nach Vertiefung der Narkose, thorakotomiert und durch direkte Punktion des linken Ventrikels mittels einer EDTA-beschichteten Spritze Blut entnommen. Der linke M. soleus wurde ebenfalls entnommen und für nachfolgende histologische Untersuchungen in 4%iger Formalinlösung fixiert.

## Berechnung der Muskelkraft

Zur Erfassung der Muskelkraft wurden von jedem Versuchstier vier Datensequenzen erhoben: zwei für die Kurzkontraktion und zwei für die tetanische Kontraktion jeweils für den rechten und linken Muskel (Abbildung 3.4). Die erhobenen Rohdaten wurden umgerechnet (Microsoft Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), so dass die erste Kontraktion zum Zeitpunkt 0s erfolgte und die Zugkraft des Muskels während der Relaxationsphase gleich 0N war. Um den relativen Kraftzuwachs bei Kurzkontraktion zu ermitteln, wurden die Maximalwerte von 5 kontinuierlichen Kurzkontraktionen des linken M. soleus gemittelt (Abb. 3.5-A) und diese durch den Mittelwert der Maximalwerte von 5 kontinuierlichen Kurzkontraktionen des rechten M. soleus (Abbildung 3.5-B) dividiert. Auf gleiche Weise wurde der relative Kraftzuwachs bei Tetanie errechnet (Abbildung 3.5-C und 3.5-D) und die Kraft des linken M. soleus prozentual zur Kraft der kontralateralen Seite angegeben.



**Abbildung 3.5:** Exemplarische Datensequenzen der Muskelkraft des M. soleus einer Ratte. Auf der x-Achse wird die Zeit abgebildet und auf der y-Achse die Zugkraft des Muskels bei direkter Stimulation des N. ischiadicus mit 9mA / 75Hz. Dargestellt sind im oberen Feld jeweils 5 Kurzkontraktionen des geschädigten linken M. soleus (A) und des nicht geschädigten rechten M. soleus (B) nach entsprechender Stimulation des N. ischiadicus für 0.1s. Im unteren Feld ist die Tetanie des geschädigten linken M. soleus (C) und des nicht geschädigten rechten M. soleus (D) nach 5-facher Stimulation des N. ischiadicus für jeweils 3s zu erkennen.

## 3.2.2 Immunhistochemische und histologische Untersuchungen

### 3.2.2.1 BrdU Immunhistochemie

Die Untersuchung der Proliferationsaktivität der Skelettmuskulatur erfolgte mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des BrdU-Einbaus in die DNA der Skelettmuskelzellen. Dafür wurde 48 Stunden vor Gewebeentnahme allen Versuchstieren 50mg/kg KG BrdU i.p. appliziert. Das BrdU wurde mittels Immunhistochemie an Gewebeschnitten detektiert. Hierzu wurde an den Primär-Antikörper ein Sekundär-

Antikörper gebunden, welcher gleichzeitig mit einem Enzym gekoppelt ist, das nach Zugabe eines Substrates die Entstehung eines Chromogens erlaubt. Dadurch kann das gesuchte Antigen indirekt visualisiert und somit das BrdU lichtmikroskopisch quantitativ analysiert werden.

Der M. soleus wurde in 4% Formalin gelegt, für 3 Tage fixiert und in Paraffin eingebettet. Als nächstes folgte die Anfertigung von 5µm dünnen Gewebe-Schnitten. Der Muskel wurde dafür in seiner longitudinalen Ebene vom proximalen zum distalen Ansatz geschnitten, so dass der Muskel in seiner vollen Länge auf den poly-L-Lysinbeschichteten Objektträgern lichtmikroskopisch evaluiert werden konnte. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, zur Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle behandelt (DAKO Target Retrieval Solution, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bzw. unspezifischer Peroxidase-Aktivität mit entsprechenden Blocker-Lösungen überschichtet (DAKO Protein Block X0909, 3% bzw. DAKO Peroxidase Block).

Um das eingebaute BrdU im Schnitt zu detektieren, wurde das Gewebe mit einem monoklonalen anti-BrdU Primär-Antikörper (M0744, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 4°C für 18h in einer Verdünnung von 1:50 mit Antikörperverdünnungsmedium (S3022, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Der Zweitantikörper entstammte dem kommerziell erhältlichen Kit LSAB (K0609, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers angesetzt. Die nachfolgende Inkubation mit dem DAB Farbstoff (3.3'- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, S3000, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) führte nach ca. 13min zu einer Reaktion, welche die BrdU positiven Zellkerne braun färbte. Die Präparate wurden mit Mayers Hämalaun Kernfärbung über 5min gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und anschließend mit Deckglasklebstoff eingedeckt (Pertex, Medite, Burgdorf, Deutschland). Die Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter 3.2.2.4 beschrieben.

### **3.2.2.2 CAE Histologie**

Für den Nachweis infiltrierender Leukozyten wurden die Schnittpräparate des M. soleus lichtmikroskopisch untersucht. Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden mit dem Mikrotom in 5µm Schnitte geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung und die Behandlung mit Naphtol AS-D Chlorazetat (Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Deutschland). Die Schnittpräparate wurden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt. Infiltrierende

Leukozyten wurden dabei mittels Darstellung des Naphtol-Verbundes durch Hydrolyse des Naphtol AS-D Chlorazetates von Leukozyten-spezifischen-Esterasen sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter 3.2.2.4 beschrieben.

### 3.2.2.3 TUNEL Histologie

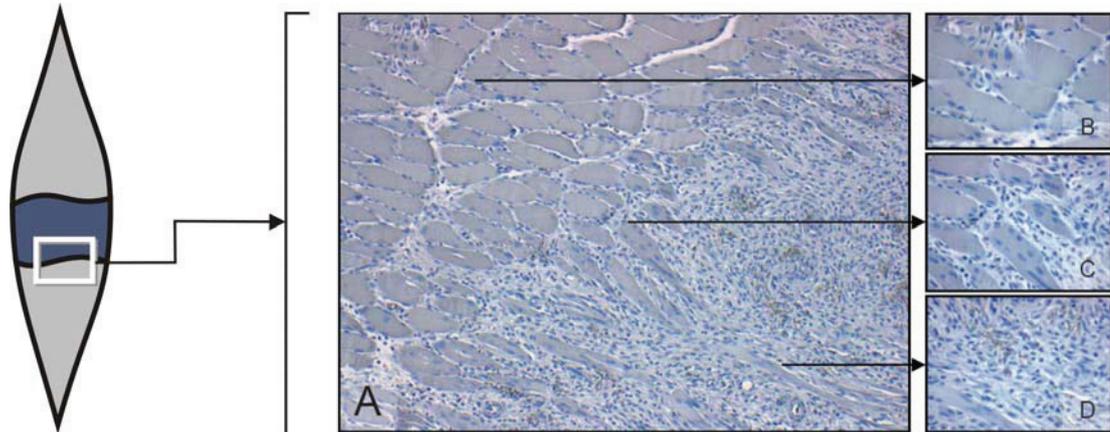
Zum histomorphologischen Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen wurden die Präparate mittels der TUNEL-Methode (S7101 ApopTag kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) untersucht. Bei der TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) wird durch das Enzym terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen ein biomarkiertes dUTP angehängt, dessen Biotin im Anschluss durch einen farblich markierten Antikörper sichtbar gemacht wird. Im einzelnen wurde die spezifische Bindung von Digoxigenin Nucleotiden an die freien 3'-OH Enden der fragmentierten DNA von apoptotischen Zellen durch das TdT katalysiert. Die gebundenen Nucleotide bildeten daraufhin ein Heteropolymer aus Digoxigenin-11-dUTP und dATP, welche nach Zusatz von Anti-Digoxigenin Antikörper binden. Das Anti-Digoxigenin-Antikörperfragment trägt das konjugierte Peroxidaseenzym, welches ein Farbsubstrat umsetzt.

Dafür wurden die vorhandenen Schnitte, wie zuvor beschrieben, geschnitten, in Xylol deparaffiniert und mit PBS gewaschen. Es folgte ein Proteinase K-Verdau (20µg/ml) für 15min bei Raumtemperatur und Waschen mit PBS. Nach 3% Peroxidase-Behandlung und PBS Spülung wurden die Schnitte als erstes mit „Equilibration-Puffer“ für 10s und dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1h mit TdT-Enzym-Puffer aus dem ApopTag-Kit inkubiert. Nachfolgend wurde der „Stop/Wash-Puffer“ aufgetragen und für 10min erneut inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift in PBS wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30min mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Antikörper behandelt. Schließlich folgten vier Waschvorgänge, eine Inkubation über 5min mit DAB-Farbstoff und dreimaliges Waschen mit PBS. Die Präparate wurden mit Mayers Hämalaun Kernfärbung über 5min gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und mit Deckglasklebeittel eingedeckt. Die Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter 3.2.2.4 beschrieben.

### 3.2.2.4 Histologische Auswertung

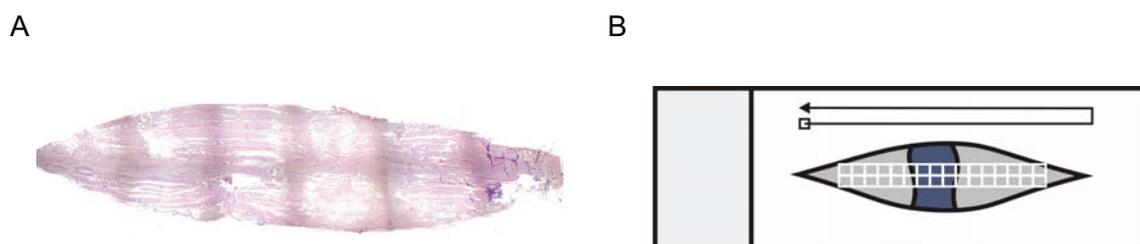
Aufgrund der Heterogenität des Traumas wies das zu untersuchende Gewebe keine einheitliche Struktur auf und ein morphologischer Unterschied zwischen intakten

Muskelzellen und Zellfragmenten war nicht immer exakt möglich. So war an jedem Präparat ungeschädigtes Muskelgewebe, traumatisiertes Muskelgewebe und eine Übergangszone (Penumbrazone) zu identifizieren (Abbildung 3.6). Um dieses morphologisch-inhomogene Gewebe objektiv zu analysieren, wurde der Muskel über seine gesamte Länge untersucht und quantitativ ausgewertet (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.6:** Abbildung der Übergangszone (Penumbra) zwischen gesundem und geschädigtem Gewebe. Lichtmikroskopische Abbildungen [A: 100x Vergrößerung; B bis D: 400x Vergrößerung Hämalaun-Färbung/Bromodeoxyuridine (BrdU) Negativkontrolle] des linken M. soleus 7 Tage nach Traumainduktion. Dargestellt sind sowohl ungeschädigtes (B) als auch geschädigtes Muskelgewebe (C und D).

Die Auswertung der TUNEL-, BrdU- und CAE-Färbung erfolgte an einem Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss) unter 400x Vergrößerung, wobei zunächst mit Hilfe eines Mikrometermaßstabes die Größe des Gesichtsfeldes bestimmt wurde.



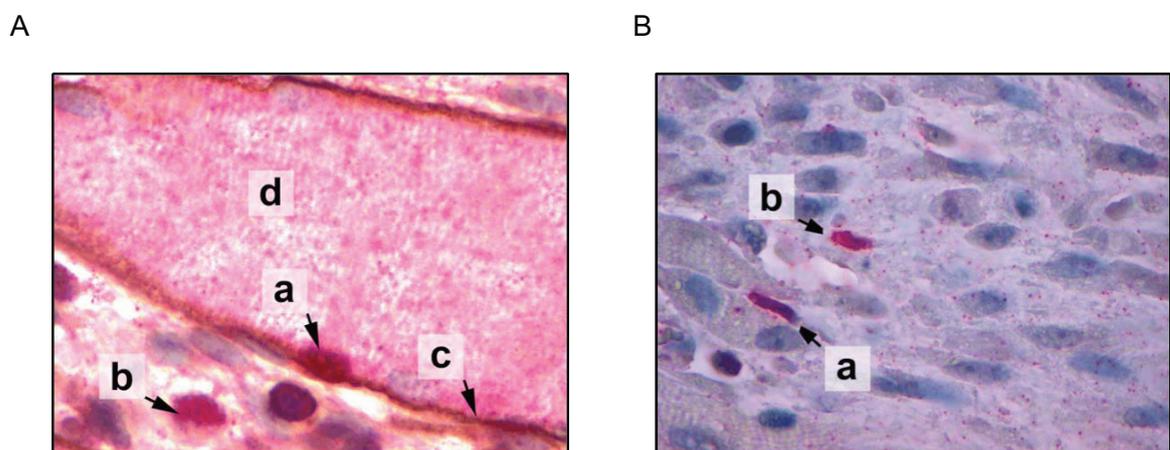
**Abbildung 3.7:** Exemplarische Darstellung einer histologischen Untersuchung am linken M. soleus (A). Dargestellt ist links eine lichtmikroskopische Aufnahme von 12 nebeneinander liegenden Gesichtsfeldern mit 40x Vergrößerung des M. soleus. Die Auswertung der TUNEL-, BrdU- und CAE-Präparate erfolgte longitudinal über 30 Gesichtsfelder in 400x Vergrößerung (15 Gesichtsfelder von proximal zu distal und 15 Gesichtsfelder von distal zu proximal). Grau ist an der rechten Illustration das geschädigte und blau das nicht geschädigte Areal des Muskels abgebildet (B).

Um das Gewebe auszuwerten, erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung

zweimal über die gesamte Länge des M. soleus vom proximalen zum distalen Ansatz (Abbildung 3.7). Dabei wurden von jedem Schnitt durchschnittlich 30 Gesichtsfelder erfasst und die Anzahl der positiv gefärbten Zellen bestimmt. Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert der Zellen pro Gesichtsfeld gebildet und in Zellen pro mm<sup>2</sup> umgerechnet.

### 3.2.2.5 BrdU/Laminin und BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie

Um die Anzahl der proliferierenden Satellitenzellen zu ermitteln, war es notwendig, eine doppelimmunhistochemische Analyse mit Desmin oder Laminin und BrdU durchzuführen. Hierfür wurde - wie oben beschrieben - ein polyklonaler Ziegen-anti-Desmin-Antikörper (1:100; 1h Inkubation bei 37°C; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) oder ein polyklonaler Kaninchen-anti-Laminin-Antikörper (1:50; 1h Inkubation bei 37°C; Dako Cytomation) und der o.g. monoklonale Maus-anti-BrdU-Antikörper mit 3.3-Diaminobenzidin und Fuchsin als Chromogene verwendet. Durch Markierung der Laminin-positiven Basallamina war es möglich in der gesunden Zone die proliferierenden BrdU-positiven Satellitenzellen unterhalb der Laminin-positiven Membran zu identifizieren [Smith et al. 2001]. Desmin ist ein zytoskeletales Filament, welches während der



**Abbildung 3.8:** Exemplarische Darstellung der proliferierenden Zellen in der ungeschädigten Zone (A) mittels BrdU/Laminin Doppelimmunhistochemie und der geschädigten Zone (B) mittels BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie; 1000x Vergrößerung. In der gesunden Zone (A) sind proliferierende BrdU-positiv Satellitenzellen (a) zu erkennen, welche sich unterhalb der Laminin-positiven Lamina basalis (c) der Muskelzelle (d) befinden. Dabei sind proliferierende BrdU-positiv interstitielle Zellen (b) ausserhalb der Lamina basalis zu finden. In der geschädigten Zone (B) sind Satellitenzellen (a) BrdU- und Desmin-positiv, wobei interstitielle Zellen (b) sich BrdU-einfach-positiv darstellen lassen.

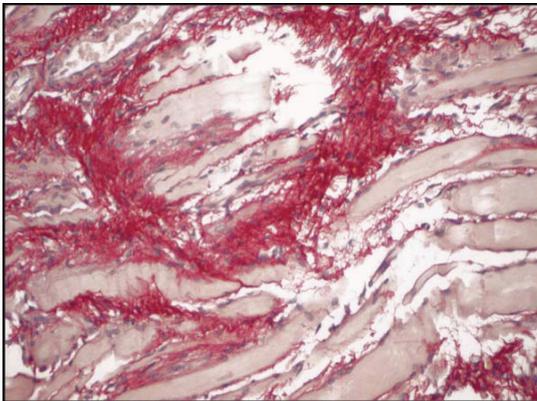
Entwicklungsphase exprimiert und als Marker verwendet wird, um zwischen Fibroblasten und Myoblasten zu unterscheiden [Sjoberg et al. 1994].

Die Auswertung erfolgte pro 100 BrdU positive Zellen (Abbildung 3.8) in 10 Gesichtsfeldern (1000x Vergrößerung; Öl-Objektiv) sowohl an der nicht traumatisierten Zone (mittels BrdU/Laminin Doppelimmunhistochemie) als auch in der geschädigten Zone (mittels BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie). Die Berechnung der proliferierenden Satellitenzellen erfolgte durch Multiplikation der absoluten Zahl BrdU positiver Zellen pro  $\text{mm}^2$  mit dem prozentualen Anteil der Satellitenzellen, ermittelt durch die Doppelimmunhistochemie. Die Satellitenzellanzahl ist als Zellen pro  $\text{mm}^2$  angegeben.

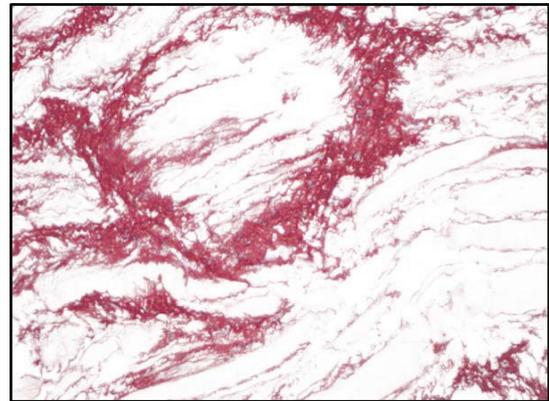
### 3.2.2.6 Sirius-Red Histologie

Die metabolische Aktivität der muskulären Fibroblasten wurde durch die Kollagenproduktion und Deposition am Muskel gemessen. Hierfür erfolgte die Sirius-Red Färbung.

A



B



**Abbildung 3.9:** Exemplarische Darstellung der Sirius-Red Untersuchung beim M. soleus (A). Die Kollagenfasern (rot) wurden digital von den übrigen Bildstrukturen isoliert (B) und anschließend deren Fläche prozentual zur Fläche des Gesichtsfeldes berechnet; 200x Vergrößerung.

Sirius-Red ist ein anionischer Farbstoff, der aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Über einen Zeitraum von 40min wurden die Schnitte bei 60°C entparaffinisiert. Dann folgte die Lagerung in Xylol für 10min und eine absteigende Alkoholreihe. Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte gewässert und anschließend in Sirius-Red-Färbelösung (Direct Red 80, Aldrich, Toronto, Canada)

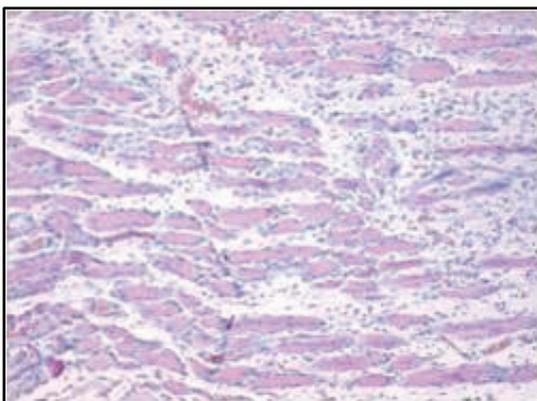
mit Bouin's-Lösung behandelt. Danach folgte eine kurze Spülung und der zügige Durchzug durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Damit wurden die Kollagenfasern sichtbar gemacht.

Zur Auswertung der Sirius-Red-Färbung wurden 12 Gesichtsfelder digital aufgenommen (Zeiss Axiocam MRC 5; Göttingen, Germany; 200x Vergrößerung) und die Bilder mittels der „Threshold“-Funktion von Photoshop (Photoshop Version 7; Adobe Systems Europe, Uxbridge, UK) digital bearbeitet. Damit wurden die Kollagenfasern von den restlichen Bildstrukturen isoliert. Die Pixelzahl der Kollagenfasern wurde anschließend planimetrisch mit Photoshop berechnet und zum gesamten Gesichtsfeld prozentual angegeben (Abbildung 3.8).

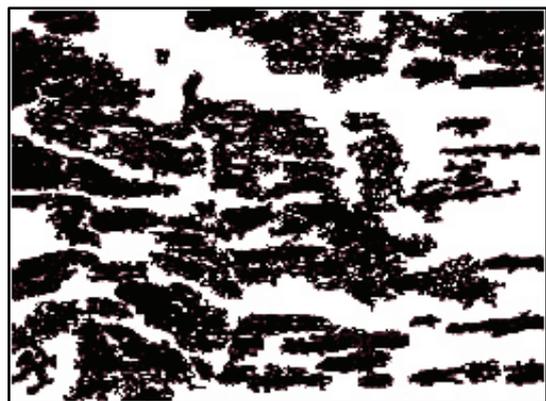
### 3.2.2.7 Muskelgewebefraktion

Zur Auswertung der Muskelgewebefraktion wurden 5 Gesichtsfelder von jedem BrdU-Präparat über die gesamte Länge des Muskels digital aufgenommen (Zeiss Axiocam MRC 5; Göttingen, Germany; 40x Vergrößerung) und die Bilder mittels der „magic wand“-Funktion von Photoshop digital bearbeitet. Damit wurden die Muskelzellen von den restlichen Bildstrukturen manuell isoliert. Die Pixelzahl der Muskelfaser wurde anschließend planimetrisch berechnet und zum gesamten Gesichtsfeld prozentual angegeben (Abbildung 3.10).

A



B



**Abbildung 3.10:** Exemplarische Darstellung der planimetrischen Untersuchung des M. soleus (A). Die Muskelzellen (blau dargestelltes Zytoplasma) wurden digital von den übrigen Bildstrukturen isoliert (B) und anschließend deren Fläche (schwarz dargestellt) prozentual zur Fläche des Gesichtsfelds berechnet; 40x Vergrößerung.

### 3.2.3 Laboranalysen

Blutproben wurden am Ende der Versuche in einer EDTA beschichteten Spritze asserviert. Das Blutbild wurde mittels eines automatischen Zellzählers (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) ausgewertet. Anschließend wurde das Blut zur Gewinnung von Blutplasma 10min bei 3600 Umdrehungen/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der so entstandene Plasmaüberstand wurde entnommen und darin die Creatin-Kinase Aktivität photometrisch (UniCel DxC 800 Synchron Clinical System; Beckman Coulter; Krefeld; Deutschland) mittels des entsprechenden Testkits (Beckman Coulter; Krefeld; Deutschland) bestimmt.

### 3.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Am Tag 0 wurde der linke M. soleus von 60 Versuchstieren traumatisiert. An zusätzlichen 15 Ratten wurde ein sham-Muskeltrauma durchgeführt. Daraufhin wurden die Tiere mit Muskelkontusion in einem 24h-Rhythmus entweder mit G-CSF (Neupogen®, 20µg/kg KG; n=30; Trauma/G-CSF) oder 0.9% NaCl (0.6ml/kg KG; n=30; Trauma) i.p. injiziert. Bei der sham-Gruppe wurde der linke M. soleus, wie beschrieben, mobilisiert und mittels der instrumentierten Klemme das Muskeltrauma angedeutet, ohne dabei den Muskel direkt zu quetschen. Die sham-operierten Tiere dienten als Kontrolle und erhielten täglich 0.9% NaCl i.p. (0.6ml/kg KG; n=15; sham).

Am 4., 7. und 14. postoperativen Tag wurde die Muskelkraft des M. soleus bilateral gemessen und Gewebe asserviert. Um die Proliferation der Muskelzellen zu erfassen, wurde jedem Versuchstier 48h vor Gewebeentnahme 50mg/kg KG BrdU i.p. injiziert. Für das Versuchsvorhaben werden folgende Versuchsgruppen zusammengestellt:

1. **sham** Gruppe (n=15)

Sham-Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. NaCl Injektion an Tag 4, 7 und 14; Biomechanische Untersuchung und Gewebeasservierung; n=5 pro Zeitpunkt.

2. **Trauma** Gruppe (n=30)

Offenes Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. NaCl Injektion an Tag 4, 7 und 14; Biomechanische Untersuchung und Gewebeasservierung; n=10 pro Zeitpunkt.

3. **Trauma/G-CSF** Gruppe (n=30)

Offenes Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. G-CSF Injektion an Tag 4, 7 und 14; Biomechanische Untersuchung und Gewebeasservierung; n=10 pro Zeitpunkt.

### **3.4 Statistische Analyse**

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels zweifaktorieller Varianzanalyse [„two way analysis of variance“ (2-way-ANOVA)], gefolgt vom Holm-Sidak Test. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der Software SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, SanRafael, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit  $p < 0.05$  als signifikant angesehen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, USA) in Diagrammen dargestellt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Allgemeine Beobachtungen

Alle Versuchstiere wachten nach der Traumainduktion komplikationslos auf. Die linke Extremität wurde während der ersten Tage von den Tieren geschont und deshalb auch nicht voll belastet. Die Wunden heilten zeitgerecht und waren reizlos, trocken und ohne Zeichen einer lokalen Infektion.

### 4.2 Muskelkraft

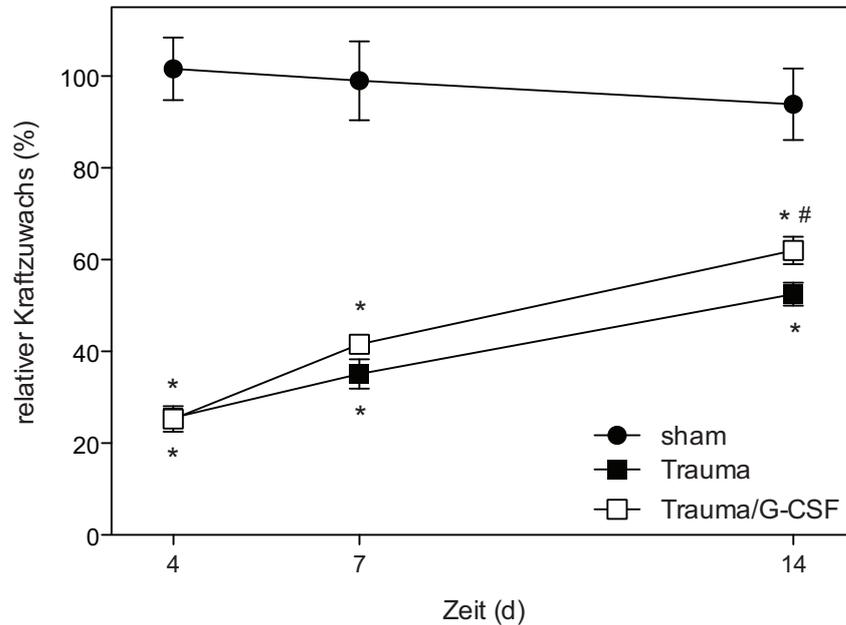
Die Muskelkraft (in N) des ungeschädigten rechten M. soleus zeigte bei allen Gruppen und Zeitpunkten sowohl im Sinne der Kurzkontraktion als auch im Sinne der Tetanie keine statistisch signifikanten Unterschiede zum linken sham-operierten M. soleus. Es konnte an der rechten Seite im Durchschnitt eine Kurzkontraktion von  $\sim 0.67\text{N}$  und eine Tetanie von  $\sim 1.09\text{N}$  gemessen werden.

#### 4.2.1 Kurzkontraktion

Durch die Messung der Muskelkraft wird ein funktioneller Parameter der Muskulatur erfasst und quantitativ zur gesunden Gegenseite berechnet. Die Kurzkontraktion der sham-operierten Tieren zeigte keine Veränderungen über 14 Tage (Abbildung 4.1) und blieb über den gesamten experimentellen Verlauf konstant zwischen 95% und 100% (absolute Werte, siehe 4.2).

Nach Traumainduktion war in beiden Gruppen (Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe), verglichen mit der sham-Gruppe eine signifikante Reduktion der Kurzkontraktion zu beobachten. Das Muskeltrauma ging mit einer wesentlichen Einbuße der Kurzkontraktion um ca. 22% vier Tage nach Traumainduktion einher. An den darauffolgenden Zeitpunkten verbesserte sich das Kontraktionsvermögen des verletzten Muskels zwar, dennoch war die Regeneration des Gewebes nicht in der Lage, die Muskelkraft komplett zu restaurieren und Kontrollwerte der sham-operierten Tiere zu erreichen. Somit betrug die relative Kraft der Kurzkontraktion nach 14 Tagen  $\sim 54\%$ . Diese Kinetik weist auf ein schweres Kontusionstrauma hin, welches mit einer erheblichen

Einbuße der Kontraktionskraft über mehrere Tage nach Traumainduktion vergesellschaftet ist.

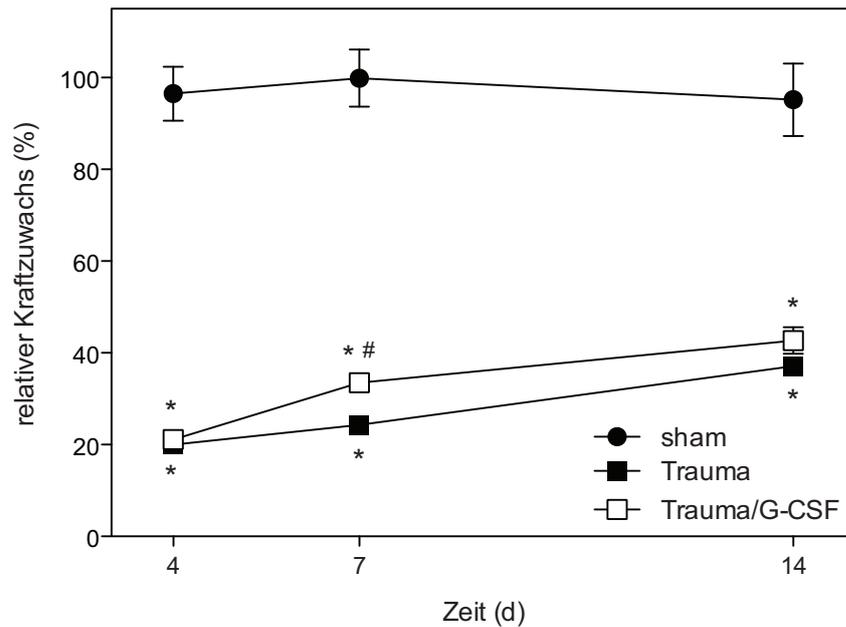


**Abbildung 4.1:** Relativer Kraftzuwachs der Kurzkontraktion des traumatisierten M. soleus im Vergleich zur gesunden Gegenseite nach chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \*  $p < 0.05$  vs. sham, #  $p < 0.05$  vs. Trauma.

Die G-CSF-Behandlung hatte einen positiven Einfluss auf die Kurzkontraktion der traumatisierten Skelettmuskulatur. So war im einzelnen ein Anstieg des Kontraktionsvermögens am 7. Tag, insbesondere aber am 14. Tag, gegenüber der NaCl-behandelten Trauma-Gruppe zu beobachten.

#### 4.2.2 Tetanie

Durch Provokation und Messung der Tetanie wurde eine ähnliche Kinetik der Muskelkraft nach Trauma festgestellt. Tiere mit Trauma (Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe) zeigten zu jedem Zeitpunkt signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu sham-operierten Tieren (Abbildung 4.2). Die G-CSF-Applikation führte wiederum zu einem signifikanten Anstieg des Kontraktionsvermögens am 7. Tag und zu einem wesentlichen Anstieg am 14. Tag nach Trauma im Vergleich zur NaCl-Behandlung.

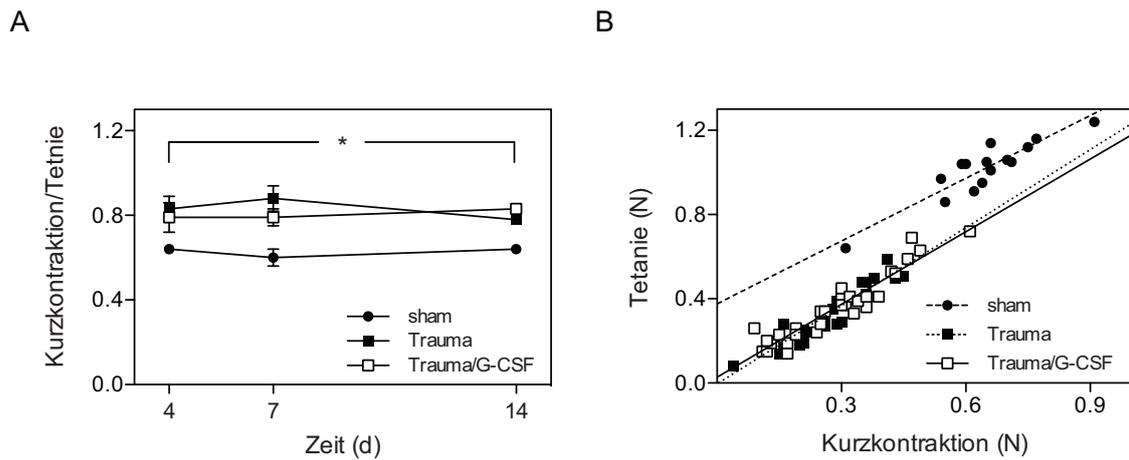


**Abbildung 4.2:** Relativer Kraftzuwachs der Tetanie des traumatisierten M. soleus im Vergleich zur gesunden Gegenseite nach chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \* p<0.05 vs. sham, # p<0.05 vs. Trauma.

#### 4.2.3 Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie

Die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie spiegelt den Anteil der langsam und schnell kontrahierenden Muskelfasern innerhalb des untersuchten Muskels wider. Die Berechnung dieser Ratio zeigte einen Anstieg bei den Gruppen mit Muskeltrauma verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe. Die Applikation von G-CSF führte zu einer leichten Abnahme der Ratio am 4. und 7. Tag in Richtung der sham-operierten Tiere (Abbildung 4.3).

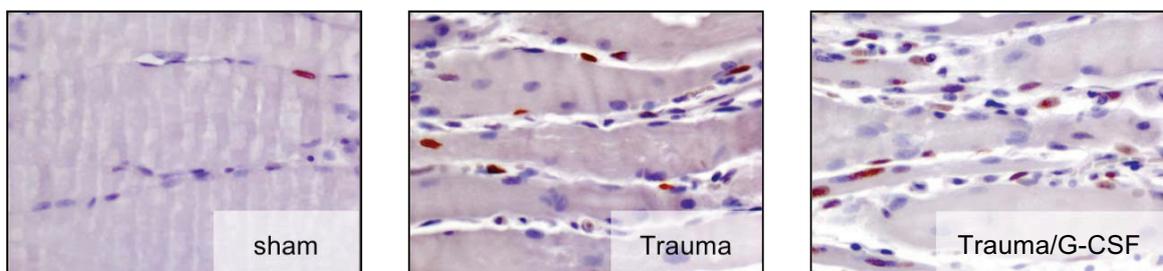
Die Regressionsanalyse zwischen Kurzkontraktion und Tetanie zeigte für alle drei Gruppen eine signifikante Korrelation (Determinationskoeffizient für die sham-Gruppe:  $r^2=0.839$ , Trauma-Gruppe:  $r^2=0.873$  und Trauma/G-CSF-Gruppe:  $r^2=0.898$ ). Zusätzlich ergab sich für die NaCl-behandelten Tiere nach Trauma im Vergleich zu den G-CSF-behandelten Tieren eine geringgradig steiler verlaufende Gerade. Das Ergebnis der Zunahme der Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie lässt auf einen morphologischen Wechsel des langsam kontrahierenden M. soleus zu einem schnell kontrahierenden Muskel nach Trauma (Abbildung 4.3) schließen.



**Abbildung 4.3:** Berechnung der Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie (A) und der Korrelation zwischen Kurzkontraktion und Tetanie (B) des traumatisierten linken M. soleus nach G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienen als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \* p<0.05 vs. sham.

### 4.3 Proliferation

Nach Muskeltrauma werden regenerative Prozesse eingeleitet, welche mit einem Anstieg der Muskelzellproliferation einhergehen.

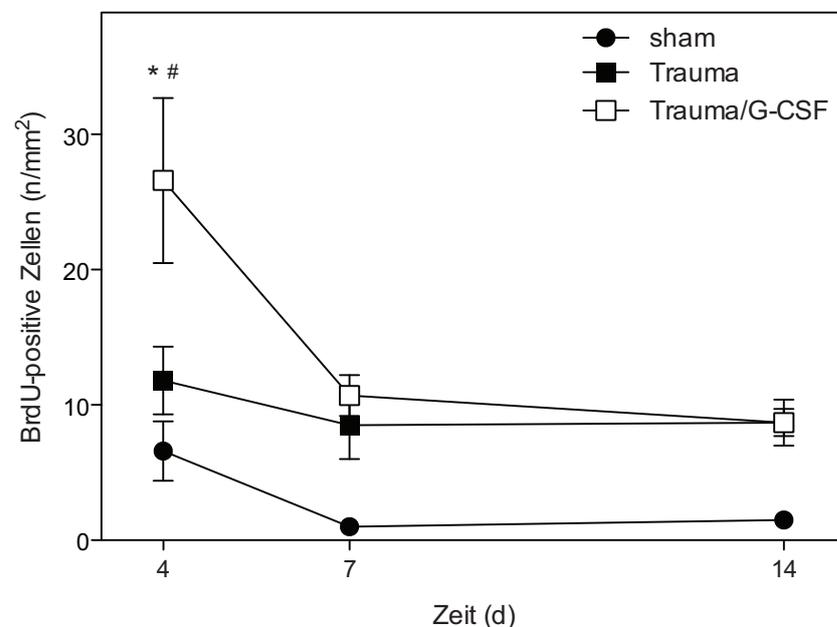


**Abbildung 4.4:** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Skelettmuskulatur von Tieren nach sham-Trauma am 4. Tag (links, **sham**). Die BrdU-Färbung zeigt eine geringe Muskelzellproliferation. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und NaCl-Behandlung am 4. Tag (mittig, **Trauma**). Die BrdU-Färbung zeigt eine mäßige Zellproliferation. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und G-CSF-Behandlung am 4. Tag (rechts, **Trauma/G-CSF**). Die BrdU-Färbung zeigt eine ausgeprägte proliferative Aktivität. Vergrößerung x400.

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität der Muskelzellen erfolgte über den immunhistochemischen Nachweis der Inkorporation von BrdU. Das BrdU wurde 48h vor

Gewebeentnahme den Tieren i.p. injiziert und als Thymidin-Analogon in die DNA replizierender Zellen eingebaut (Abbildung 4.4).

Die quantitative lichtmikroskopische Analyse der BrdU-positiven Zellen (Abbildung 4.4 und 4.5) zeigte sowohl bei der Trauma-Gruppe als auch bei der Trauma/G-CSF-Gruppe im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten einen Anstieg der proliferativen Aktivität nach Trauma. 4 Tage nach Traumainduktion führte die Applikation von G-CSF zu einem ca. 2-fach höheren Anstieg der Muskelzellproliferation im Vergleich zu den NaCl-behandelten traumatisierten Tieren. Nachfolgende Untersuchungen der Muskelzellproliferation am 7. und 14. Tag zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Trauma-Gruppe und der Trauma/G-CSF-Gruppe.

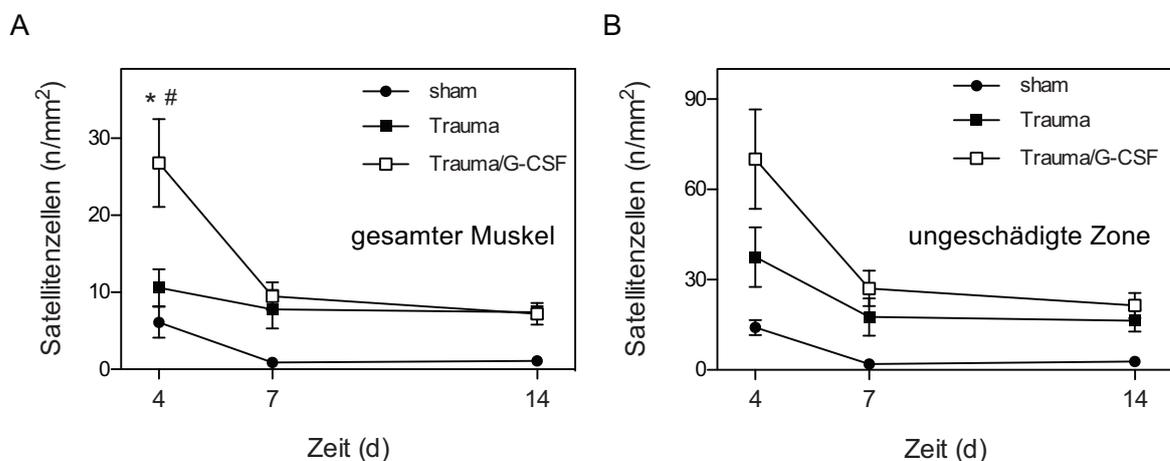


**Abbildung 4.5:** Anzahl proliferierender Zellen im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tieren mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \* p<0.05 vs. sham, # p<0.05 vs. Trauma.

Zur weiterführenden Charakterisierung der proliferierenden Zellen wurden doppelimmunhistochemische Färbungen und quantitative Analysen in der ungeschädigten Zone als auch im gesamten traumatisierten Muskel durchgeführt. Mittels der BrdU/Laminin Doppelfärbung ließen sich in der ungeschädigten Zone proliferierende Zellen und die Basallamina der Muskelzellen gut darstellen. Die quantitative Analyse

ergab in allen drei experimentellen Gruppen und den untersuchten Zeitpunkten ~70% BrdU-positive Zellen, welche sich unterhalb der Basallamina befanden. Proliferierende Satellitenzellen wurden am gesamten Muskel mittels einer BrdU/Desmin Doppelfärbung nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass zu allen Zeitpunkten ~90% der proliferierenden Zellen Desmin exprimierten, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

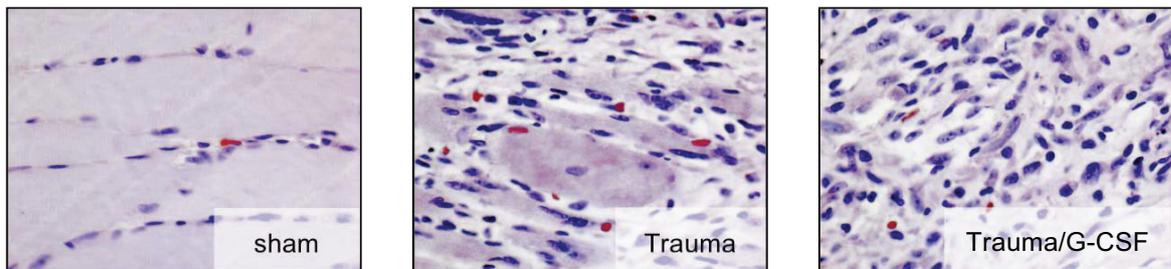
Die quantitative Analyse der BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie zeigte im Vergleich zu der NaCl-Behandlung einen signifikanten Anstieg der Satellitenzellproliferation nach täglicher G-CSF-Behandlung am 4. Tag nach Traumainduktion (Abbildung 4.6-A). Zu späteren Zeitpunkten waren keine Unterschiede mehr zwischen der Trauma- und der Trauma/G-CSF-Gruppe festzustellen. Eine ähnliche Kinetik ließ sich nach Analyse der BrdU/Laminin Doppelimmunhistochemie feststellen (Abbildung 4.6-B). Nach G-CSF-Behandlung zeigte sich in der ungeschädigten Zone eine fast 6-fach erhöhte Proliferation im Vergleich zu der sham-Gruppe 4 Tage nach Trauma, wobei NaCl-behandelte Tiere lediglich einen 3-fachen Anstieg der Proliferation im Vergleich zur sham-Gruppe zeigten.



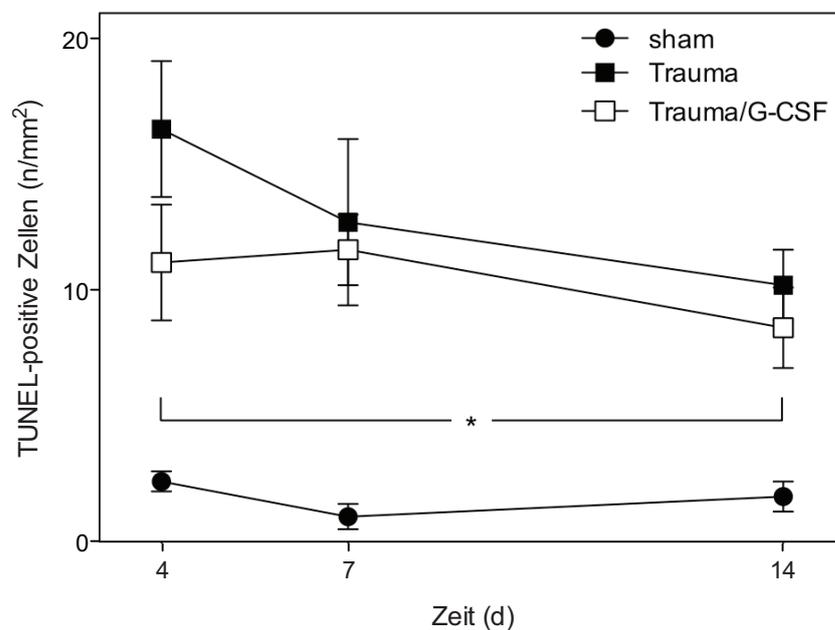
**Abbildung 4.6:** Anzahl der Satellitenzellen pro  $\text{mm}^2$ . Links ist die Anzahl der Satellitenzellen pro  $\text{mm}^2$  im gesamten Muskel aufgeführt, welche sich doppelimmunhistochemisch Desmin-positiv und gleichzeitig BrdU-positiv darstellten (A). Rechts ist die Anzahl der Satellitenzellen pro  $\text{mm}^2$  in der ungeschädigten Zone zusammengefasst, welche sich doppelimmunhistochemisch als BrdU-positive Zellen unterhalb der Laminin-positiven Lamina basalis darstellten (B). Abgebildet sind Tiere mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**,  $n=10$  pro Zeitpunkt) und Tiere mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**,  $n=10$  pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**,  $n=5$  pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \*  $p<0.05$  vs. sham, #  $p<0.05$  vs. Trauma.

#### 4.4 Apoptose

Der apoptotische Zelltod stellt in pathologischen Prozessen ein Maß der Gewebeschädigung dar (Abbildung 4.7). Sham-operierte Tiere wiesen eine nahezu konstante Zahl an apoptotischen Zellen auf, welche über den gesamten 14-tägigen experimentellen Zeitraum zwischen 1 und 3 Zellen/mm<sup>2</sup> lag.



**Abbildung 4.7:** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur von Tieren nach sham-Trauma am 4. Tag (links, **sham**). Die TUNEL-Färbung zeigt eine geringe Muskelzellapoptose. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und NaCl-Behandlung am 4. Tag (mittig, **Trauma**). Die TUNEL-Färbung zeigt eine ausgeprägte Zellapoptose. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und G-CSF-Behandlung am 4. Tag (rechts, **Trauma/G-CSF**). Die TUNEL-Färbung zeigt eine geringere Zahl an apoptotischen Zellen gegenüber nicht mit G-CSF behandelten Tieren. Vergrößerung x400.



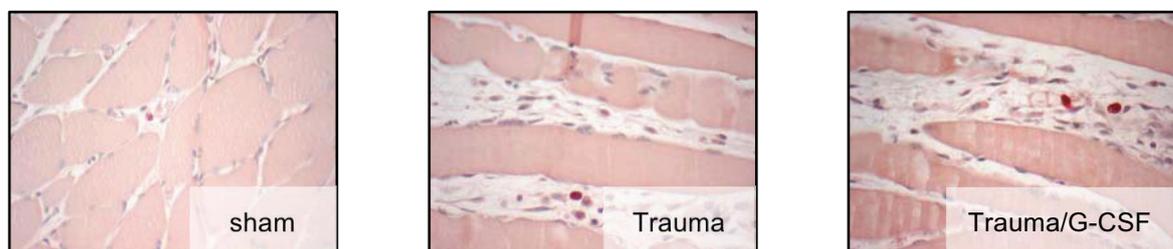
**Abbildung 4.8:** Anzahl apoptotischer Zellen im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tieren mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert±SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \* p<0.05 vs. sham.

Die Induktion des Muskeltraumas führte am 4. Tag zu einem fast 7-fachen Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen. Dieser Anstieg reduzierte sich im Verlauf und erreichte ein Minimum am 7. und 14. Tag nach Trauma (11 bis 12 Zellen/mm<sup>2</sup>). G-CSF führte am 4. Tag zu einer wesentlichen Reduktion der Muskelzellapoptose (10 Zellen/mm<sup>2</sup>). An den darauffolgenden Zeitpunkten glich sich die Zahl der apoptotischen Zellen bei der Trauma/G-CSF-Gruppe der apoptotischen Zellzahl der Trauma-Gruppe an.

Die sham-Gruppe zeigte im Vergleich zur Trauma/G-CSF- und Trauma-Gruppe am 7. und 14. Tag nach Trauma eine reduzierte Muskelzellapoptose. Hierbei konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der Trauma-Gruppe und der sham-Gruppe über den gesamten experimentellen Verlauf gezeigt werden (Abbildung 4.8).

#### 4.5 Leukozyteninfiltration

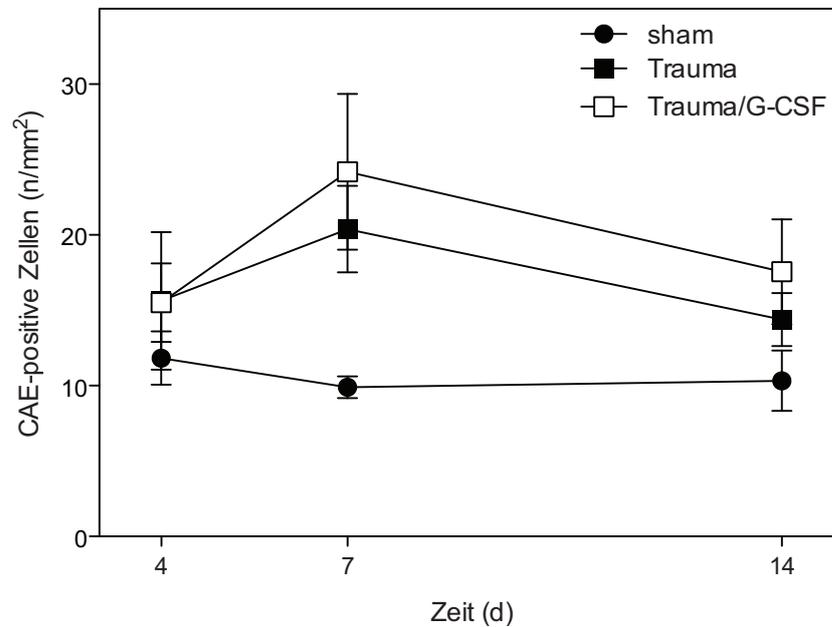
Die inflammatorische Gewebereaktion nach Trauma wurde durch Färbung der Leukozyten mittels Chlorazetatesterase nachgewiesen. Hierbei wurden die Granulozyten vom frühen Promyelozyten bis zum reifen Neutrophilen dargestellt (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur von Tieren nach sham-Trauma am 7. Tag (links, **sham**). Die CAE-Färbung zeigt eine geringe Leukozyten-Infiltration. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und NaCl-Behandlung am 7. Tag (mittig, **Trauma**). Die CAE-Färbung zeigt eine mäßige Leukozyteninfiltration. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und G-CSF-Behandlung am 7. Tag (rechts, **Trauma/G-CSF**). Die CAE-Färbung zeigt eine leicht erhöhte Leukozytenzahl. Vergrößerung x400.

Sham-operierte Tiere wiesen über den gesamten experimentellen Verlauf eine niedrige Anzahl von lokal infiltrierenden Leukozyten im Muskelgewebe auf. Das Trauma führte zu einer erhöhten lokalen Leukozyteninfiltration. Dabei stieg die Leukozytenzahl pro Fläche um das Doppelte am 7. Tag nach Trauma an und blieb nahezu konstant bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Chronische Behandlung mit G-CSF führte lediglich zu

einem leichten Anstieg gewebe-infiltrierender Leukozyten an den Tagen 7 und 14, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Trauma- und der Trauma/G-CSF-Gruppe zu beobachten war (Abbildung 4.10).

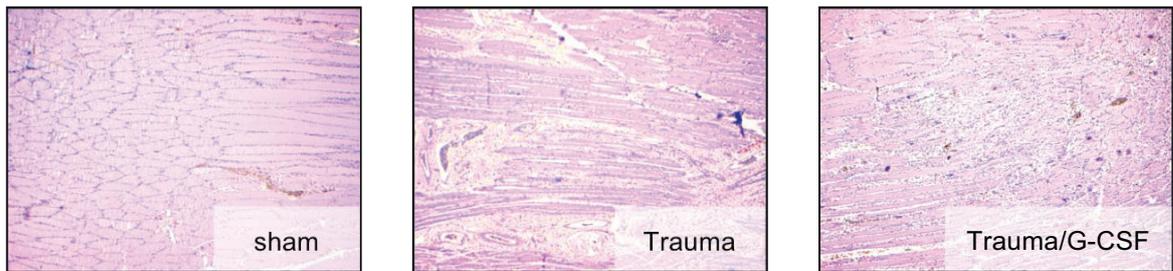


**Abbildung 4.10:** Anzahl infiltrierender Leukozyten im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tieren mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich.

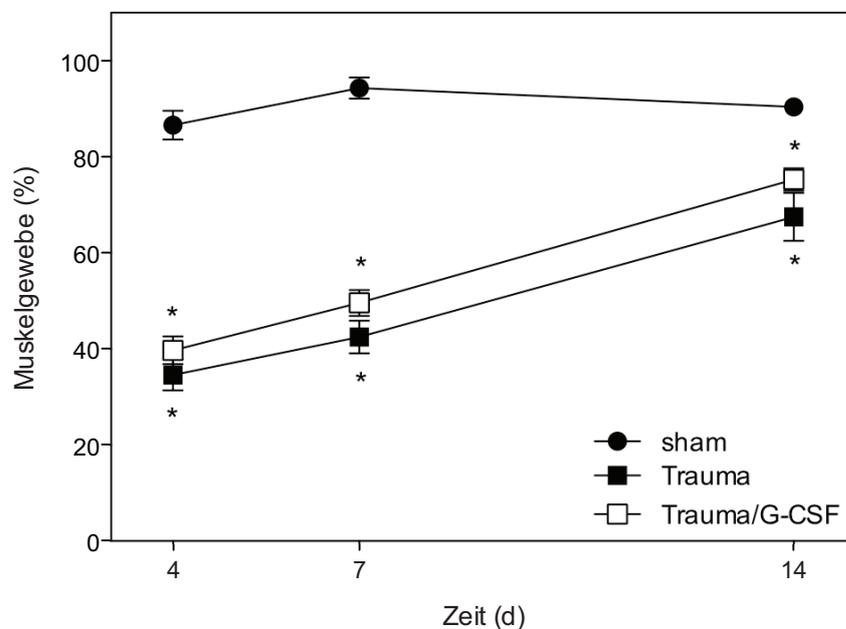
#### 4.6 Muskelgewebefraktion

Die Schädigung des Muskelgewebes wurde indirekt quantifiziert, indem die intakte Muskelgewebefläche prozentual zur gesamten Muskelschnittfläche berechnet wurde (Abbildung 4.11).

Die sham-Gruppe zeigte einen konstanten Anteil an Muskelgewebe, welcher über 14 Tage nach sham-Trauma nahezu bei 90% lag. Das Muskeltrauma führte zu einer signifikanten Reduktion des Muskelgewebeanteils an Tag 4 um ca. 50%. Im Verlauf regenerierte die Muskulatur kontinuierlich und erreichte am 14. Tag nach Trauma eine Muskelgewebefraktion von ca. 65%. Die tägliche Behandlung mit G-CSF reduzierte den initialen Muskelschaden und führte zu einem ausgeprägten Anstieg der Muskelgewebefraktion an den Tagen 4, 7 und 14 nach Trauma im Vergleich zu nicht G-CSF-behandelten Tieren (Abbildung 4.11 und 4.12).



**Abbildung 4.11:** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur von Tieren nach sham-Trauma am 14. Tag (links, **sham**). Die planimetrische Analyse zeigt eine hohe Muskelgewebefraktion. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und NaCl-Behandlung am 14. Tag (mittig, **Trauma**). Die planimetrische Analyse zeigt eine reduzierte Muskelgewebefraktion. Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und G-CSF-Behandlung am 14. Tag (rechts, **Trauma/G-CSF**). Die planimetrische Analyse zeigt einen deutlichen Anstieg der Muskelgewebefraktion im Vergleich zur Trauma-Gruppe. Vergrößerung x40.

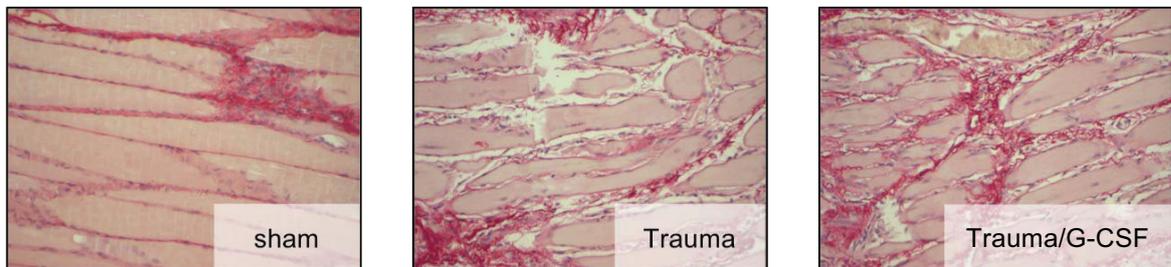


**Abbildung 4.12:** Muskelgewebefraktion im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tieren mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich; \* p<0.05 vs. sham.

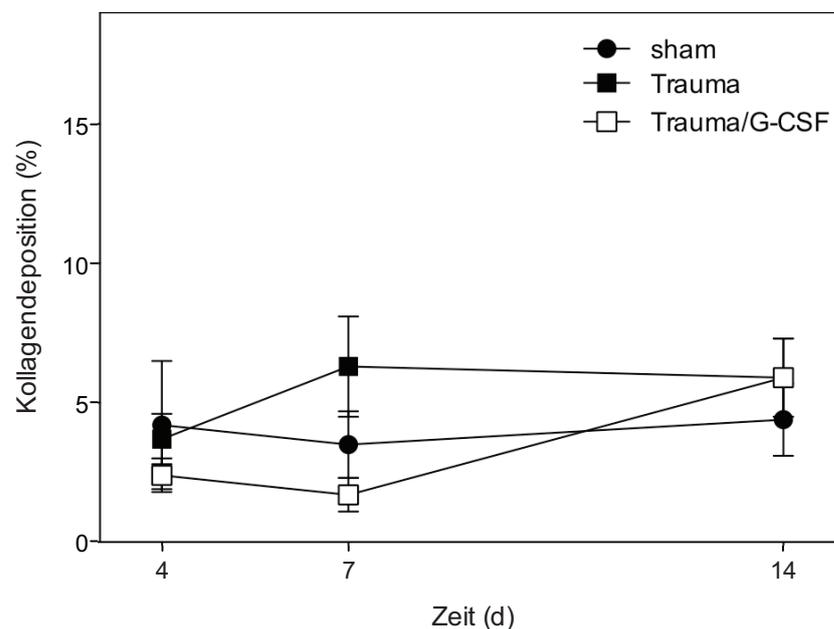
## 4.7 Kollagendeposition

Die Kollagenproduktion der muskulären Fibroblasten und die Bildung von Bindegewebe wurden durch die Deposition von Kollagen am Muskel ermittelt (Abbildung 4.13).

Die Kollagendeposition war zwischen den Gruppen und Zeitpunkten nahezu vergleichbar. Das Kollagen nahm in beiden Gruppen im traumatisierten Muskel 2% bis 6% der gesamten Fläche des Muskels ein (Abbildung 4.14). Eine statistische Signifikanz war zwischen den Gruppen und Zeitpunkten nicht zu beobachten.



**Abbildung 4.13:** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Skelettmuskulatur von Tieren 14 Tage nach sham-Trauma (links, **sham**). Lichtmikroskopisches Präparat der Skelettmuskulatur nach Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (rechts, **Trauma/G-CSF**) sowie nach Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (mittig, **Trauma**) am 14. Tag. Die planimetrische Analyse der Sirius-Red Färbung zeigte eine vergleichbare Kollagendeposition in allen drei Gruppen. Vergrößerung x200.



**Abbildung 4.14:** Kollagendeposition in % der untersuchten Gesichtsfelder des linken M. soleus. Dargestellt sind Tiere mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tiere mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Angegeben sind der Mittelwert $\pm$ SEM; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich.

#### 4.8 Systemische Leukozytenzahl

Die systemische Leukozytenzahl lag in der sham-Gruppe zwischen 4.4 und  $5.0 \times 10^9/L$  über den gesamten experimentellen Verlauf. Das Muskeltrauma beeinflusste die systemische Leukozytenzahl nicht wesentlich. Die tägliche G-CSF-Behandlung führte ebenso zu keinen wesentlichen Veränderungen der systemischen Leukozytenzahl (Tabelle 4.1). Zwischen den einzelnen Gruppen und untersuchten Zeitpunkten gab es somit keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Weiße Blutzellen ( $\times 10^9/L$ )	sham	Trauma	Trauma/G-CSF
Tag 4	5.0 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.4
Tag 7	4.5 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.4
Tag 14	4.4 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.8

**Tabelle 4.1:** Analyse der systemischen Leukozytenzahl. Dargestellt sind Tiere mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tiere mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich.

#### 4.9 Systemische Creatin-Kinase-Konzentration

Die photometrische Analyse der systemischen Creatin-Kinase als Marker für

Creatin-Kinase (U/L)	sham	Trauma	Trauma/G-CSF
Tag 4	1467 $\pm$ 203	1467 $\pm$ 203	1209 $\pm$ 920
Tag 7	1823 $\pm$ 543	2007 $\pm$ 295	1864 $\pm$ 194
Tag 14	1371 $\pm$ 315	1575 $\pm$ 207	1602 $\pm$ 207

**Tabelle 4.2:** Analyse der systemischen Creatin-Kinase. Dargestellt sind Tiere mit Muskeltrauma und chronischer G-CSF-Behandlung (**Trauma/G-CSF**, n=10 pro Zeitpunkt) und Tiere mit Muskeltrauma und chronischer NaCl-Behandlung (**Trauma**, n=10 pro Zeitpunkt). Tiere mit sham-Trauma dienten als Kontrolle (**sham**, n=5 pro Zeitpunkt). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben; 2-Way-ANOVA und post-hoc Vergleich.

eine lokale Muskelzellschädigung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in der initialen Phase nach Trauma. G-CSF-Applikation führte am 4. Tag lediglich zu einer leichten Reduktion der Creatin-Kinase (Tabelle 4.2). Zu späteren Zeitpunkten gab es zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

#### **4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass die tägliche Applikation von G-CSF nach schwerer Muskelverletzung zu einer deutlichen Verbesserung der Muskelregeneration führt.

Sham-operierte Tiere wiesen eine fast 100% Muskelkraft während des ganzen experimentellen Verlaufs auf. Eine massive Einbuße der Muskelkraft, sowohl von Kurzkontraktion als auch Tetanie, war bei Tieren mit Muskeltrauma 4 Tage nach Traumainduktion zu beobachten. Hierbei war die an den folgenden Zeitpunkten stattfindende Regeneration nicht in der Lage, die Muskelkraft vollständig zu restaurieren. Bei den G-CSF-behandelten Tieren konnte jedoch am 7. Tag ein verbesserter tetanischer Kraftzuwachs und am 14. Tag eine verbesserte Kurzkontraktion im Vergleich zur Trauma-Gruppe erfasst werden.

Die Berechnung der Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie zeigte zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Werte bei den Tieren mit Muskeltrauma (Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe) verglichen mit den sham-operierten Tieren. G-CSF scheint die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie nach Trauma nicht wesentlich zu beeinflussen.

Die Zellproliferation zeigte sich bei den Tieren mit Trauma (Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe) im Vergleich zu Tieren mit sham-Trauma erhöht. Am 4. Tag nach Traumainduktion wirkte G-CSF pro-proliferativ am traumatisierten Muskel und rief einen zusätzlichen signifikanten Anstieg der Zellproliferation im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren mit Muskeltrauma hervor. Gleichzeitig war eine signifikant erhöhte Proliferation der Satellitenzellen in der Trauma/G-CSF-Gruppe im Vergleich zur sham- und Trauma-Gruppe zu finden.

Während sham-operierte Tiere eine konstant niedrige apoptotische Zellrate über den gesamten 14-tägigen Verlauf aufwiesen, zeigte sich die Apoptose bei der Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe erhöht. Am 4. Tag lag die Apoptoserate in der Trauma/G-CSF-Gruppe unterhalb der Apoptoserate der Trauma-Gruppe. Weiterhin war ein

signifikanter Unterschied der Muskelzellapoptose zwischen der Trauma/G-CSF- und sham-Gruppe über den gesamten experimentellen Verlauf zu beobachten.

Das planimetrisch erfasste Muskelgewebe war bei der Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe verglichen mit der sham-Gruppe signifikant reduziert. Hierbei bewirkte die G-CSF-Behandlung nach Muskeltrauma zu allen drei Zeitpunkten einen wesentlichen Anstieg der Muskelgewebefraktion verglichen mit NaCl-behandelten Tieren.

Bei den drei untersuchten Gruppen scheinen die muskuläre Kollagendeposition, die Konzentration der systemischen Creatin-Kinase sowie die Zahl der Gewebeinfiltrierenden und systemisch-zirkulierenden Leukozyten sich nach Muskeltrauma nicht wesentlich zu unterscheiden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Diskussion von Material und Methode

#### 5.1.1 Etablierte Modelle zur Untersuchung der Muskelregeneration

Um die Pathophysiologie und molekulare Genese von Muskelverletzungen besser verstehen zu können, ist es notwendig, experimentelle Modelle zu etablieren, welche Muskeltraumata suffizient simulieren und weiterführende Untersuchungen ermöglichen. Zu diesen Modellen gehören sowohl *in-vitro*, humane *in-vivo* sowie tierexperimentelle *in-vivo* Ansätze.

##### 5.1.1.1 *In-vitro* Muskeltraumamodelle

*In-vitro* Untersuchungen stellen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die einen detaillierten Einblick in die Zellfunktion erlauben. Bei *in-vitro* Modellen, welche ein Muskeltrauma simulieren, werden Muskelfasern oder Bündel von Muskelfasern aus einem Muskel entnommen und in eine Lösung verbracht, welche die gleiche ionische Komposition wie die Extrazellulärflüssigkeit besitzt. Das Muskeltrauma wird durch eine exzentrische Muskelkontraktion erzeugt, indem die Muskelfasern während der Kontraktionsphase mechanisch verlängert werden [Gosselin 2000; Lynch et al. 2000]. Hierfür werden die Muskelfasern an einer Vorrichtung befestigt, elektrisch stimuliert und deren Kontraktionsvermögen gemessen. Nachteil dieser Modelle ist, dass sie technisch anspruchsvolle Experimente darstellen und doch nur eine eingeschränkte klinische Relevanz haben. *In-vitro* Modelle sind allerdings dazu geeignet, zelluläre Vorgänge bei Muskeltrauma zu untersuchen und biomechanische Parameter, wie Kraft und Kontraktionsausmaß, zu erfassen.

##### 5.1.1.2 Humane Muskeltraumamodelle

Im Rahmen humaner Muskeltraumamodelle wird eine Muskelverletzung, hierbei meistens bei gesunden Probanden, durch kontinuierliche Übung der Muskulatur induziert [Michaut et al. 2001; Nosaka et al. 2001]. Dafür werden spezielle Übungsgeräte verwendet, wobei exzentrische Kontraktionen an der

Ellenbogenmuskulatur [Clarkson et al. 1986], Extensionsübungen vom Kniegelenk [Komi und Viitasalo 1977], prolongiertes Renn-Training [Beck und Day 1985] oder Step-Übungen [Newham et al. 1983] durchgeführt werden. Obwohl Modelle zur Induktion von Verletzungen am Menschen eine hohe klinische Relevanz haben, werden diese aufgrund ethischer Überlegungen und begrenzter Untersuchungsmöglichkeiten nur selten durchgeführt.

### **5.1.1.3 Tierexperimentelle Muskeltraumamodelle**

Tierexperimentelle Studien stellen unverzichtbare Methoden der modernen Forschung dar. Bislang wurden mehrere Modelle zur Muskelregeneration veröffentlicht und zahlreiche Versuche an diversen Spezies wie Affen [Beiras-Fernandez et al. 2003], Katzen [Roy et al. 1999], Hühnern [Zhang und Dhoot 1998], Hunden [Hayashi et al. 1998], Kaninchen [Meffert et al. 2008], Ratten [Fink et al. 2003] und Mäusen [Menetrey et al. 1999] durchgeführt.

Derzeit stehen uns eine Vielzahl von Modellen zur Verfügung, um regenerative Prozesse nach Muskeltrauma zu untersuchen. Die zellulären Ereignisse und somit auch die Muskelregeneration nach Verletzung werden erheblich vom experimentellen Modell und der Stärke der Muskelverletzung beeinflusst. Eine chemisch induzierte Muskelverletzung, wie beispielsweise durch Myotoxin verursacht [Devor und Faulkner 1999], hat den Vorteil, dass ein standardisiertes und zugleich reproduzierbares Trauma hervorgerufen werden kann. Nachteil stellt allerdings die fehlende klinische Relevanz dar, da solche Verletzungen bei Menschen nur selten vorkommen [Khan 1995; Charge und Rudnicki 2004]. Bei klinisch relevanteren Methoden einer Muskelverletzung wird das Trauma mechanisch durch externe Krafteinwirkung erzeugt, indem entweder ein Hammer [Jarvinen und Sorvari 1975], ein Fallgewicht [Smith et al. 1993; Crisco et al. 1994; Knappe et al. 2005] oder ein pneumatischer Aufprallapparat verwendet wird [Schaser et al. 1999; Schaser et al. 2005]. Dadurch wird die Muskulatur direkt geschädigt und ein messbares Ausmaß der Verletzung induziert. Des Weiteren sind Muskel-Lazerations-Modelle [Natsu et al. 2004], Ischämie/Reperfusion-induzierte Muskelschäden [Akimau et al. 2005] oder Quetschverletzungen mittels Klemmen [Matziolis et al. 2006] verbreitete experimentelle Ansätze zur Induktion von Muskeltraumata.

### **5.1.2 Muskeltraumainduktion mittels instrumentierter Klemme**

Das hier vorgestellte experimentelle Verfahren gestattet die Applikation einer in Echtzeit visualisierten, konstanten Kraft am Muskel. Diese Technik ermöglicht somit die Induktion eines standardisierten Muskeltraumas, bei welchem die Traumaintensität und der Schweregrad der Verletzung konstant gehalten werden können. Durch 10-maliges Quetschen des Muskels mit 25N für 10s wird ein massives Muskeltrauma erzeugt. Dadurch tritt nach 14 Tagen lediglich eine nur 50%-ige Regeneration der Muskelkraft auf, wie hier und auch von anderen Arbeitsgruppen am gleichen Modell ähnlich beschrieben wurde [Matziolis et al. 2006]. Im Gegensatz dazu führen leichtere Verletzungen, wie z.B. nach Muskellazeration, 14 Tage nach Traumainduktion zu einer 72 - 80 %-igen Restauration der Kurzkontraktion und Tetanie [Natsu et al. 2004]. Muskel-Lazerationen gehen mit einer fast kompletten Wiederherstellung der Funktionalität einher und haben somit ein eher eingeschränktes Anwendungsspektrum zur Überprüfung therapeutischer Ansätze.

### **5.1.3 Die Ratte als Versuchstier**

Ratten eignen sich speziell für die unfallchirurgische und orthopädische Forschung, da sie ein etabliertes Modelltier für Studien zur Knochenheilung, Knochendefekten, Osteoporose oder Arthrose darstellen [Doll et al. 2001; Zhang et al. 2002]. Die Ratte ist ein beliebtes Versuchstier aufgrund der leichten Haltung sowie ihrer hohen Reproduktionsrate und schnellem Heranwachsen, so dass Studien mit mehreren Gruppen und großer Gruppenszahl möglich sind. Außerdem besteht gegenüber Tierversuchen mit Ratten eine weitaus größere gesellschaftliche Akzeptanz als bei Verwendung größerer Tiere wie Hund, Schwein oder Schaf.

Für die Untersuchung der Muskelregeneration wird überwiegend die Hinterlaufmuskulatur mit M. soleus, M. extensor digitorum longus und M. gastrocnemius untersucht. Diese Muskeln eignen sich für tierexperimentelle Zwecke aufgrund ihrer leichten chirurgischen Zugänglichkeit und ihrer ähnlichen Anatomie zum Menschen [Kannus et al. 2003].

### **5.1.4 Muskelregeneration bei Tieren**

Informationen über das regenerative Potential von Muskeln wurden hauptsächlich bei Nagetieren erhoben. Es ist beschrieben, dass die regenerativen

Phasen des Muskels nach Muskeltrauma bei allen Tieren vergleichbar sind. Lediglich das regenerative Potential und die Regenerationsdauer sind von Tier zu Tier unterschiedlich [Ausoni und Sartore 2009]. So ist bekannt, dass Ratten und Mäuse eine schnellere Muskelregeneration im Vergleich zu Meerschweinchen oder Menschen aufweisen [Borisov 1999]. Unterschiedliche Aktivität bei der Regeneration wurde nicht nur zwischen unterschiedlichen Tierarten beobachtet, sondern auch zwischen unterschiedlichen Stämmen der gleichen Tierart [Borisov 1999]. Des Weiteren zeigen unterschiedliche Muskeln (z.B. langsam und schnell kontrahierende Muskeln) vom gleichen Säugetier Unterschiede in ihrer regenerativen Kapazität. So regenerieren schnell kontrahierende Muskelfasern schneller als langsam kontrahierende Muskelfasern [Matsuura et al. 2007].

Komplexer wird die Regeneration nach Trauma bei Amphibien, da diese Lebewesen eine leistungsfähigere Regeneration im Gegensatz zu Säugetieren aufweisen. Bei Fröschen und Reptilien sind zwei regenerative Wege bekannt. Der erste regenerative Mechanismus umfasst die bereits aus den Säugetieren bekannte Geweberegeneration, welche nach Muskelverletzungen auftritt [Carlson 1970; Carlson 1978]. Der zweite regenerative Weg tritt nach Amputation von Extremitäten auf, wobei die verlorene Extremität komplett wiederhergestellt wird. Dieses Phänomen ist in der Biologie als epimorphische Regeneration bekannt und beschrieben [Wallace et al. 1981; Tsonis et al. 1996]. Hierbei scheinen eine wesentliche Rolle stammzellähnliche Zellen zu haben, die an der amputierten Stelle proliferieren und sich zu Muskelzellen, Endothelzellen, Osteoblasten und Fibroblasten weiterdifferenzieren und das verlorene Gewebe wieder neu bilden.

Die Muskelregeneration ist ein komplexer Prozess, der sich von Spezies zu Spezies unterscheidet. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass das hierbei erhobene Wissen bei Tieren nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen werden kann, da unterschiedliche molekulare Mechanismen an der Muskelregeneration beteiligt sind. Weiterhin kann dieses Tierexperiment keine Aussage darüber machen, ob und inwieweit sich der menschliche Organismus nach Muskeltrauma und G-CSF-Applikation vergleichbar verhalten würde. Trotzdem stellen tierexperimentelle Studien eine unverzichtbare Untersuchungsmethode der modernen Forschung dar. Sie liefern aufschlussreiche Resultate zu zellulären Prozessen und können somit spezielle Fragen der Pathophysiologie nach Trauma beantworten.

### **5.1.5 G-CSF: Dosis und Applikation**

Gewebeprotective und regenerative Eigenschaften von G-CSF wurden im

Rahmen von tierexperimentellen Studien sowohl bei hoher (100-200µg/kg KG) als auch bei niedriger Konzentration (10-50µg/kg KG) dokumentiert. G-CSF wurde dabei den Tieren für einen Zeitraum von 3 bis 21 Tagen täglich überwiegend i.p. appliziert und die Wirksamkeit der Substanz wurde als gewebe- und dosisabhängig beschrieben [Harada et al. 2005].

Bis heute sind mehrere Studien publiziert worden, welche regenerative Eigenschaften von G-CSF an verschiedenen Geweben nachgewiesen haben. Dennoch ist aus der aktuellen Literatur nicht klar zu entnehmen, ob eine hoch oder auch niedrig dosierte Therapie mit G-CSF gewebeprotective und regenerative Eigenschaften aufweist. Es ist bekannt, dass es nach Herzinfarkt und hoch dosierter G-CSF-Behandlung (100 bzw. 200µg/kg KG für 5 bzw. 8 Tage) bei Ratten und Mäusen zu einer verbesserten Herzregeneration im Sinne einer erhöhten Herzfunktion, einem niedrigen ventrikulären Remodelling und einer reduzierten myozytären Apoptose [Fukuhara et al. 2005; Harada et al. 2005; Li et al. 2006] kommt. Vergleichbar zeigt die ischämische Hinterlaufmuskulatur sowohl bei hoch (200 bzw. 250µg/kg KG für 5 bzw. 8 Tage) [Minamino et al. 2005; Ohki et al. 2005] als auch bei niedrig dosiertem G-CSF (10µg/kg KG für 3d) [Zhang et al. 2008], einen verbesserten Blutdurchfluß und eine schnellere Neovaskularisation. Zudem wurde ein vermehrtes neuronales Überleben und eine signifikante Inhibition der Apoptose nach Schlaganfall und Hirnhypoxie mit Gabe von G-CSF in niedriger Konzentration (50µg/kg KG für 21 Tage) beobachtet [Yata et al. 2007; Lan et al. 2008]. Weitere Studien beschreiben, dass niedrig dosiertes G-CSF (20-30µg/kg KG für 7 Tage) zur schnelleren Regeneration der Intima nach Ballon-induzierter-Gefäßverletzung führt [Cho et al. 2006; Wu et al. 2008].

Klinische Untersuchungen haben auch beim Menschen verbesserte funktionelle Resultate nach niedriger G-CSF Dosierung gezeigt. Nach Hirninfarkt [Shyu et al. 2006] und täglicher Applikation von G-CSF (15µg/kg KG für 5 Tage) können langfristig verbesserte neurologische Ergebnisse erzielt werden. Im Rahmen klinischer Studien nach Herzinfarkt [Takano et al. 2007] führte die tägliche Applikation von G-CSF (10µg/kg KG für 5 Tage) zu einer funktionellen Verbesserung des Herzens. Man nimmt an, dass G-CSF direkt auf die Herzmuskulatur wirkt und die Regeneration des ischämischen Myokards durch lokale Infiltration von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark fördert.

Die aktuelle Literatur lässt somit vermuten, dass G-CSF eine regenerative Potenz sowohl bei hoher als auch bei niedriger Dosierung hat. In der hier vorgestellten Studie wurde eine niedrige Konzentration von G-CSF gewählt (20µg/kg KG), um die biologische Potenz des Medikaments im Rahmen einer

---

chronischen Behandlung zu untersuchen.

### **5.1.6 Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung**

Im vorgestellten experimentellen Setup wurden drei Zeitpunkte ausgesucht, um eine Kinetik der untersuchten Parameter nach Muskeltrauma zu beschreiben. Weiteres Ziel des experimentellen Aufbaus war es die biologische Vorgänge nach Trauma und G-CSF-Applikation darzustellen und diese mit einem sham-Trauma zu vergleichen.

Als erster Untersuchungszeitpunkt wurde der 4. Tag gewählt, um frühe Prozesse wie Proliferation und Apoptose zu untersuchen. Vergleichbar wurden am Muskel proliferative und apoptotische Prozesse am 3. bis 5. Tag nach Trauma untersucht [Huard et al. 2003; Jarvinen et al. 2005], da von vielen Arbeitsgruppen hier ein Maximum der Satellitenzellproliferation, der Muskelzellproliferation, der Inflammation sowie der Apoptose beschrieben wird. Die funktionelle Restauration des Muskels, das Ausmaß der Nekrose und die Narbenbildung sind erst zu späteren Zeitpunkten, ab der zweiten Woche, zu beobachten [Jarvinen et al. 2005; Toumi et al. 2006]. Deswegen wurde als weiterer Untersuchungszeitpunkt der 14. Tag gewählt.

### **5.1.7 Diskussion der Untersuchungstechniken**

#### **5.1.7.1 Muskelkraft**

In der orthopädischen und unfallchirurgischen Forschung sind biomechanische Untersuchungen häufig benutzte Methoden, um die Funktion von Körperteilen oder Körperregionen unter bestimmten Bedingungen zu analysieren. Die mechanischen Eigenschaften des Skelettmuskels lassen sich gut durch indirekte Stimulation des versorgenden Nervs und gleichzeitiger Erfassung des Kontraktionsvermögens des Muskels untersuchen.

Der hier verwendete experimentelle Aufbau ermittelt die Kraft des Muskels bei einer isometrischen Kontraktion. Durch die Tetanie wird die maximale Zugkraft des Muskels erfasst, wobei mittels Kurzkontraktion die Zugkraft bei einer definierten Stimulation dargestellt wird. Die Kontraktionskapazität liefert für die Skelettmuskulatur zuverlässige Angaben über die funktionelle Regeneration und Restauration nach offenem Muskeltrauma [Natsu et al. 2004; Matziolis et al. 2006].

Die Muskelkraft entsteht, indem die Myosinköpfchen mit den Aktinfilamenten

in einem zyklischen Prozess Querbrücken bilden und einen Kraftschlag ausführen. Eine Kontraktion der peripheren Skelettmuskulatur ist ein neuromuskuläres Ereignis. Höhere Erregungsraten im Skelettmuskel führen durch Summation der Zuckungen zum unvollständigen Tetanus (Kurzkontraktion) bis hin zum vollständigen Tetanus [MacIntosh und Rassier 2002].

Einzelne Muskelkraftwerte der traumatisierten Skelettmuskulatur haben eine mäßige Aussagekraft, da individuelle Kraftunterschiede zwischen den Tieren normal sind. Um diese tierbezogene Variabilität zu reduzieren, wurde die Muskelkraft des geschädigten M. soleus prozentual zur Muskelkraft der kontralateralen Gegenseite berechnet. Dadurch könnte der geschädigte linke Muskel theoretisch und praktisch die maximale Muskelkraft des gesunden rechten Muskels erreichen.

Bei Mäusen lässt sich die Muskelkraft tierexperimentell durch die spontane Rennzeit und Renngeschwindigkeit am Laufrad ermitteln [Delbono et al. 2007]. Bei *in-vitro* Ansätzen wird ein isolierter Muskel direkt stimuliert und die dabei auftretende Kontraktionskraft gemessen [Li et al. 2008]. Elektromyographische Untersuchungen stellen *in-vivo* Untersuchungsmethoden der Muskelkraft dar, wodurch die Potentialschwankungen einzelner motorischer Einheiten abgeleitet werden [Backman 1988]. Bei weiteren *in-vivo* Messverfahren wird die Geschwindigkeit einer gegen Widerstand durchgeführten Drehbewegung ermittelt [Fitts und Widrick 1996] oder die Kontraktionskapazität einer Extremität mittels speziellen Instrumenten (Myometern) dargestellt [Molenaar et al. 2008]. Vorteil von *in-vivo* und *in-vitro* tierexperimentellen Untersuchungen ist es, dass sie akkurate und reproduzierbare Messverfahren der Muskelkraft darstellen. Von Nachteil ist allerdings, dass sie mit einer hohen Invasivität einhergehen. Weitere *in-vivo* Untersuchungstechniken der Muskelkraft zeichnen sich durch minimale Invasivität aus, können aber nur die Kraft von Muskelgruppen messen und nicht die Kraft einzelner Muskeln [Dugan et al. 2004; Dartnall et al. 2009].

### 5.1.7.2 Muskelzellproliferation

Unter Proliferation versteht man die Teilung von Zellen, wobei aus einer Mutterzelle zwei oder mehrere komplette Tochterzellen entstehen.

Der Zellzyklus wird in folgende Phasen unterteilt [Prather et al. 1999]: in der G<sub>0</sub>-Phase (G steht für gap= Intervall) befindet sich die Zelle in der Ruhephase. Daran schließt sich die G<sub>1</sub>-Phase, die Wachstumsphase, an. Während dieses Abschnittes werden Proteine, RNA und Membranen synthetisiert. In der S-Phase (S steht für Synthese) wird die DNA repliziert. Die Zelle verbleibt anschließend einige

Zeit in der G2-Phase, bevor sie sich dann während der M-Phase (M steht für Mitose) teilt. Früher wurde die Zellteilung lichtmikroskopisch durch die erkennbaren Mitosefiguren quantifiziert. Derzeit stehen uns eine Vielzahl von immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren zur Verfügung, die eine akkurate Bestimmung der Zellproliferation ermöglichen.

Eine einfache Methode zur Untersuchung der Zellproliferation stellen immunhistochemische und molekularbiologische Verfahren dar, bei denen Proteine nachgewiesen werden, die während des Zellzyklus exprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehören das PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“, ein Hilfsprotein der DNA Polymerase delta) [Piestun et al. 2009] und das Ki67 (ein proliferationsassoziiertes Kernantigen) [Napoli et al. 2008]. Die Analyse von PCNA und Ki67 ist technisch leicht durchführbar. Nachteil dieser Methoden ist, dass die detektierten Proteine Zellen identifizieren, die sich gerade zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme teilen. Zudem werden diese Proteine nicht während des gesamten Zellzyklus exprimiert. PCNA ist ein Protein, das in der frühen G1- und S-Phase der Mitose nachgewiesen wird [Redpath et al. 1995]. Ki67 dagegen wird in der späten G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert [Scholzen und Gerdes 2000].

Eine bessere Methode, um Zellproliferation zu untersuchen, stellt die in-situ-Hybridisierung der Histonen-mRNA dar. Histone sind Proteine, die sich im Zellkern befinden und dort die DNA verpacken, um Nukleosome zu bilden. Mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung wird an Parafin-fixierten Präparaten die mRNA von Histonen sichtbar gemacht [Avet-Loiseau 2007; Hawke et al. 2007]. Die Expression von Histonen-mRNA zeichnet Zellen aus, die sich in der Synthese-Phase befinden. Die in-situ-Hybridisierung ist somit eine valide, aber technisch sehr aufwendige Methode der Proliferationsbestimmung. Alternative Wege zur Darstellung von in der Synthese-Phase befindenden Zellen stellen Methoden dar, bei denen das Erbgut während seiner Duplikation mit nicht natürlich vorkommenden Substanzen markiert wird. Zu diesen Substanzen gehören das Thymidinanalogue BrdU und [<sup>3</sup>H]Thymidin [Liu und Klein-Szanto 2000].

BrdU ist ein unter physiologischen Umständen nicht im Körper vorhandenes Thymidinanalogue. Wenn BrdU *in-vivo* appliziert wird, wird es bei Replikation der Zelle im Zellkern eingebaut. BrdU wird während der Synthesephase des Zellzyklus kompetitiv in die DNA inkorporiert und zeichnet sich durch seine gute immunhistochemische Detektierbarkeit aus. Dies hat zur Folge, dass beide Tochterzellen markiert werden. BrdU bietet aufgrund seiner Spezifität eine exakte und relativ einfache Methode zur Proliferationsbestimmung. Die einmalige i.p.-Gabe von BrdU (pulse labeling) eignet sich für Untersuchungen der Proliferationsaktivität

über einen Zeitraum von wenigen Tagen [Mozdziak et al. 1998]. Kumulative Gabe von BrdU, mittels osmotischer Pumpen [Dupont-Versteegden et al. 1999; Schmalbruch und Lewis 2000; Velders et al. 2008] oder Gabe der Substanz über das Trinkwasser [Hayworth et al. 2006], stellen weitere Alternativen dar, um prospektiv mehrere Tage der Proliferation zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde das BrdU als Marker der Proliferation aufgrund seiner hohen Spezifität zur Detektion sich teilender Zellen verwendet. Proliferierende Muskelzellen können sowohl mit niedriger (10 bis 50mg/kg KG i.p.) [Rantanen et al. 1999; Uehara et al. 2004; Ferreira et al. 2006] als auch mit hoher Konzentration (150 bis 400mg/kg KG i.p.) [Jacobs et al. 1996; Mozdziak et al. 1998; Goding et al. 2005] von BrdU wenige Stunden vor Gewebeentnahme analysiert werden. Ähnlich wie hier wurde von weiteren Arbeitsgruppen den Versuchstieren die gleiche Konzentration von BrdU zu gleichen Zeitpunkten injiziert (50mg/kg KG; durchschnittlich 2 Tage vor Gewebeentnahme) um proliferative Ereignisse am Muskel nachzuweisen [Egginton et al. 2001; Ferreira et al. 2006; Rotter et al. 2008].

### 5.1.7.3 Satellitenzellproliferation

Satellitenzellen lassen sich anhand ihrer zellulären Morphologie mittels Elektronenmikroskopie leicht identifizieren [Tamaki et al. 2009]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben den Vorteil, dass sie die Zellmorphologie in hoher Auflösung wiedergeben, sind aber technisch gesehen sehr aufwendig. Eine gute Alternative sind immunhistochemische Färbungen, wobei satellitenzellspezifische Proteine mit entsprechenden Antikörpern markiert und anschließend lichtmikroskopisch identifiziert werden.

Proteine, wie das neuronale Zelladhäsionsmolekül (N-CAM), wurden bei *in-vitro*-Versuchen an Myoblasten nachgewiesen [Scholzen und Gerdes 2000]. Untersuchungen von Satellitenzellen in ungeschädigter Rattenmuskulatur zeigen eine Expression des Adhäsionsmoleküls M-Cadherin [Bornemann und Schmalbruch 1994]. Die Expression des Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) [Jennische et al. 1993] und des c-met-Rezeptor [Allen et al. 1995; Cornelison und Wold 1997; Tatsumi et al. 1997] ist ebenfalls bei Satellitenzellen erwachsener Ratten auffindbar. Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (V-CAM1) und der Integrin-Rezeptor  $\alpha 4\beta 1$  sind weiterhin wichtige Elemente in der Zell-zu-Zell-Interaktion während der myogenen Entwicklung. Der Nachweis aktivierter Satellitenzellen im Mausmuskel gelang mit den myogenen basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren,

MyoD1 und Myogenin [Grounds und McGeachie 1992]. Durch RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die RNA von MyoD1, Myf5, MRF4 und Myogenin spezifische Marker für aktivierte Satellitenzellen darstellen [Smith et al. 1994]. Weitere Marker für aktivierte Satellitenzellen stellen die muskelspezifischen Intermediärfilament-Proteine, Desmin und Vimentin, dar. Auch Meltrin-alpha, ein Mitglied der Metallproteasen-Disintegrin-Familie, konnte in aktivierten Satellitenzellen verletzter Muskulatur nachgewiesen werden und spielt dort eine Rolle im Fusionsprozess der Satellitenzellen untereinander [Kuschel et al. 2000]. Der Transkriptionsfaktor Pax-7 ist ein weiterer Satellitenzellmarker und scheint eine wichtige Rolle bei der Myogenese zu spielen, da Pax-7-mutierte Tiere keine Satellitenzellen aufweisen [Seale et al. 2003].

Nachteil des Nachweises o.g. Proteine ist, dass die Proteine im Muskelgewebe nicht nur von Satellitenzellen exprimiert werden. Satellitenzellen stellen weiterhin eine heterogene Population von Zellen dar, die nur zu bestimmten Zeitpunkten ihres Zellzyklus die vorhin erwähnten Proteine exprimieren. Aus der aktuellen Literatur geht hervor, dass Einzelfärbungen mit Pax-7, M-Cadherin und Myf-5 mit relativ hoher Sicherheit Satellitenzellen nachweisen, welche sich in der ruhenden, aktivierten und proliferierenden Phase befinden. Um speziell proliferierende Satellitenzellen von anderen proliferierenden Zellen zu identifizieren, ist es daher notwendig, sowohl Zellzyklus-relevante als auch Satellitenzell-spezifische Proteine an der gleichen Zelle zu identifizieren. Aus diesem Grund besitzen doppelimmunhistochemische Analysen einen hohen Stellenwert für den *in-vivo* Nachweis von Satellitenzellen. In der vorliegenden Studie wurden daher zwei immunhistochemische Verfahren gewählt, um die Satellitenzellen sowohl im geschädigten Areal (BrdU/Desmin Doppelimmunhistochemie) als auch im nicht geschädigten Areal des Muskels (BrdU/Laminin Doppelimmunhistochemie) zu identifizieren.

#### **5.1.7.4 Apoptose und Nekrose**

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Hierbei handelt es sich um energieabhängige, molekulare und biochemische Vorgänge, die genetisch determiniert sind. Die Zellen schrumpfen, Zellkontakte werden aufgelöst und das Chromatin kondensiert. Die Membranintegrität der Zelle bleibt zunächst erhalten. Bei apoptotischen Vorgängen entstehen membranumschlossene Zellreste, so genannte apoptotische Körperchen, die von umliegenden Zellen phagozytiert

werden, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Apoptotische Vorgänge können an der peripheren Skelettmuskulatur klassischer Weise durch die o.g. typischen morphologischen Veränderungen der Zellkernstruktur identifiziert werden [Kerr et al. 1972]. Alternativen zum Apoptosenachweis stellen Verfahren dar, welche die internukleosomale DNA-Fragmentation sichtbar machen [Wyllie et al. 1980].

Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Verfahren [James et al. 1993] werden morphologische Veränderungen des Zellkerns detektiert. Eine Limitation der Elektronenmikroskopie ist, dass im mikroskopierten Gesichtsfeld nur wenige Zellen dargestellt werden können und somit die großflächige, quantitative Auswertung apoptotischer Zellen mit erheblichem Aufwand verbunden ist [Pipinos et al. 2007]. Klarer Vorteil dieser Methode ist die eindeutige Identifizierung der Apoptose und die leichte morphologische Zuordnung der Apoptose zu einem Zelltyp. Die Elektronenmikroskopie hat hinsichtlich der Apoptosebestimmung eine hohe Sensitivität und eine moderate Spezifität. Lichtmikroskopische Verfahren bieten technisch leichtere Alternativen im Vergleich zur Elektronenmikroskopie, haben aber eine eingeschränkte Sensitivität und moderate Spezifität aufgrund der geringeren Vergrößerungsmöglichkeit [Adams et al. 2001]. Bei weiteren Methoden, wie der intravitalen Mikroskopie, werden apoptotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach systemischer Applikation einer kernfärbenden Substanz (z.B. Bisbenzimid) dargestellt. Vorteil der Methode ist, dass sie eine dynamische *in-vivo* Analyse ermöglicht, bei welcher andere Parameter am lebenden Tier variiert und zeitgleich erfasst werden können [Gradl et al. 2007]. Im lebenden Myoblast kann die Apoptose durch Annexin-V-Bestimmung (ein oberflächiges Protein, welches bei Apoptose exprimiert wird) [Marquette et al. 2008] oder FACS Analyse [Hofmann und Blau 1997] erfolgen.

Biochemische und molekulare Marker bieten bessere und zugleich gängigere Methoden zur Quantifizierung der Apoptose. Bei der TUNEL-Färbung wird die fragmentierte DNA des Zellkerns mit markierten Nukleotiden versehen, die danach sichtbar gemacht werden. Die TUNEL-Färbung ist eine technisch einfach durchzuführende histologische Untersuchung [Primeau et al. 2002] mit einer hohen Sensitivität, aber niedriger Spezifität. Nachteil dieser Methode ist, dass nicht klar zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden kann, da bei beiden Todesarten DNA-Bruchstücke entstehen [Kylarova et al. 2002]. Bei weiteren Verfahren werden die Mono- und Oligonukleosome der fragmentierten DNA einer apoptotischen Zelle mittels ELISA-Analyse bestimmt. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt darin, dass genügend Gewebe asserviert werden muss, um DNA erfolgreich zu isolieren [Duan et al. 2009]. Bei immunhistochemischen Analysen

werden Proteine in der Zelle sichtbar gemacht, die bei apoptotischen Vorgängen exprimiert werden. Zu diesen Proteinen gehören das Cytochrom-C und die gespaltene Caspase-3, anti-apoptotische Proteine wie das Bcl-2 und das Bcl-xL, sowie pro-apoptotische Proteine wie das Protoonkogene Bax und das BAD (Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death) [Zinkel et al. 2006; Duan et al. 2009]. Nachteil dieser Methoden ist, dass dadurch nur indirekt die Apoptose nachgewiesen wird und dass diese Methoden eine niedrige Sensitivität bei einer mäßigen Spezifität haben. Allerdings sind solche immunhistochemischen Analysen vorteilhaft, um den molekularen Pfad der Apoptose in der Zelle und metabolische Kaskaden zu untersuchen.

Als Nekrose wird der ungeordnete oder zufällige Zelltod bezeichnet. Nekrose stellt neben der Atrophie die zweite Schädigungsart der Muskelfaser dar. Bei nekrotischen Vorgängen schwellen die Zellen an, die Membran reißt auf und zelluläre Bestandteile werden in den extrazellulären Raum freigesetzt. Nekrose wird durch akuten unphysiologischen Stress wie z.B. Trauma ausgelöst, betrifft meist größere Zellverbände und verursacht meist eine irreversible Schädigung des gesamten Gewebes. Dieser energieunabhängig ablaufende Vorgang stellt einen unnatürlichen Zelltod dar.

Nekrotische Muskelzellen werden lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch anhand deren Morphologie ermittelt. So ist beschrieben, dass beim nekrotischen Zelltod die Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum aufgrund der osmotischen Dysregulation der Muskelzelle anschwellen [Tidball et al. 1995]. Weitere Zeichen der Nekrose sind die Lyse der Plasmamembran, die lokale Inflammation des Gewebes und die Phagozytose [Adams et al. 2001]. Nekrotische Vorgänge zeichnen sich weiterhin durch Ersatz des nekrotischen Areals durch Bindegewebe aus. Indirekt kann der nekrotische Zelltod beim Muskel als Kehrwert des noch bestehenden Muskelgewebes identifiziert werden. Mittels weiteren immunhistochemischen, histologischen und molekularbiologischen Untersuchungstechniken lässt sich das durch die Nekrose entstehende fibrotische Areal durch Kollagendeposition ermitteln. Als einfache Untersuchung, wie hier durchgeführt, gilt die histologische Färbung der Kollagenfasern.

#### **5.1.7.5 Lokale und systemische Leukozytenzahl**

Um das Ausmaß der Entzündungsreaktion im Gewebe zu quantifizieren, stehen mehrere histochemische Verfahren zur Verfügung, mit deren Hilfe Leukozyten ermittelt werden können. Klassisch werden im Muskel Granulozyten,

Leukozyten und ihre Vorstufen mit der Chlorazetatesterase oder der Myeloperoxidase dargestellt. B-Lymphozyten sind als einziger Leukozytentyp in der Lage, Antikörper zu bilden. Sie machen zusammen mit den T-Lymphozyten den entscheidenden Bestandteil des adaptiven Immunsystems aus und spielen bei Myopathien [Dalakas 1995] eine wichtige Rolle. Die spezifische Färbung für B-Lymphozyten erfolgt mit Hilfe des Oberflächenproteins CD19 und für T-Lymphozyten mit Hilfe der Oberflächenproteine CD3 bzw. CD5. Makrophagen sind zusammen mit den Granulozyten für die Phagozytose nach Muskeltrauma verantwortlich und werden durch CD68 bestimmt.

Wesentlicher Bestandteil der posttraumatischen Gewebereaktion und der damit verbundenen Gewebeschäden ist die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Eine wichtige *in-vivo* Untersuchungsmethode zur Beobachtung dieser Interaktion am Muskel stellt die Intravitalmikroskopie dar [Schaser et al. 1999; Mittlmeier et al. 2003; Schoen et al. 2007; Gierer et al. 2008]. Nachteil dieser Methode ist es, dass sie eine aufwendige und zugleich invasive Untersuchungstechnik darstellt. Definitiver Vorteil der intravitalen Mikroskopie ist, dass sie eine dynamische Untersuchung gewährleistet und dass mehrere mikrozirkulatorische Parameter innerhalb von kurzer Zeit gleichzeitig erhoben werden können.

Die systemische Leukozytenzahl lässt sich mittels automatischer Zellzähler im Vollblut leicht und akkurat bestimmen. Aufwendigere Methoden, wie die Differenzierung des Blutbildes, geben Aufschluss über den Anteil der unreifen Vorläuferzellen in der peripheren Blutbahn, welche aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden. Dabei unterscheidet man lichtmikroskopisch anhand morphologischer Kriterien zwischen Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Basophilen und Eosinophilen [Bickhardt und Carstensen 1992]. Eine komplexere Methode zur Untersuchung von Leukozyten ist die Durchflußzytometrie. Damit wird das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von isolierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom ermöglicht.

#### **5.1.7.6 Systemische Marker des Muskelschadens**

Die Plasmakonzentration von muskelzellspezifischen Proteinen ist in der Literatur oft als indirekter Marker der Zellintegrität nach Muskeltrauma beschrieben. Hohe Werte weisen auf ein akutes schweres Muskeltrauma hin, wobei niedrige Werte ein leichtes oder älteres Trauma andeuten. Bereits beschriebene Plasmaparameter, wie das Myoglobin, das Malondialdehyd oder die Harnsäure haben in der experimentellen und klinischen Forschung einen hohen Stellenwert als

indirekte Marker für Muskelzellschaden in den ersten 72h nach Trauma [Ascensao et al. 2008]. Von all diesen Parametern stellt die Creatin-Kinase den bis jetzt genauesten und am meisten verwendeten systemischen Parameter zur Bestimmung des Ausmaßes des Muskelschadens dar [Sorichter et al. 1999; He et al. 2008].

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Muskelfunktion nach Trauma und G-CSF-Applikation**

In der hier vorgestellten Arbeit konnte eine massive Einbuße der relativen Muskelkraft nach Trauma und zeitgleich eine funktionelle Verbesserung des Muskels sowohl hinsichtlich Kurzkontraktion als auch Tetanie nach Applikation von G-CSF nachgewiesen werden. Bislang gibt es keine Studien, die den Einfluss von G-CSF auf die Funktion der traumatisierten, peripheren Skelettmuskulatur untersucht haben.

Sacramento und Mitarbeiter haben kürzlich gezeigt, dass GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), eine G-CSF ähnliche Substanz, bei der ischämischen, peripheren Skelettmuskulatur der Maus zur Verbesserung des Kontraktionsvermögens und zur erhöhten Muskelkraft führt [Sacramento et al. 2009].

Mehrere funktionelle Untersuchungen an der ischämischen Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur nach G-CSF-Gabe deuten auf eine funktionelle Restauration nach Behandlung hin. Der ischämische Schaden der Hinterlaufmuskulatur bei Ratten wird nach G-CSF-Applikation reduziert und geht mit einer signifikanten Verbesserung der Perfusion und der Muskelfunktion einher [Takagi et al. 2005]. Ähnliche Ergebnisse, im Sinne eines verbesserten Ejektionsvolumens als Marker der Funktionalität des linken Ventrikels, haben weitere Arbeitsgruppen am dystrophischen murinen Herzmuskel nach G-CSF-Applikation gezeigt [Tatsumi et al. 2008]. Des Weiteren gilt G-CSF als eine effiziente Substanz zur Steigerung der Herzfunktion und des Kontraktionsvermögens der Herzmuskulatur beim akuten Herzinfarkt von Ratte [Ieishi et al. 2007], Maus [Dai et al. 2008], Schwein [Sato et al. 2008] und Mensch [Kang et al. 2007].

Die genauen Mechanismen durch welche G-CSF eine Funktionsverbesserung an Organen erzielt, sind noch nicht vollständig bekannt. Man geht davon aus, dass G-CSF durch seine anti-apoptischen, anti-inflammatorischen, neurogenen, angiogenen und zellprotektiven Eigenschaften [Schabitz und Schneider 2006] zur

---

Verbesserung der Funktion nach Trauma führt.

## **5.2.2 Ratio von Kurzkontraktion-zu-Tetanie nach Trauma und G-CSF-**

### **Behandlung**

Die Muskelfasertypen eines Muskels werden funktionell durch die Ratio von Kurzkontraktion-zu-Tetanie ermittelt. Diese Ratio spiegelt das Verhältnis der schnell und langsam kontrahierenden Muskelfasern wider. Je höher die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie eines Muskels ist, desto mehr schnell-kontrahierende Muskelfasern sind vorhanden. Es ist bekannt, dass die Skelettmuskulatur eine hohe Plastizität zeigt, welche dem Muskel erlaubt das Kontraktionsvermögen der Muskelfaser unter bestimmten externen Einwirkungen zu ändern [Rotter et al. 2008]. Dabei kann eine Umwandlung, d.h. eine Transition der Muskelfaser von langsam-zu-schnell oder schnell-zu-langsam, erfolgen. Eine Transition der Muskelfaser von schnell-zu-langsam tritt bei erhöhter neuromuskulärer Aktivität, mechanischer Überbeanspruchung oder Hypothyreose auf [Pette und Staron 2001]. Im Gegensatz dazu führt eine reduzierte neuromuskuläre Aktivität, mechanische Entlastung, muskuläre Atrophie oder Hyperthyreose zu einer langsam-zu-schnell Transition [Pette und Staron 2001; Dammeijer et al. 2007]. Wie hier nach Muskeltrauma beschrieben, wandelt sich der normalerweise langsam kontrahierende M. soleus zu einem schnell kontrahierenden Muskel um. Obwohl die Mechanismen dieser Transition nicht bekannt sind, geht das Muskeltrauma mit einer Hochregulation der schnellen, schweren Myosinkette in den Myozyten einher. Die Applikation von G-CSF führt lediglich zu einer leichten Reduktion der Ratio von Kurzkontraktion-zu-Tetanie und beeinflusst somit nicht wesentlich die Fraktion der schnell und langsam kontrahierenden Muskelfasern nach Trauma.

## **5.2.3 Zelluläre Prozesse nach Muskeltrauma und G-CSF-Applikation**

### **5.2.3.1 Proliferation**

Das zelluläre Umfeld der Skelettmuskelfaser trägt wesentlich zur regenerativen Kapazität der ortsständigen Zellen bei [Ehrhardt und Morgan 2005]. Bei diversen Stimuli werden die Satellitenzellen aktiviert und kehren in den Zellzyklus zurück. So führt z.B. das kontinuierliche Training zur Proliferation der Satellitenzellen und zum Anstieg der Muskelmasse [Abernethy et al. 1994].

Neuromuskuläre Krankheiten, Denervation, zunehmendes Alter oder Trauma führen zu einer Abnahme der Zahl ruhender Satellitenzellen [Phillips et al. 1999; Tipton et al. 1999; Nierobisz et al. 2007]. Bei solchen Vorgängen kommt es zur Störung des Gleichgewichtes zwischen Degradation und Wiederherstellung der peripheren Skelettmuskulatur mit der Konsequenz, dass degenerative Prozesse am Muskel auftreten.

Aus der aktuellen Literatur geht klar hervor, dass sich Fibroblasten und Endothelzellen bei der Muskelregeneration nach Trauma beteiligen und proliferieren [Ferreira et al. 2006; Petrella et al. 2008]. Weiterhin tragen ortsständige Stammzellen des Muskels und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch deren Teilung zur Muskelregeneration bei. Trotzdem besitzen die zuletzt erwähnten Zellen bei der Regeneration einen untergeordneten Stellenwert und haben somit ein eingeschränktes Potential zur Wiederherstellung des Muskelgewebes. Die Satellitenzellen werden aktuell als Schlüsselzellen der Muskelregeneration beschrieben [Ehrhardt und Morgan 2005; Anderson 2006]. Deren Proliferation ist auch für die Wiederherstellung der Funktion verantwortlich.

Proliferative Eigenschaften von G-CSF sind bislang an mehreren Geweben beschrieben worden. So führt bei Ratten die chronische G-CSF-Behandlung nach Ballon-induziertem Gefäßschaden zur Proliferation der Zellen der Intima [Wu et al. 2008]. Des Weiteren ist bekannt, dass G-CSF-Behandlung nach Herzinfarkt zu einem Anstieg der proliferierenden Endothelzellen und der glatten Muskelzellen bei Mäusen resultiert. Proliferation von neuronalen Stammzellen ist bei G-CSF-Applikation nach intrazerebraler Blutung [Zhang et al. 2009] bekannt. Außerdem fördert G-CSF die Proliferation von Hirnzellen bei Ratten nach Apoplex [Sehara et al. 2007].

Im hier vorgestellten Versuchsvorhaben kommt es nach Trauma zu einem Anstieg der Zellproliferation im Muskel. Dabei teilen sich hauptsächlich Satellitenzellen und Fibroblasten, aber auch Endothelzellen sowie ortständige und periphere Stammzellen [Huard et al. 2003; Jarvinen et al. 2005]. Dieser proliferative Prozess wird durch G-CSF hochreguliert und führt zu einem signifikanten Anstieg der BrdU-positiven Zellen. Anhand der doppelimmunhistochemischen Analyse kann man schlussfolgern, dass G-CSF spezifisch die Satellitenzellen zur Teilung veranlasst. Naito und Mitarbeiter [Naito et al. 2009] haben kürzlich einen signifikanten Anstieg Pax7-positiver Satellitenzellen nach chronischer G-CSF-Applikation bei peripherem Skelettmuskeltrauma von Mäusen an Tag 3 beschrieben

[Naito et al. 2009]. G-CSF stellt somit scheinbar einen spezifischen Stimulus zur Proliferation von Satellitenzellen dar.

Auf molekularbiologischer Ebene führt ein Muskeltrauma zu einer Hochregulation der Phospho-Akt und der Phospho-Glykogen-Synthetase-Kinase  $3\alpha\beta$  (Phospho-GSK3 $\alpha\beta$ ). G-CSF-Applikation bewirkt eine zusätzliche Aktivierung der Akt- und GSK3 $\alpha\beta$ -Signale. Das Wachstum und die Proliferation von Muskelzellen scheint Akt-assoziiert zu sein [Conejo und Lorenzo 2001] und die GSK3 $\beta$ -Signale beteiligen sich an der Differenzierung von Muskelzellen [Fang et al. 2007]. Obwohl die genauen molekularen Mechanismen der Geweberegeneration nach G-CSF nicht bekannt sind, wird postuliert, dass G-CSF die Proteinsynthese und die Muskelregeneration durch Aktivierung der Akt/GSK3 $\alpha\beta$  Signale fördert [Naito et al. 2009].

### 5.2.3.2 Apoptose und Nekrose

Posttraumatisch zeichnet sich die Muskulatur durch zelluläre Ereignisse aus, welche mit Apoptose und Nekrose einhergehen. Apoptotische Vorgänge sind abhängig von vielen zellulären Prozessen im traumatisierten Gewebe und können die Muskelregeneration beeinflussen. So ist bekannt, dass die Muskelzellproliferation u.a. durch die Muskelzellapoptose nach Trauma reguliert wird [Carraro und Franceschi 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine antiapoptotische Wirkung von G-CSF auf die periphere Skelettmuskulatur nach Trauma gezeigt. Weiterhin wurde durch G-CSF das Überleben der Muskelzellen gefördert, sichtbar am Anstieg der Muskelgewebefraktion. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie wurde von Napoli und Mitarbeitern [Napoli et al. 2008] über Untersuchungen an Mäusen berichtet, in welchen eine G-CSF-Behandlung nach Ischämie der peripheren Skelettmuskulatur zur signifikanten Reduktion der TUNEL-positiven Zellen führte.

Obwohl die molekularen Ereignisse, welche zur Reduktion der Apoptose im Muskel führen, nicht bekannt sind, ist eine anti-apoptotische Wirkung von G-CSF auf weitere Organe wiederholt beschrieben worden. Dabei wurden die zellulären und molekularbiologischen Kaskaden, durch welche G-CSF an Herz, Hirn, Leber und Niere anti-apoptotisch wirkt, sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* untersucht und beschrieben [Kang et al. 2008; Li et al. 2008; Hiraumi et al. 2009; Solaroglu et al. 2009]. Dabei kommt es zur Produktion von anti-apoptotischen Proteinen über

Regulation sowohl des JAK-STAT-Signalweges als auch des PI3-AKT-Sinalweges. Diese Signalwege sind wichtig zur Regulation der Zellentwicklung, der Wachstumskontrolle und der Homöostase einer Zelle [Silveira et al. 2008; Himpe und Kooijman 2009].

G-CSF inhibiert *in-vitro* die NO-induzierte und Camptothecin-induzierte neuronale Apoptose durch Inhibition Apoptose-spezifischer-Proteine, nämlich der Effektor-Caspase-3 und der Poly-ADP-Ribosomen-Polymerase [Schneider et al. 2005]. Weiterhin zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass G-CSF-Applikation bei murinen Neuronen die Produktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL bewirkt [Schneider et al. 2005]. Auf ähnliche Art und Weise wurden apoptotische Vorgänge im Rahmen zerebraler Ischämie von Ratten und G-CSF-Behandlung untersucht. Schabitz und Mitarbeiter [Schabitz et al. 2003] haben gezeigt, dass es dabei zur Hochregulation des Proteins STAT-3, einer Schlüsselkomponente der apoptotischen Kaskade, in der Penumbrazone des Infarktes kommt. Komine-Kobayashi et al. [Komine-Kobayashi et al. 2006] berichteten, dass die Gabe von G-CSF bei Mäusen nach zerebraler Ischämie zur Aktivierung der JAK2/STAT3 Kaskade und zur Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 führt. Über Aktivierung von weiteren anti-apoptotischen Kaskaden wie der PI3/AKT wurde für Neuronen nach G-CSF-Behandlung berichtet [Schneider et al. 2005; Schneider et al. 2005].

Harada und Mitarbeiter berichteten [Harada et al. 2005], dass G-CSF nach Herzinfarkt bei Mäusen zur Aktivierung der JAK2 Kinase und Herunterregulation der STAT3 an den Herzmuskelzellen führt. Dabei kommt es zu einer Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL [Harada et al. 2005]. Ähnlich haben Kang und Mitarbeiter gezeigt [Kang et al. 2008], dass G-CSF die hepatozytäre Apoptose der Ratte nach akutem Leberversagen inhibiert. Dies erfolgt hauptsächlich durch Hochregulation der Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Anti-apoptotische Eigenschaften von G-CSF wurden ebenfalls nach renaler Ischämie von Li und Mitarbeitern bei Mäusen beschrieben [Li et al. 2008]. Zusammenfassend wirkt also G-CSF anti-apoptotisch durch Aktivierung der PI3/AKT Kaskade [Li et al. 2008].

### 5.2.3.3 Fibrose und Narbenbildung

Obwohl die Fibrose während der ersten Tage nach Trauma, für eine Stabilität des Gewebes sorgt [Jarvinen et al. 2005], führt nach Abschluss der Wundheilung

ein zu hoher Anteil an fibrotischen Gewebe zu Funktionsstörungen des Muskels [Charge und Rudnicki 2004]. Es ist anzunehmen, dass eine reduzierte Narbenbildung nach Muskeltrauma [Nozaki et al. 2008] langfristig zu einer verbesserten Muskelheilung führt.

Bis jetzt ist bekannt, dass G-CSF-Behandlung nach Herzinfarkt mit einer reduzierten Kollagendeposition im fibrotischen Areal des Myokards einhergeht [Minatoguchi et al. 2004]. Napoli und Mitarbeiter haben gezeigt, dass es nach Ischämie der peripheren Skelettmuskulatur und G-CSF-Applikation zur signifikanten Reduktion der Kollagenproduktion und somit zur verbesserten Regeneration kommt [Napoli et al. 2008]. Im vorliegenden Versuchsaufbau hat G-CSF keine Wirkung auf die Fibroblasten-Aktivität und beeinflusst nicht die Kollagenproduktion nach Muskeltrauma. Folglich scheint der signifikante Anstieg der Muskelkraft nach G-CSF nicht auf erhöhter Reißfestigkeit des Muskelgewebes zu basieren. Es ist somit anzunehmen, dass G-CSF hauptsächlich durch seine direkte Wirkung auf die Satellitenzellen zu einer Funktionsverbesserung führt.

#### **5.2.3.4 Leukozyteninfiltration**

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass es unmittelbar nach Muskeltrauma zum Leukozytenanstieg im Muskel kommt [Toumi und Best 2003; Gierer et al. 2004; Gradl et al. 2005; Schoen et al. 2007]. Diese lokale Infiltration von Leukozyten ist vom Verletzungsmechanismus [Smith et al. 2008] abhängig und wird nach Ischämie/Reperfusionsschaden, Muskeltrauma nach Myotoxin-Applikation oder nach direkter Krafteinwirkung beobachtet. Die Neutrophilen sammeln sich unmittelbar nach Trauma im geschädigten Gewebe an [Pizza et al. 2002; Kob et al. 2003] und produzieren freie Radikale, welche sich an der Phagozytose von Zellfragmenten beteiligen. Ein Maximum der Neutrophilen wird am Tag 1 nach Traumainduktion beobachtet, wobei die Anzahl der Zellen erst ab dem 4. Tag nach Trauma auf Normalwerte zurückgeht [Frenette et al. 2002]. Die Makrophagen migrieren nach den Neutrophilen in das geschädigte Gewebe [Pizza et al. 2002; Kob et al. 2003] und phagozytieren die zurückgebliebenen Zellfragmente. Nicht phagozytierende CD68-/CD163+ Makrophagen wandern ab dem 2. Tag in das geschädigte Gewebe ein und beteiligen sich bei der Wiederherstellung und Regeneration des traumatisierten Muskels [St Pierre und Tidball 1994; Frenette et al. 2000].

Leukozyten haben bei der Muskelregeneration nach Trauma eine wichtige Funktion. Insbesondere die Makrophagen scheinen eine regulatorische Rolle bei der initialen posttraumatischen Phase zu besitzen. Depletion von Neutrophilen [Teixeira et al. 2005] oder Makrophagen [Summan et al. 2006] führt nach Muskeltrauma bei Mäusen zu einer verzögerten Heilung des Muskels. Aus der aktuellen Literatur geht hervor, dass Leukozyten die Wiederherstellung des traumatisierten Muskels regulieren und bei der Regeneration mitwirken [Toumi et al. 2006]. Gleichzeitig begünstigen die Leukozyten die durch das Muskeltrauma ausgelöste lokale Schädigung. Dieses wird erreicht, indem die Leukozyten direkt oder indirekt Zellen und Zellfragmente lysieren und phagozytieren [Tidball 1995; Toumi et al. 2006]. Es scheint, dass Leukozyten in der akuten posttraumatischen Phase sowohl regenerative als auch degenerative Eigenschaften besitzen [Toumi et al. 2006] und dass ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Wiederherstellung der Muskulatur für die Heilung von entscheidender Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Leukozyten des Muskelgewebes zu Zeitpunkten untersucht, an denen das Muskeltrauma an sich keine leukozytäre Infiltration am Muskel bewirken kann [Tidball 2005; Toumi et al. 2006]. G-CSF führt über den gesamten experimentellen Verlauf zu einem leichten Anstieg CAE-positiver Zellen. Da G-CSF klassischerweise auf die Neutrophilen wirkt und deren phagozytotische Funktion fördert [Demetri und Griffin 1991], kann man annehmen, dass G-CSF die Muskelregeneration positiv beeinflusst. Dies erfolgt unter anderem auch durch eine erhöhte Phagozytoserate von Zellfragmenten durch die Neutrophilen vor dem 4. Tag nach Trauma. Diese Aussage scheint wahrscheinlich, wenn man den Parameter der Muskelgewebefraktion als Kehrwert des Granulationsgewebes betrachtet. Somit geht die chronische Behandlung mit G-CSF am 14. Tag nach Trauma mit einer erhöhten Muskelgewebefraktion, d.h. mit reduziertem Granulationsgewebe, einher. Dieser Anstieg der Muskelgewebefraktion mag aus der am Anfang erhöhten phagozytotischen Aktivität der Leukozyten resultieren.

#### **5.2.4 Systemische Leukozytenzahl nach Trauma und G-CSF-Behandlung**

Wie hier dargestellt und bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, scheint das Muskeltrauma die systemische Leukozytenzahl nicht zu beeinflussen

[Gierer et al. 2007; Gierer et al. 2008]. Sham- und NaCl-behandelte Tiere weisen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer systemischen Leukozytenzahl auf.

Es ist aus zahlreichen klinischen und experimentellen Studien bekannt, dass G-CSF nach systemischer Applikation eine signifikante Leukozytose bewirkt. Im hier vorgestellten experimentellen Aufbau führte die chronische Behandlung mit G-CSF jedoch an allen Untersuchungszeitpunkten und 24h nach der letzten i.p. Injektion zu keiner erhöhten Leukozytenzahl.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Untersuchungen am Affen haben gezeigt, dass G-CSF zu einem signifikanten Anstieg der systemischen Leukozytenzahl zwischen der 6. und 12. Stunde nach Applikation führt [Tanaka et al. 1997]. Von Tanaka und Mitarbeitern wurde - ähnlich wie hier - gezeigt, dass diese Versuchstiere bei täglicher G-CSF-Behandlung (5 und 10µg/kg KG) und 24h nach der letzten Applikation eine normale systemische Leukozytenzahl aufwiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Bauhofer und Mitarbeitern publiziert. Dabei bewirkte bei Ratten nach hämorrhagischem Schock die i.p. Applikation von 20µg/kg KG 24h nach Injektion keinen signifikanten Anstieg der systemischen Leukozytenzahl [Bauhofer et al. 2006]. Bei einer Folgestudie der gleichen Arbeitsgruppe zeigten die Ratten jedoch 12h nach Applikation von 20µg/kg KG G-CSF eine signifikante Leukozytose [Bauhofer et al. 2008].

### **5.2.5 Stammzellmobilisation und Geweberegeneration nach G-CSF-Applikation**

Es ist bekannt, dass die Behandlung mit G-CSF CD34+ hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in der Blutbahn mobilisiert [Grigg et al. 1995]. Überwiegend tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass G-CSF-Behandlung nach Ischämie an Herz und Hirn das Infarktareal reduziert und das Überleben des Gewebes hauptsächlich durch Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark fördert [Six et al. 2003; Archundia et al. 2005]. Weiterhin wird beschrieben, dass diese mobilisierten Zellen in das traumatisierte Gewebe einwandern, dort proliferieren und sich weiterdifferenzieren. Abedi und Mitarbeiter beschrieben, dass G-CSF Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und dass diese mobilisierten Zellen nach Muskeltrauma zur Muskelregeneration beitragen [Abedi et al. 2004]. Hinzu ist bekannt, dass CD45+ hämatopoetische Vorläuferzellen sich bei der Muskelregeneration nach Myotoxin-induziertem Muskelschaden

beteiligen [Mori et al. 2008]. Ebenso berichteten Ratajczak und Mitarbeiter [Ratajczak et al. 2004], dass Stammzellen aus dem Knochenmark sich zu muskelspezifischen Vorläuferzellen mobilisieren und differenzieren lassen. Diese Daten sprechen dafür, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch G-CSF mobilisiert werden und sich bei regenerativen Prozessen beteiligen können.

Inwieweit die Geweberegeneration nach Muskeltrauma und G-CSF-Applikation durch Stammzellen aus dem Knochenmark hervorgeht oder durch direkte Wirkung auf die Satellitenzellen verursacht wird, ist durch den hier vorgestellten experimentellen Aufbau nicht endgültig nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, dass G-CSF die Proliferation der Satellitenzellen vorantreibt und damit direkt auf den traumatisierten Muskel wirkt. Ähnlich wie hier wurde eine lokale Wirkung von G-CSF von Naito et al. auf den Muskel [Naito et al. 2009] durch Erhöhung der Satellitenzellproliferation beschrieben. Zudem wurde von Kataoka und Mitarbeitern [Kataoka et al. 2003] der G-CSF-R auf murinen Myoblasten nachgewiesen. Weiterhin stellen lokale Wirkungen von G-CSF auf nicht hämatopoetisches Gewebe keine Seltenheit dar, da regenerative Eigenschaften der Substanz auf Kardiomyozyten [Srinivas et al. 2009] oder Neuronen [Klocke et al. 2008] bereits bekannt sind.

Früher ging man davon aus, dass G-CSF seine Wirkung hauptsächlich durch Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark betreibt. Neue Erkenntnisse zeigen, dass G-CSF auch lokal an den traumatisierten Zellen wirken kann und dadurch die Regeneration fördert. Obwohl die Satellitenzellen für die funktionelle Restauration nach Muskeltrauma verantwortlich sind [Sinanan et al. 2006], ist nicht auszuschließen, dass beide der o.g. Mechanismen sich an der Muskelregeneration beteiligen.

### **5.3 Limitationen und Ausblick**

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersuchte die Pathophysiologie des Muskeltraumas und die Mechanismen, die zur verbesserten Regeneration nach G-CSF-Behandlung führten. Unsere Untersuchungen fokussierten auf funktionelle und histologische Parameter nach Muskeltrauma und G-CSF-Applikation. Die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge der Regeneration wurden dabei nicht untersucht.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit nicht auf die Angiogenese nach Muskeltrauma und G-CSF-Behandlung eingegangen. Weiterführende

Untersuchungen der Gefäßdichte sowie der Apoptose und der Proliferation von Endothelzellen wären hierfür notwendig.

Ob der regenerative Effekt von G-CSF hauptsächlich durch Stammzellen aus dem Knochenmark oder überwiegend durch direkte Wirkung der Substanz auf die Satellitenzellen vermittelt wird, bleibt unklar. Zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um diese Fragestellung mit spezifischen Stammzellmarkern zu beantworten.

G-CSF wird seit mehr als 20 Jahren zur Behandlung von neutropenischen Patienten eingesetzt und gilt im klinischen Alltag als sicheres Medikament mit wenigen Nebenwirkungen. Mehrere experimentelle Studien haben vorteilhafte Wirkungen von G-CSF auf Herz, Hirn, Niere und Leber gezeigt und diese Arbeiten dienen derzeit als Basis für weiterführende klinische Studien im Bereich der Kardiologie und Neurologie.

Schlussfolgernd kann man postulieren, dass das pleiotrope Zytokin G-CSF ein vielversprechendes Therapiekonzept zur Behandlung von Muskeltraumata sein könnte. Infolgedessen kann die hier untersuchte Substanz einen attraktiven adjuvanten Therapieansatz zu den herkömmlichen Behandlungsmöglichkeiten der Muskelverletzungen darstellen.

## 6 THESEN

**Thema:**

### **Einfluss von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor auf die traumatisierte periphere Skelettmuskulatur der Ratte**

- Muskeltraumata und deren Folgezustände stellen ein wesentliches Problem in der Traumatologie dar.
- Pathophysiologisch kommt es direkt nach Trauma zur Nekrose, Degeneration und Inflammation des Gewebes. Diese Ereignisse werden von regenerativen Prozessen und später von einer Narbenbildung gefolgt.
- Wachstumsfaktoren fördern nach Verletzung die Wiederherstellung des traumatisierten Gewebes und besitzen einen hohen Stellenwert bei regenerativen Prozessen. Der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF ist ein endogenes Polypeptid, welches über pleiotrope Eigenschaften verfügt und regenerative Wirkung auf Herz, Hirn, Niere und Leber aufweist.
- Ziel dieser Arbeit war es, die Regenerationskapazität der Skelettmuskulatur nach G-CSF-Applikation in einem Tiermodell des lokalen Muskelschadens zu evaluieren. Hierfür wurden am traumatisierten Muskel funktionelle Parameter untersucht sowie regenerative Prozesse nach Muskeltrauma analysiert.
- Die Muskelkraft ist nach Muskeltrauma reduziert und wird durch G-CSF-Applikation sowohl im Sinne der Tetanie am 7. Tag als auch im Sinne der Kurzkontraktion am 14. Tag verbessert.
- Das Muskeltrauma führt zu einer Reduktion der Ratio Kurzkontraktion zu Tetanie. Diese Reduktion lässt auf einen morphologischen Wechsel des langsam kontrahierenden M. soleus in den Phänotyp eines schnell kontrahierenden Muskels nach Trauma schließen. G-CSF scheint diesen posttraumatischen morphologischen Wechsel nicht wesentlich zu beeinflussen.

- 
- Die regenerative Potenz von G-CSF auf die traumatisierte periphere Skelettmuskulatur wird sowohl durch einen Anstieg der Zellproliferation und speziell der Satellitenzellen als auch durch die leichte Reduktion der Muskelzellapoptose 4 Tage nach Trauma erzielt.
  - Der Anstieg der Muskelkraft beruht nicht auf einer erhöhten Reißfestigkeit des Gewebes, da die Narbenbildung zwischen allen drei Gruppen und untersuchten Zeitpunkten gleich war.
  - Weiterhin führte das Muskeltrauma zu einer Reduktion der Muskelgewebefraktion über den gesamten experimentellen Verlauf. G-CSF förderte das Überleben von Myozyten, was sich in einem bedeutenden Anstieg der Muskelgewebefraktion zeigte.
  - Die Zahl der lokal infiltrierenden Leukozyten als Marker der inflammatorischen Gewebereaktion wird, zumindest ab dem 4. Tag, durch G-CSF nicht beeinflusst und ist zwischen der sham-, Trauma- und Trauma/G-CSF-Gruppe gleich.
  - Die systemische Leukozytenzahl zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen und den untersuchten Zeitpunkten.
  - Die Konzentration der Creatin-Kinase im Plasma der Tiere als systemischer Parameter der Muskeltrauma-Intensität ist bei allen Gruppen und Zeitpunkten gleich.
  - Eine tägliche i.p. Injektion von G-CSF bewirkt eine schnellere und bessere Restauration der Skelettmuskelfunktion nach schwerem Trauma.
  - G-CSF stellt einen attraktiven adjuvanten Therapieansatz im Management von Patienten mit schwerem Weichteiltrauma dar.

## 7 LITERATUR

- Abedi M, Greer DA, Colvin GA, Demers DA, Dooner MS, Harpel JA, Weier HU, Lambert JF, Quesenberry PJ. Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process. *Exp Hematol*. 2004; 32:426-434.
- Abernethy PJ, Jurimae J, Logan PA, Taylor AW, Thayer RE. Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise. *Sports Med*. 1994; 17:22-38.
- Adams V, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G. Apoptosis in skeletal muscle. *Front Biosci*. 2001; 6:D1-D11.
- Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H. New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma*. 2005; 58:51-58.
- Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1995; 165:307-312.
- Almekinders LC. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports Med*. 1999; 28:383-388.
- Anderson JE. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol*. 2006; 209:2276-2292.
- Archundia A, Aceves JL, Lopez-Hernandez M, Alvarado M, Rodriguez E, Diaz Quiroz G, Paez A, Rojas FM, Montano LF. Direct cardiac injection of G-CSF mobilized bone-marrow stem-cells improves ventricular function in old myocardial infarction. *Life Sci*. 2005; 78:279-283.
- Ascensao A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhaes J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem*. 2008; 41:841-851.
- Ausoni S, Sartore S. From fish to amphibians to mammals: in search of novel strategies to optimize cardiac regeneration. *J Cell Biol*. 2009; 184:357-364.
- Avalos BR. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 1996; 88:761-777.
- Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20:625-635.
- Baba M, Hasegawa H, Nakayabu M, Shimizu N, Suzuki S, Kamada N, Tani K. Establishment and characteristics of a gastric cancer cell line (HuGC-OOHIRA) producing high levels of G-CSF, GM-CSF, and IL-6: the presence of autocrine growth control by G-CSF. *Am J Hematol*. 1995; 49:207-215.
- Backman E. Methods for measurement of muscle function. Methodological aspects, reference values for children, and clinical applications. *Scand J Rehabil Med Suppl*. 1988; 20:9-95.
- Bauhofer A, Huttel M, Lorenz W, Sessler DI, Torossian A. Differential effects of antibiotics in combination with G-CSF on survival and polymorphonuclear granulocyte cell functions in septic rats. *BMC Infect Dis*. 2008; 8:55.
- Bauhofer A, Lorenz W, Kohlert F, Torossian A. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis improves survival and inflammation in a two-hit model of hemorrhage and sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34:778-784.
- Beck JL, Day RW. Overuse injuries. *Clin Sports Med*. 1985; 4:553-573.
- Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappell D, Hammer C. Morphological assessment of reperfusion injury in a concordant xenogeneic primate model. *Ann Transplant*. 2003; 8:50-52.
- Bickhardt K, Carstensen CA. [Use of the Reflotron system for the determination of creatine kinase (CK) in the blood of swine, sheep, cattle, horses and dogs]. *Tierarztl Prax*. 1992; 20:326-331.

- Bischoff R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 1990; 111:201-207.
- Bleakley CM, McDonough SM, MacAuley DC, Bjordal J. Cryotherapy for acute ankle sprains: a randomised controlled study of two different icing protocols. *Br J Sports Med.* 2006; 40:700-705; discussion 705.
- Borisov AB. Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals: do nonprimate models resemble human pathology? *Wound Repair Regen.* 1999; 7:26-35.
- Bornemann A, Schmalbruch H. Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle. *Anat Rec.* 1994; 239:119-125.
- Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *J Orthop Res.* 2004; 22:1336-1344.
- Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature.* 1989; 337:471-473.
- Carlson BM. The regeneration of a limb muscle in the axolotl from minced fragments. *Anat Rec.* 1970; 166:423-434.
- Carlson BM. A review of muscle transplantation in mammals. *Physiol Bohemoslov.* 1978; 27:387-400.
- Carraro U, Franceschi C. Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging (Milano).* 1997; 9:19-34.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84:209-238.
- Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009; 37:18-22.
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003; 163:1133-1143.
- Cho HJ, Kim TY, Park KW, Zhang SY, Kim JH, Kim SH, Hahn JY, Kang HJ, Park YB, Kim HS. The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48:366-374.
- Clarkson PM, Byrnes WC, McCormick KM, Turcotte LP, White JS. Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int J Sports Med.* 1986; 7:152-155.
- Conejo R, Lorenzo M. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol.* 2001; 187:96-108.
- Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997; 191:270-283.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994; 22:702-710.
- Dai Y, Ashraf M, Zuo S, Uemura R, Dai YS, Wang Y, Haider H, Li T, Xu M. Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44:607-617.
- Dalakas MC. Immunopathogenesis of inflammatory myopathies. *Ann Neurol.* 1995; 37 Suppl 1:S74-86.
- Dammeijer PF, Dijk P, Chenault MN, Manni JJ, Mameren H. Stapedius muscle fibre characterization in the noise exposed and auditory deprived rat. *Hear Res.* 2007; 233:54-66.
- Dartnall TJ, Rogasch NC, Nordstrom MA, Semmler JG. Eccentric muscle damage has variable effects on motor unit recruitment thresholds and discharge patterns in elbow flexor muscles. *J Neurophysiol.* 2009;

- Deal DN, Tipton J, Rosencrance E, Curl WW, Smith TL. Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A:1573-1578.
- Delbono O, Xia J, Treves S, Wang ZM, Jimenez-Moreno R, Payne AM, Messi ML, Briguet A, Schaerer F, Nishi M, Takeshima H, Zorzato F. Loss of skeletal muscle strength by ablation of the sarcoplasmic reticulum protein JP45. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:20108-20113.
- Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 1991; 78:2791-2808.
- Devor ST, Faulkner JA. Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury. *J Appl Physiol.* 1999; 87:750-756.
- Doll B, Sfeir C, Winn S, Huard J, Hollinger J. Critical aspects of tissue-engineered therapy for bone regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001; 11:173-198.
- Duan H, Chai J, Sheng Z, Yao Y, Yin H, Liang L, Shen C, Lin J. Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats. *Apoptosis.* 2009; 14:52-65.
- Dugan EL, Doyle TL, Humphries B, Hasson CJ, Newton RU. Determining the optimal load for jump squats: a review of methods and calculations. *J Strength Cond Res.* 2004; 18:668-674.
- Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, Gurley CM, Peterson CA. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol.* 1999; 277:C589-597.
- Egginton S, Zhou AL, Brown MD, Hudlicka O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:634-646.
- Ehrhardt J, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol.* 2005; 18:548-553.
- Fang Y, Gong SJ, Xu YH, Hambly BD, Bao S. Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *Br J Dermatol.* 2007; 157:458-465.
- Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensao A, Magalhaes J, Vitorino R, Duarte JA, Amado F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 97:340-346.
- Fink E, Fortin D, Serrurier B, Ventura-Clapier R, Bigard AX. Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *J Muscle Res Cell Motil.* 2003; 24:421-429.
- Fitts RH, Widrick JJ. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exerc Sport Sci Rev.* 1996; 24:427-473.
- Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17:235-244.
- Frenette J, Cai B, Tidball JG. Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use. *Am J Pathol.* 2000; 156:2103-2110.
- Frenette R, Blouin M, Brideau C, Chauret N, Ducharme Y, Friesen RW, Hamel P, Jones TR, Laliberte F, Li C, Masson P, McAuliffe M, Girard Y. Substituted 4-(2,2-diphenylethyl)pyridine-N-oxides as phosphodiesterase-4 inhibitors: SAR study directed toward the improvement of pharmacokinetic parameters. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002; 12:3009-3013.
- Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24:67-72.
- Gierer P, Hoffmann JN, Mahr F, Menger MD, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia. *Crit Care Med.* 2007; 35:1966-1971.
- Gierer P, Hoffmann JN, Mahr F, Menger MD, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. Sublethal trauma model with systemic endotoxemia for the study of microcirculatory disorders after the second hit. *J Surg Res.* 2008; 147:68-74.

- Gierer P, Vollmar B, Schaser KD, Andreas C, Gradl G, Mittlmeier T. Efficiency of small-volume resuscitation in restoration of disturbed skeletal muscle microcirculation after soft-tissue trauma and haemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389:40-45.
- Goding GS, Jr., Al-Sharif KI, McLoon LK. Myonuclear addition to uninjured laryngeal myofibers in adult rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114:552-557.
- Gosselin LE. Attenuation of force deficit after lengthening contractions in soleus muscle from trained rats. *J Appl Physiol.* 2000; 88:1254-1258.
- Gradl G, Finke B, Schattner S, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. Continuous intra-arterial application of substance P induces signs and symptoms of experimental complex regional pain syndrome (CRPS) such as edema, inflammation and mechanical pain but no thermal pain. *Neuroscience.* 2007; 148:757-765.
- Gradl G, Gaida S, Finke B, Lindenblatt N, Gierer P, Menger MD, Mittlmeier T, Vollmar B. Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. *Shock.* 2005; 24:219-225.
- Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood.* 1995; 86:4437-4445.
- Grounds MD. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:78-91.
- Grounds MD, McGeachie JK. Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mdx mice: an autoradiographic study. *Muscle Nerve.* 1992; 15:580-586.
- Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:589-610.
- Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* 2005; 11:305-311.
- Hawke TJ, Atkinson DJ, Kanatous SB, Van der Ven PF, Goetsch SC, Garry DJ. Xin, an actin binding protein, is expressed within muscle satellite cells and newly regenerated skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:C1636-1644.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001; 91:534-551.
- Hayashi M, Hirose H, Sasaki E, Senga S, Murakawa S, Mori Y, Furusawa Y, Banodo M. Evaluation of ischemic damage in the skeletal muscle with the use of electrical properties. *J Surg Res.* 1998; 80:266-271.
- Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ. Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci.* 2006; 26:6873-6884.
- He L, Li G, Feng X, Shi H, Chang D, Ye K, Wang S. Effect of energy compound on skeletal muscle strain injury and regeneration in rats. *Ind Health.* 2008; 46:506-512.
- Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors.* 2009; 35:76-81.
- Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Toyokuni S, Nakahata T, Adachi S. Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296:H823-832.
- Hofmann A, Blau HM. Death of solid tumor cells induced by Fas ligand expressing primary myoblasts. *Somat Cell Mol Genet.* 1997; 23:249-257.

- Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A:822-832.
- Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med.* 2003; 5:93-108.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23:801-810.
- Ichiishi E, Yoshikawa T, Kogawa T, Yoshida N, Kondo M. Possible paracrine growth of adenocarcinoma of the stomach induced by granulocyte colony stimulating factor produced by squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Gut.* 2000; 46:432-434.
- Ieishi K, Nomura M, Kawano T, Fujimoto S, Ikefuji H, Noda Y, Nishikado A, Ito S. The effect of G-CSF in a myocardial ischemia reperfusion model rat. *J Med Invest.* 2007; 54:177-183.
- Jacobs SC, Bar PR, Bootsma AL. Effect of hypothyroidism on satellite cells and postnatal fiber development in the soleus muscle of rat. *Cell Tissue Res.* 1996; 286:137-144.
- James TN, Terasaki F, Pavlovich ER, Vikhert AM. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. *J Lab Clin Med.* 1993; 122:309-323.
- Jarvinen JL, Lamb TD. Inverted photocurrent responses from amphibian rod photoreceptors: role of membrane voltage in response recovery. *J Physiol.* 2005; 566:455-466.
- Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand.* 1976; 142:47-56.
- Jarvinen M, Sorvari T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1975; 83:259-265.
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33:745-764.
- Jennische E, Ekberg S, Matejka GL. Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993; 265:C122-128.
- Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10:332-337.
- Kaariainen M, Liljamo T, Pelto-Huikko M, Heino J, Jarvinen M, Kalimo H. Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11:360-369.
- Kang S, Yang Y, Li CJ, Gao R. Effectiveness and tolerability of administration of granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Ther.* 2007; 29:2406-2418.
- Kang W, Liu ZW, Han QY, Zhang L, Lei Y, Lou S. [Effects of granulocyte colony-stimulating factor on hepatocyte apoptosis in acute liver failure: experiment with rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008; 88:980-984.
- Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA, Jarvinen M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scand J Med Sci Sports.* 2003; 13:150-154.
- Kataoka Y, Matsumura I, Ezoe S, Nakata S, Takigawa E, Sato Y, Kawasaki A, Yokota T, Nakajima K, Felsani A, Kanakura Y. Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts. *J Biol Chem.* 2003; 278:44178-44187.
- Kaygusuz MA, Turan CC, Aydin NE, Temel I, Firat S, Bulut T, Kuku I. The effects of G-CSF and naproxen sodium on the serum TGF-beta1 level and fracture healing in rat tibias. *Life Sci.* 2006; 80:67-73.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-257.
- Khan MA. Effects of myotoxins on skeletal muscle fibers. *Prog Neurobiol*. 1995; 46:541-560.
- Klocke R, Kuhlmann MT, Scobioala S, Schabitz WR, Nikol S. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. *Curr Med Chem*. 2008; 15:968-977.
- Knappe T, Mittlmeier T, Eipel C, Amon M, Menger MD, Vollmar B. Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice. *Crit Care Med*. 2005; 33:1805-1813.
- Kob M, Harvey J, Schautzer F, Kascha S, Bibl D, Egg R, Reindl M, Berger T, Deisenhammer F. A novel and rapid assay for the detection of neutralizing antibodies against interferon-beta. *Mult Scler*. 2003; 9:32-35.
- Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res*. 2007; 1149:223-231.
- Komi PV, Viitasalo JT. Changes in motor unit activity and metabolism in human skeletal muscle during and after repeated eccentric and concentric contractions. *Acta Physiol Scand*. 1977; 100:246-254.
- Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26:402-413.
- Kuschel R, Deininger MH, Meyermann R, Bornemann A, Yablonka-Reuveni Z, Schluesener HJ. Allograft inflammatory factor-1 is expressed by macrophages in injured skeletal muscle and abrogates proliferation and differentiation of satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59:323-332.
- Kylarova D, Prochazkova J, Mad'arova J, Bartos J, Lichnovsky V. Comparison of the TUNEL, lamin B and annexin V methods for the detection of apoptosis by flow cytometry. *Acta Histochem*. 2002; 104:367-370.
- LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002; 111:589-601.
- Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med*. 2008; 216:117-126.
- Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br*. 1985; 67:820-828.
- Li D, Yue Y, Duan D. Preservation of muscle force in Mdx3cv mice correlates with low-level expression of a near full-length dystrophin protein. *Am J Pathol*. 2008; 172:1332-1341.
- Li Y, Fukuda N, Yokoyama S, Kusumi Y, Hagikura K, Kawano T, Takayama T, Matsumoto T, Satomi A, Honye J, Mugishima H, Mitsumata M, Saito S. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 549:98-106.
- Li Y, Wu J, Shou Z, He Q, Zhang P, Han F, Li H, Chen J. Pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor attenuated renal ischaemia and reperfusion injury via activation of PI3/Akt signal pathway. *Nephrology (Carlton)*. 2008; 13:508-516.
- Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*. 2000; 36:145-151.

- Lovejoy B, Cascio D, Eisenberg D. Crystal structure of canine and bovine granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *J Mol Biol.* 1993; 234:640-653.
- Lynch GS, Rafael JA, Chamberlain JS, Faulkner JA. Contraction-induced injury to single permeabilized muscle fibers from mdx, transgenic mdx, and control mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279:C1290-1294.
- MacIntosh BR, Rassier DE. What is fatigue? *Can J Appl Physiol.* 2002; 27:42-55.
- Marquette ML, Byerly D, Sognier M. The effects of three-dimensional cell culture on single myoblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008; 44:105-114.
- Matsuura T, Li Y, Giacobino JP, Fu FH, Huard J. Skeletal muscle fiber type conversion during the repair of mouse soleus: potential implications for muscle healing after injury. *J Orthop Res.* 2007; 25:1534-1540.
- Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng.* 2006; 12:361-367.
- Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9:493-495.
- Meffert RH, Frey SP, Jansen H, Ochman S, Raschke MJ, Langer M. Muscle strength quantification in small animals: a new transcutaneous technique in rabbits. *J Orthop Res.* 2008; 26:1526-1532.
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med.* 1999; 27:222-229.
- Michaut A, Pousson M, Ballay Y, Van Hoecke J. Short-term changes in the series elastic component after an acute eccentric exercise of the elbow flexors. *Eur J Appl Physiol.* 2001; 84:569-574.
- Minamino K, Adachi Y, Okigaki M, Ito H, Togawa Y, Fujita K, Tomita M, Suzuki Y, Zhang Y, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Matsubara H, Iwasaka T, Matsumura M, Ikehara S. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. *Stem Cells.* 2005; 23:347-354.
- Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation.* 2004; 109:2572-2580.
- Mittlmeier T, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Raschke M, Schaser KD. Small volume hypertonic hydroxyethyl starch reduces acute microvascular dysfunction after closed soft-tissue trauma. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85:126-132.
- Molenaar HM, Selles RW, Schreuders TA, Hovius SE, Stam HJ. Reliability of hand strength measurements using the Rotterdam Intrinsic Hand Myometer in children. *J Hand Surg [Am].* 2008; 33:1796-1801.
- Molloy RG, Holzheimer R, Nestor M, Collins K, Mannick JA, Rodrick ML. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates immune function and improves survival after experimental thermal injury. *Br J Surg.* 1995; 82:770-776.
- Mori J, Ishihara Y, Matsuo K, Nakajima H, Terada N, Kosaka K, Kizaki Z, Sugimoto T. Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration in acid alpha-glucosidase knockout mice. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56:811-817.
- Mozdziak PE, Truong Q, Macius A, Schultz E. Hindlimb suspension reduces muscle regeneration. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998; 78:136-140.
- Naito T, Goto K, Morioka S, Matsuba Y, Akema T, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Yoshioka T. Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3alpha signals. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 105:643-651.

- Napoli C, William-Ignarro S, Byrns R, Balestrieri ML, Crimi E, Farzati B, Mancini FP, de Nigris F, Matarazzo A, D'Amora M, Abbondanza C, Fiorito C, Giovane A, Florio A, Varricchio E, Palagiano A, Minucci PB, Tecce MF, Giordano A, Pavan A, Ignarro LJ. Therapeutic targeting of the stem cell niche in experimental hindlimb ischemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008; 5:571-579.
- Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng*. 2004; 10:1093-1112.
- Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci*. 1983; 61:109-122.
- Nierobisz LS, Felts V, Mozdziak PE. The effect of early dietary amino acid levels on muscle satellite cell dynamics in turkeys. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2007; 148:286-294.
- Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66:724-731.
- Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, Sacco P. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc*. 2001; 33:1490-1495.
- Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med*. 2008; 36:2354-2362.
- O'Grady M, Hackney AC, Schneider K, Bossen E, Steinberg K, Douglas JM, Jr., Murray WJ, Watkins WD. Diclofenac sodium (Voltaren) reduced exercise-induced injury in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2000; 32:1191-1196.
- O'Reilly M, Silver GM, Gamelli RL, Davis JH, Hebert JC. Dose dependency of granulocyte-macrophage colony stimulating factor for improving survival following burn wound infection. *J Trauma*. 1994; 36:486-490.
- Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am J Sports Med*. 1994; 22:558-561.
- Oestern HJ, Tscherne H. [Physiopathology and classification of soft tissue lesion]. *Hefte Unfallheilkd*. 1983; 162:1-10.
- Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, Shimada K, Ogawa H, Daida H, Hattori K, Ohsaka A. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J*. 2005; 19:2005-2007.
- Page AV, Liles WC. Granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and other immunomodulatory therapies for the treatment of infectious diseases in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13:575-580.
- Paoloni JA, Orchard JW. The use of therapeutic medications for soft-tissue injuries in sports medicine. *Med J Aust*. 2005; 183:384-388.
- Petrella JK, Kim JS, Mayhew DL, Cross JM, Bamman MM. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol*. 2008; 104:1736-1742.
- Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001; 115:359-372.
- Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, Wolfe RR. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol*. 1999; 276:E118-124.

- Piestun Y, Harel M, Barak M, Yahav S, Halevy O. Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol.* 2009; 106:233-240.
- Pipinos, II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, Dodd SL. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg.* 2007; 41:481-489.
- Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol.* 2002; 92:1873-1878.
- Prather RS, Boquest AC, Day BN. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells. *Cloning.* 1999; 1:17-24.
- Primeau AJ, Adihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol.* 2002; 27:349-395.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med.* 1999; 27:54-59.
- Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia.* 2004; 18:29-40.
- Redpath JL, Antoniono RJ, Sun C, Gerstenberg HM, Blakely WF. Late mitosis/early G1 phase and mid-G1 phase are not hypersensitive cell cycle phases for neoplastic transformation of HeLa x skin fibroblast human hybrid cells induced by fission-spectrum neutrons. *Radiat Res.* 1995; 141:37-43.
- Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res.* 2008; 26:1618-1626.
- Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, Oishi Y, Baldwin KM, Edgerton VR. Differential response of fast hindlimb extensor and flexor muscles to exercise in adult spinalized cats. *Muscle Nerve.* 1999; 22:230-241.
- Sacramento CB, Cantagalli VD, Grings M, Carvalho LP, Baptista-Silva JC, Beutel A, Bergamaschi CT, de Campos Junior RR, de Moraes JZ, Takiya CM, Samoto VY, Borojevic R, da Silva FH, Nardi NB, Dohmann HF, Junior HS, Valero VB, Han SW. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene based therapy for acute limb ischemia in a mouse model. *J Gene Med.* 2009;
- Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, Shoji M, Iso Y, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Kawachi K, Wakabayashi K, Takeyama Y. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol.* 2008; 127:166-173.
- Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, Sommer C, Schwab S. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2003; 34:745-751.
- Schabitz WR, Schneider A. Developing granulocyte-colony stimulating factor for the treatment of stroke: current status of clinical trials. *Stroke.* 2006; 37:1654; author reply 1655.
- Schaser KD, Bail HJ, Schewior L, Stover JF, Melcher I, Haas NP, Mittlmeier T. Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *J Orthop Res.* 2005; 23:231-241.
- Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lubbe AS, Haas NP, Mittlmeier T. In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J Orthop Res.* 1999; 17:678-685.
- Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000; 23:617-626.
- Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A,

- Kuhn HG, Schabitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115:2083-2098.
- Schneider A, Kuhn HG, Schabitz WR. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle.* 2005; 4:1753-1757.
- Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, Mittlmeier T, Vollmar B. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma.* 2007; 63:788-797.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-322.
- Seale P, Poleskaya A, Rudnicki MA. Adult stem cell specification by Wnt signaling in muscle regeneration. *Cell Cycle.* 2003; 2:418-419.
- Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Zhang H, Tsuchiya A, Yamashita T, Lukic V, Nagai M, Kamiya T, Abe K. G-CSF enhances stem cell proliferation in rat hippocampus after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 2007; 418:248-252.
- Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ.* 2006; 174:927-933.
- Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procopio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CH, Lopes LR, Curi R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol.* 2008; 217:1-12.
- Sinanan AC, Buxton PG, Lewis MP. Muscling in on stem cells. *Biol Cell.* 2006; 98:203-214.
- Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 2003; 458:327-328.
- Sjoberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res.* 1994; 214:447-458.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008; 38:947-969.
- Smith CK, 2nd, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol.* 1994; 159:379-385.
- Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, McKee NH, Plyley MJ. Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 90:1407-1414.
- Smith TL, Curl WW, Smith BP, Holden MB, Wise T, Marr A, Koman LA. New skeletal muscle model for the longitudinal study of alterations in microcirculation following contusion and cryotherapy. *Microsurgery.* 1993; 14:487-493.
- Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, Zhang JH. A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke.* 2006; 37:1123-1128.
- Solaroglu I, Cahill J, Tsubokawa T, Beskonakli E, Zhang JH. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. *Neurol Res.* 2009; 31:167-172.
- Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev.* 1999; 5:5-21.
- Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration: a novel treatment option for acute myocardial infarction. *Cardiol Rev.* 2009; 17:1-9.
- St Pierre BA, Tidball JG. Macrophage activation and muscle remodeling at myotendinous junctions after modifications in muscle loading. *Am J Pathol.* 1994; 145:1463-1471.
- Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, Simeonova PP. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290:R1488-1495.

- Takagi Y, Yoshiyama M, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Nakamura Y, Akioka K, Takeuchi K, Yoshikawa J. Effects of granulocyte-colony stimulating factor on cardiac remodeling after myocardial infarction. *Osaka City Med J.* 2005; 51:43-50.
- Takano H, Ohtsuka M, Akazawa H, Toko H, Harada M, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Pleiotropic effects of cytokines on acute myocardial infarction: G-CSF as a novel therapy for acute myocardial infarction. *Curr Pharm Des.* 2003; 9:1121-1127.
- Takano H, Ueda K, Hasegawa H, Komuro I. G-CSF therapy for acute myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28:512-517.
- Tamaki T, Uchiyama Y, Okada Y, Tono K, Nitta M, Hoshi A, Akatsuka A. Multiple stimulations for muscle-nerve-blood vessel unit in compensatory hypertrophied skeletal muscle of rat surgical ablation model. *Histochem Cell Biol.* 2009;
- Tamura K. Use of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in clinical practice in Fukuoka City area in Japan. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 1999; 90:279-285.
- Tanaka H, Tanaka Y, Shinagawa K, Yamagishi Y, Ohtaki K, Asano K. Three types of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor have equivalent biological activities in monkeys. *Cytokine.* 1997; 9:360-369.
- Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, Taniuchi S, Kaneko K, Adachi Y, Ikehara S. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 2008; 72:1351-1358.
- Tatsumi R, Shimada K, Hattori A. Fluorescence detection of calcium-binding proteins with quinoline Ca-indicator quin2. *Anal Biochem.* 1997; 254:126-131.
- Teixeira CF, Chaves F, Zamuner SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Gutierrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int J Exp Pathol.* 2005; 86:107-115.
- Thorsson O, Lilja B, Nilsson P, Westlin N. Immediate external compression in the management of an acute muscle injury. *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7:182-190.
- Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med.* 1998; 26:172-176.
- Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27:1022-1032.
- Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288:R345-353.
- Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE, Spencer MJ. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J Cell Sci.* 1995; 108 ( Pt 6):2197-2204.
- Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Jr., Wolfe RR. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol.* 1999; 276:E628-634.
- Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med.* 2003; 37:284-286.
- Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat.* 2006; 208:459-470.
- Tsonis PA, Sargent MT, Del Rio-Tsonis K, Jung JC. 9-cis retinoic acid antagonizes the stimulatory effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells: interactions of their receptors. *Int J Dev Biol.* 1996; 40:1053-1059.
- Uehara K, Goto K, Kobayashi T, Kojima A, Akema T, Sugiura T, Yamada S, Ohira Y, Yoshioka T, Aoki H. Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol.* 2004; 54:263-271.
- Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12:584-587.

- Velders M, Legerlotz K, Falconer SJ, Stott NS, McMahon CD, Smith HK. Effect of botulinum toxin A-induced paralysis and exercise training on mechanosensing and signalling gene expression in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Exp Physiol.* 2008; 93:1273-1283.
- Wallace H, Watson A, Egar M. Regeneration of subnormally innervated axolotl arms. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 62:1-11.
- Wu X, Wang K, Cui L, Wang Y, Wang X, Meng L, Cheng Y. Effects of granulocyte-colony stimulating factor on the repair of balloon-injured arteries. *Pathology.* 2008; 40:513-519.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.
- Xiao BG, Lu CZ, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J Cell Mol Med.* 2007; 11:1272-1290.
- Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res.* 2007; 1145:227-238.
- Zammit PS, Carvajal JJ, Golding JP, Morgan JE, Summerbell D, Zolnerciks J, Partridge TA, Rigby PW, Beauchamp JR. Myf5 expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Dev Biol.* 2004 a; 273:454-465.
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 2004 b; 166:347-357.
- Zhang H, Zhang N, Li M, Feng H, Jin W, Zhao H, Chen X, Tian L. Therapeutic angiogenesis of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and peripheral blood MNCs: transplantation for ischemic hindlimb. *Ann Vasc Surg.* 2008; 22:238-247.
- Zhang J, Dhoot GK. Localized and limited changes in the expression of myosin heavy chains in injured skeletal muscle fibers being repaired. *Muscle Nerve.* 1998; 21:469-481.
- Zhang L, Shu XJ, Zhou HY, Liu W, Chen Y, Wang CL, Li Y, Chen QX, Liu LJ, Wang JZ. Protective Effect of Granulocyte Colony-stimulating Factor on Intracerebral Hemorrhage in Rat. *Neurochem Res.* 2009;
- Zhang Y, Shi S, Ciurli C, Poole AR. Animal models of ankylosing spondylitis. *Curr Rheumatol Rep.* 2002; 4:507-512.
- Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 2006; 13:1351-1359.

## 8 DANKSAGUNG

Es ist unbestritten, dass Naturwissenschaften evidenzbasiert strukturiert sind. Hierbei besitzen das "empirische Wissen" oder der "Glaube" eine untergeordnete Rolle gegenüber den "Beweisen" und der Statistik. Trotzdem sind der "Glaube" und die "Beweise" in der Forschung eng miteinander verbunden, da Naturwissenschaftler an etwas glauben müssen, um es später beweisen zu können. Letzten Endes haben vorliegende Dissertation Personen möglich gemacht, welche an eine Idee, die ich ihnen vorstellte, geglaubt haben. Diesen Leuten möchte ich von Herzen danken.

Mein Dank gilt insbesondere Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sowohl in der Entwicklung des Themas als auch in der Fertigstellung der Promotion. Weiterhin danke ich meinem Chef Herrn Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung des Projektes. Dank geht auch an FORUN (Forschungsförderungsprogramm der Universität Rostock) sowie an die Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock für die finanzielle Förderung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie. Insbesondere ein großes Dankeschön geht an Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, und Dr. rer.nat. Christian Eipel für die unkomplizierte Hilfe bei technischen und wissenschaftlichen Angelegenheiten. Ein großes Dankeschön an Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer für die verantwortungsvolle prä- und post-operative Betreuung sowie Pflege der Versuchstiere.

Weiterhin danke ich meinem Arbeitskollegen Dr. med. Robert Rotter für die schnelle und unkomplizierte Einarbeitung in das Tiermodell. Nicht zu unterschätzen ist seine wertvolle Hilfe in Wort und Tat sowie seine Bereitschaft mir wissenschaftlich jederzeit zur Seite zu stehen. Selbstverständlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Freunden Johannes Graff, Inken Schrodi und Dr. med. Heiko Sorg bedanken, für deren Vorschläge und für das anstrengende Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir immer finanziell und mental beigestanden hat und mir meine Ausbildung möglich gemacht hat.

*Σας ευχαριστώ - vielen Dank für alles!!!*

*Ioannis Stratos*

## 9 CURRICULUM VITAE

### Person

Name: Ioannis Stratos  
Geburtsdatum: 08.03.1982  
Geburtsort: Athen / Griechenland  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung

09/1987 bis 07/1989: 2. Grundschule (Kiato / Griechenland)  
09/1989 bis 07/1996: Private griechische Schule am H. Braun Weg (München /  
Deutschland)  
09/1996 bis 07/1998: 2. Lyzeum (Kiato / Griechenland)  
09/1998 bis 07/1999: 3. Lyzeum (Chalkida / Griechenland)

### Hochschulausbildung

09/1999 bis 02/2006: Medizinstudium an der Universität von Athen (Griechenland)

### Wissenschaftliche Tätigkeit

seit 04/2006: Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie der  
Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. B. Vollmar )  
11/2006 bis 04/2007: Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Experimentelle  
Chirurgie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
(Direktor: Prof. Dr. B. Vollmar )  
seit 05/2007 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall- und Wiederher-  
stellungschirurgie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
(Direktor: Prof. Dr. T. Mittlmeier )

### Preise

05/2008: B. Braun Award der European Society For Surgical Research.  
I. Stratos, J. Graff, R. Rotter, T. Mittlmeier, B. Vollmar.  
A rat muscle injury model of different severity to evaluate  
skeletal muscle regeneration capacity after open blunt crush  
trauma. (Warsaw, 21. - 24. Mai 2008)

## Publikationsverzeichnis

Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. J Appl Physiol. 2007; 103:1857-1863.

Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. J Orthop Res. 2008; 26:1618-1626.

Stratos I, Graff J, Rotter R, Mittlmeier T, Vollmar B. Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair. J Orthop Res. (submitted)

## **10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, 29.06.2009