

Institut für Experimentelle Chirurgie
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Evaluation der Wirkung von Erythropoetin auf die Regeneration der peripheren
Skelettmuskulatur**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von

Mariya Menshykova,
aus Rostock
Rostock, 2008

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger, Universität Rostock

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar,
Institut für Experimentelle Chirurgie Universität Rostock
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier,
Klinik und Poliklinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Universität
Rostock
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Klaus Schaser,
Unfall/Wiederherstellungschirurgie, Carité Berlin Campus Virchow-Klinikum

Tag der Einreichung: 24.07.2008

Tag der Verteidigung: 02.12.2009

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ABSTRACT	1
2 ZUSAMMENFASSUNG	2
3 EINLEITUNG	4
3.1 Skelettmuskeltrauma	4
3.1.1 Skelettmuskel: Anatomie und Funktion	4
3.1.2 Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens	6
3.1.3 Muskelregeneration	7
3.1.4 Therapie	8
3.2 EPO und EPOR	9
3.2.1 Strukturelle Eigenschaften und Biosynthese von EPO	9
3.2.2 Biologische Funktionen von EPO	10
3.2.3 EPOR	11
4 ZIEL DER STUDIE	13
5 MATERIALIEN UND METHODEN	14
5.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen	14
5.1.1 L8-Myoblasten: Kultivierungsbedingungen und Apoptoseinduktion	14
5.1.2 Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll	15
5.1.3 7AAD-Färbung und FACS-Analyse	15
5.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen	16
5.2.1 Versuchstiere	16
5.2.2 Narkose und chirurgische Präparation	17
5.2.3 Traumamodell	17

5.3 Untersuchungstechniken.....	18
5.3.1 Biomechanik	18
5.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	21
5.3.2.1 Makrohämodynamik	22
5.3.2.2 Mikrozirkulation.....	22
5.3.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte	23
5.3.2.2.2 NADH-Autofluoreszenz.....	23
5.3.2.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	24
5.3.2.2.4 Gefäßpermeabilität	25
5.3.2.2.5 Apoptose.....	25
5.3.3 Vollblutanalyse	26
5.3.4 Histomorphologie	26
5.3.4.1 TUNEL-Methode.....	26
5.3.4.2 Sirius-Red-Färbung	27
5.3.4.3 BrdU/Laminin-Doppelfärbung	28
5.3.4.4 "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung	28
5.3.5 Molekularbiologie: RT-PCR.....	29
5.4 Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll	30
5.5 Statistische Auswertung.....	32
6 ERGEBNISSE	33
6.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen: 7AAD-Färbung und FACS-Analyse.....	33
6.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen.....	34
6.2.1 Biomechanik	34
6.2.2 Fluoreszenzmikroskopie	36
6.2.2.1 Makrohämodynamik	36
6.2.2.2 Mikrozirkulation.....	36
6.2.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte	37
6.2.2.2.2 NADH-Autofluoreszenz.....	40
6.2.2.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	41
6.2.2.2.4 Gefäßpermeabilität/makromolekulare Leakage	43
6.2.2.2.5 Apoptose.....	45

6.3 Vollblutanalyse	47
6.4 Histomorphologie	48
6.4.1 Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen	48
6.4.1.1 TUNEL-Methode.....	48
6.4.1.2 "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung	49
6.4.2 Nachweis proliferationsaktiver Skelettmuskelzellen mittels BrdU/Laminin-Doppelfärbung	50
6.4.3 Nachweis intestitieller Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung	51
6.5 Molekularbiologischer Nachweis der EPOR-Genexpression mittels RT-PCR	52
7 DISKUSSION	55
7.1 Diskussion experimenteller Modelle.....	55
7.1.1 <i>In vitro</i> Modell der Apoptoseinduktion	55
7.1.2 <i>In vivo</i> Modell der Traumainduktion	56
7.2 Diskussion der Untersuchungstechniken	59
7.2.1 7AAD-Färbung und FACS-Analyse.....	59
7.2.2 Biomechanik	61
7.2.3 Fluoreszenzmikroskopie	63
7.2.4 Histomorphologie	65
7.2.4.1 Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen mittels TUNEL-Methode und "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung	65
7.2.4.2 Nachweis proliferationsaktiver Satelittenzellen mittels BrdU/Laminin-Doppelfärbung.....	66
7.2.4.3 Nachweis interstitieller Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung	67
7.2.5 Molekularbiologischer Nachweis der EPOR-Genexpression mittels RT-PCR	67
7.3 Diskussion der Ergebnisse.....	68
7.3.1 EPO: Zeitpunkt, Dosis und Applikation	68
7.3.2 Regeneration der Kontraktionskräfte des M. soleus	69
7.3.3 Mikrozirkulation im Skelettmuskel nach dem Trauma und EPO.....	70

7.3.4 Apoptose und Regeneration der Skelettmuskelzellen nach dem Trauma und EPO	72
7.4 Ausblick, Grenzen und Perspektiven.....	74
8 LITERATURVERZEICHNIS	78
9 LEBENSLAUF	93
10 DANKSAGUNG	94
THESEN ZUR DISSERTATION	VII
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	X

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A°	Angström, 10 ⁻¹⁰ m
Abb	Abbildung
Arg	Arginine
ATP	Adenosine Triphosphate
ADP	Adenosine Diphosphate
AMP	Adenosine Monophosphate
Bcl2	B-cell-lymphoma/leucemia 2
BrdU	5'-bromo-2'-deoxyuridine
°C	Degree Celsius
CO ₂	Carbon Dioxide
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dUTP	2-deoxyuridine 5-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Endothelial Growth Factor
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinreceptor
et al.	et alii
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FKD	Funktionelle Kapillardichte
g	Gram
GF	Gesichtsfeld
GM-CSF	Granulocyte Makrophage Colony Stimulating Factor
h	hour
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor-1α
HNF-4	Hepatocyte Nuclear Factor-4
HF	Herzfrequenz
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HKT	Hämatokrit
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukin

i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
IU	International Unit
Jak2	Janus-Kinase-2
KG	Körpergewicht
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
l	Liter
M	Musculus
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktiviert Protein Kinase
Min	Minute
m	Meter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MW	Molecular Weight
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Sodium Chloride
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NO	Nitric Oxide
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potential of Hydrogen
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
rhEPO	Recombinant Human Erythropoietin
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α

TUNEL	Transferase Mediated dUTP Biotin Nick End Labeling
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
u.a.	unter anderem
vs.	versus
W	Watt

1 ABSTRACT

Apart from its hematopoietic effect, erythropoietin (EPO) is known as pleiotropic cytokine with anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. Here, we evaluated for the first time the EPO-dependent regeneration capacity in an in vivo rat model of skeletal muscle trauma. A myoblast cell line was used to study the effect of EPO on serum deprivation-induced cell apoptosis in vitro. A crush injury was performed to the left soleus muscle in 80 rats treated with either EPO or saline. Muscle recovery was assessed by analysis of contraction capacities. Intravital microscopy, BrdU/laminin double immunohistochemistry and cleaved caspase-3 immunohistochemistry of muscle tissue on day 1, 7, 14 and 42 post-trauma served for assessment of local microcirculation, tissue integrity and cell proliferation. Serum deprivation-induced myoblast apoptosis of $23.9 \pm 1.5\%$ was reduced by EPO to $17.2 \pm 0.8\%$. Contraction force analysis in the EPO-treated animals revealed significantly improved muscle strength with 10-20% higher values of twitch and tetanic forces over the 42-day observation period. EPO-treated muscle tissue displayed improved functional capillary density as well as reduced leukocytic response and consecutively macromolecular leakage over day 14. Concomitantly, muscle histology showed significantly increased numbers of BrdU-positive satellite cells and interstitial cells as well as slightly lower counts of cleaved caspase-3 positive interstitial cells. EPO results in faster and better regeneration of skeletal muscle tissue after severe trauma and goes along with improved microcirculation. Thus, EPO, a compound established as clinically safe, may represent a promising therapeutic option to optimize the post-traumatic course of muscle tissue healing.

2 ZUSAMMENFASSUNG

EPO ist als ein Zytokin bekannt, das die Proliferation, Apoptose und Differenzierung erythroid determinierter Progenitorzellen steuert. Seine anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und pro-proliferativen Eigenschaften sind Gegenstand intensiver Forschung und konnten in zahlreichen non-hämatopoetischen Geweben demonstriert werden. Die hier vorliegende Studie untersuchte erstmalig in einem tierexperimentellen Ansatz *in vitro* und *in vivo* die pleiotropen Eigenschaften von EPO in der peripheren Skelettmuskulatur nach Trauma.

Zunächst wurde die anti-apoptotische Wirkung von EPO *in vitro* in einer L8-Myoblastenkultur unter Serumentzug mittels der 7AAD-Färbung und FACS-Analyse charakterisiert. Für die *in vivo* Experimente wurde der M. soleus des linken Hinterlaufs von insgesamt 80 Ratten einem offenen Kontusionstrauma mittels einer instrumentierten Klemme unterzogen. Die Tiere erhielten anschließend eine einmalige i. m. Applikation von EPO bzw. physiologischer Kochsalzlösung. Zur Beurteilung der Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur wurde die Analyse der kontraktiven Muskelkraft mittels biomechanischer Untersuchung vorgenommen. Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden gewebsschutzende Effekte von EPO auf die Mikrozirkulation der peripheren Skelettmuskulatur unter den Aspekten der Anti-Inflammation und Anti-Apoptose charakterisiert. Immunhistochemische (BrdU/Laminin-Doppelfärbung, "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung), histochemische (TUNEL-Methode, Sirius-Red-Färbung) und molekularbiologische (RT-PCR) Untersuchungen dienten der Verifizierung der *in vivo* gewonnenen Daten.

EPO reduzierte die durch Serumentzug induzierte Apoptoserate der L8-Myoblasten von $23,9 \pm 1,5\%$ auf $17,2 \pm 0,8\%$. Die biomechanische Untersuchung der mit EPO behandelten Tiere zeigte einen signifikanten Anstieg der Muskelkraft um 10-20% bei Einzel- und Tetanuskontraktion während der Beobachtungszeit von 42 Tagen. Am Tag 14 nach dem Trauma war im Skelettmuskelgewebe der mit EPO behandelten Tiere eine signifikante Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion, der makromolekularen Leakage sowie der Apoptoserate und ein signifikanter Anstieg der funktionellen Kapillardichte zu beobachten. Immunhistochemische BrdU/Laminin-Doppelfärbungen demonstrierten einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate von Satellitenzellen unter dem Einfluss von EPO. TUNEL-Methode, "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung und Sirius-Red-Färbung zeigten eine Reduktion

der Apoptose sowie der Fibrose im Skelettmuskel nach EPO-Behandlung. Der molekularbiologische Nachweis der transienten EPOR-Genexpression am Tag 1 und 7 nach Trauma unterstreicht eindrucksvoll die entscheidende Bedeutung der Hypoxie bedingten Hochregulation dieser Rezeptorsysteme im Regenerationsprozeß des peripheren Skelettmuskels.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit erstmalig der gewebsschutzende Effekt einer einmaligen i.m. EPO-Applikation im Sinne von Anti-Entzündung, Anti-Apoptose, Förderung der Proliferation und funktionellen Regeneration im kontusierten Skelettmuskelgewebe nachgewiesen werden konnte. Die Anwendung von EPO, eines gut erprobten und klinisch als sicher eingestuften Medikaments, könnte damit in der Therapie traumatischer Muskelschäden eine vielversprechende Zukunft besitzen.

3 EINLEITUNG

3.1 Skelettmuskeltrauma

Die traumatisch bedingten Schäden der Skelettmuskulatur gehören zu den am weitesten verbreiteten Verletzungen im Sport- und Freizeitbereich. Diese Verletzungen betreffen am häufigsten die untere Extremität und sind durch eine langsame Heilung mit Ausbildung von Narbengewebe gekennzeichnet [Garrett et al., 1984; Best und Hunter, 2000; Beiner und Jokl, 2001].

Das Ausmaß und die jeweilige Schwere der Weichteilschädigung besitzen eine zentrale Bedeutung für das Verletzungsmanagement. Gerade die Prognose komplexer offener Verletzungen wird maßgeblich durch die Schädigung der peripheren Skelettmuskulatur bestimmt. Die Versorgung des Skelettmuskeltraumas ist ein wichtiger Gegenstand der Orthopädie, Unfall-, Allgemein- und plastischen Chirurgie [Beiner und Jokl, 2001; Warren et al., 2002; Yan et al., 2003; Zammit et al., 2004].

Skelettmuskelverletzungen sind oft von Komplikationen begleitet [Bleakley et al., 2004]. Eine Therapieoptimierung in der Versorgung der traumatischen Muskelverletzungen und ihrer Folgezustände besitzen eine hohe Relevanz nicht nur für die Lebensqualität und Lebenserwartung des einzelnen Patienten, sondern auch für volkswirtschaftliche Aspekte [Beiner und Jokl, 2001].

3.1.1 Skelettmuskel: Anatomie und Funktion

Skelettmuskeln machen mit 40% des gesamten Körpergewichtes den größten Gewebeanteil am menschlichen Körper aus [Garrett, 1984]. Stark vereinfacht lassen sich im Muskel zwei Hauptstrukturkomponenten unterscheiden: die Myofibrillen und das Bindegewebe [Tidball und Daniel, 1986]. Die Myofibrillen mit den sie versorgenden Nerven erfüllen kontraktile Aufgaben. Die nervale Stimulierung kann so variieren, dass ein Einzelimpuls, eine Impulsserie konstanter Frequenz oder Impulse in anderen Modalitäten erzeugt werden.

Bekommt ein Skelettmuskel einen einzigen elektrischen Impuls in ausreichender Intensität, so kontrahiert er schnell und relaxiert sofort darauf. Diese Muskelantwort bezeichnet man als Einzelzuckung („single twitch“). Wird der Muskel durch mehrere nacheinander folgende Impulse steigender Frequenz stimuliert, so wird die Erholungszeit zwischen den Einzelzuckungen immer kürzer und die entwickelte Muskel-

kraft größer. Diese Muskelreaktion nennt man inkompletter Tetanus („incomplete tetanus“). Schließlich kommt es zum kompletten Tetanus, wenn die Frequenz der elektrischen Stimuli einen bestimmten Grenzwert („fusion frequency“) überschritten hat. Dabei ist keine sichtbare Relaxation zwischen den Einzelkontraktionen zu registrieren und die Muskelkraft hat ihre maximale Amplitude erreicht [Garrett, 1984].

Das Bindegewebe, bestehend aus den Bindegewebszellen (Fibroblasten und Fibrozyten) und der extrazellulären Matrix, bildet mit seinen drei Blättern (Endomysium, Perimysium und Epimysium) ein Gerüst, welches die einzelnen Muskelzellen zu einer Einheit zusammenschließt und Blutgefäße und Nerven zu den Muskelstrukturen führt [Tidball und Daniel, 1986; Garrett, 1984; Tidball, 1991; Takala und Virtanen, 2000] (Abbildung 1).

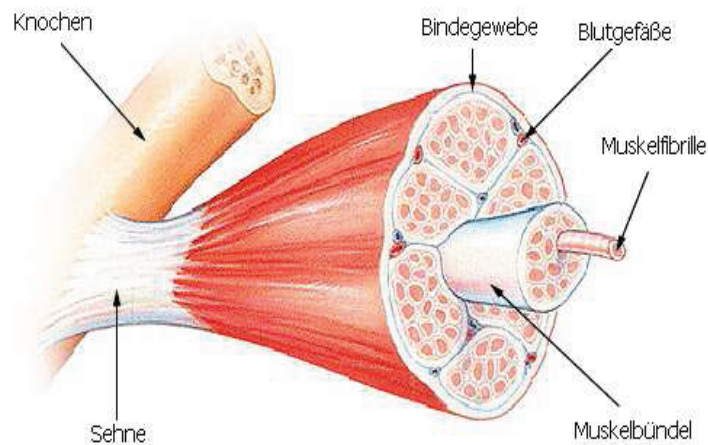


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt schematisch die Muskelstruktur mit drei Bindegewebsblättern, welche die einzelnen Myofibrillen zu einer Einheit zusammenschließen sowie Blutgefäße und Nerven zu den Muskelstrukturen führen. Quelle: Tidball und Daniel, 1986.

Die Myofibrille, der Grundbaustein des Skelettmuskels, stellt ein Synzidium dar, welches durch Fusion vieler Myoblasten entstanden ist. Die Myoblasten verschmelzen zu langen, zylinderförmigen Formationen, deren Zellkerne ihre zentrale Position aufgeben und sich in der Peripherie unter dem Sarkolemma anordnen. Das Sarkolemma, die Zellmembran, umhüllt jede einzelne Myofibrille. Die einkernigen Zellen, die zwischen der Basalmembran und dem Sarkolemma liegen, werden Satellitenzellen genannt. Satellitenzellen haben eine Schlüsselrolle in der Muskelregeneration [Hurme und Kalimo, 1992; Rantanen et al., 1995].

3.1.2 Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens

Der Ausgangspunkt der Pathogenese des traumatischen Muskelschadens ist eine Störung der Gewebsintegrität aufgrund verminderter Blutversorgung [Beiner und Jokl, 2001; Beiner und Jokl, 2002]. Ischämie führt zur Verschlechterung rheologischer Eigenschaften des Blutes und Dysregulation zellulärer und molekularer Mechanismen [Crisco et al., 1994; Corr et al., 2003].

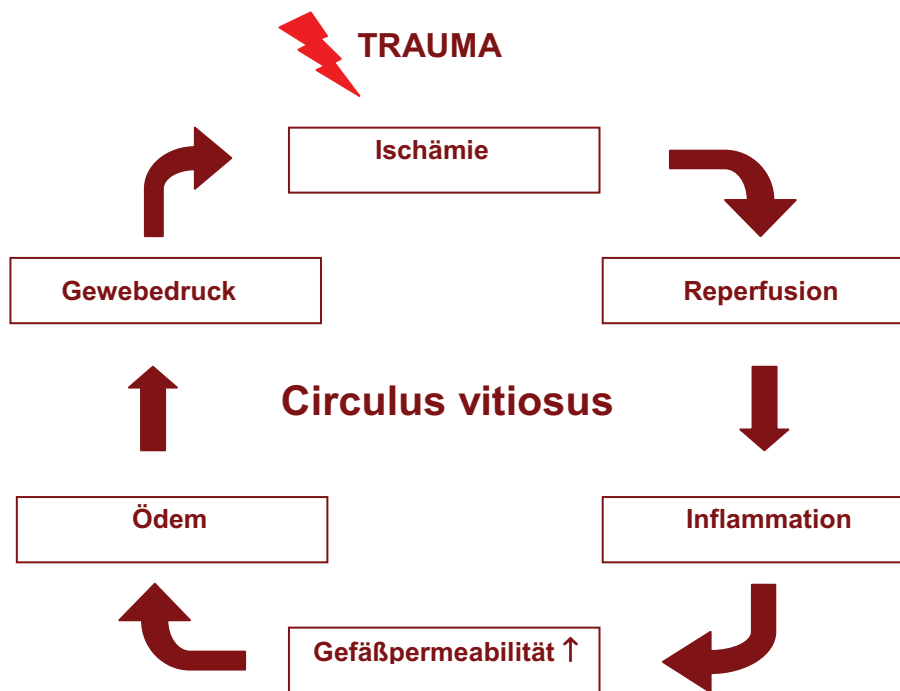


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens.

Infolge der Ischämie kommt zur Störung der Ionenverteilung. Die Aktivität der Na/K-ATPase nimmt ab und es kommt zum konsekutiven ATP-Konzentrationsabfall mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [Kam, 2001; Brickson et al., 2003]. Die Folgen des zellulären Stoffwechselzusammenbruchs sind endotheliale Permeabilitätsstörung, Inflammation und Mikrozirkulationsstörungen [Brickson et al., 2001; Adanali et al., 2002; Brickson et al., 2003]. Lokale Schwellung und die Ausbildung eines Hämatoms erscheinen kurz nach dem traumatischen Ereignis und unterhalten weiterhin die Gewebsdegeneration durch Verlängerung der Ischämie und Störung des Gewebstoffwechsels [Kharbanda et al., 2001; Dickson et al., 2002].

Typische Zeichen der Schädigung des Muskelgewebes sind Muskelzellapoptose und leukozytäre Gewebsinfiltration [Robertson et al., 1993; Pierre und Tidball, 1994; Lille et al., 2001; Toumi und Best, 2003; Norman et al., 2005]. Leukozyten produzieren eine Reihe inflammatorischer Mediatoren (PAF, TNF- α , IL 1,

6, 8, 10), welche im geschädigten Areal die Entzündungsreaktion mit der Erhöhung der Gefäßpermeabilität verstärken und den Blutfluss reduzieren [Klar und Werner, 2000; Mackay et al., 1993]. Nach der mikrovaskulären Akkumulation und Adhärenz am mikrovaskulären Endothel wandern die Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe ein. Ihre zytotoxischen Degranulationsprodukte beeinträchtigen zusätzlich die endotheliale Barrierefunktion. Die Flüssigkeit und Makromoleküle gelangen ins Interstitium mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Der Druckanstieg im Gewebe verschlechtert weiterhin den Stoffwechsel der Zellen mit der konsekutiven Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte [Brickson et al., 2003]. Damit schließt sich der Circulus vitiosus (Abbildung 2) der Pathogenese des traumatischen Muskelschadens.

3.1.3 Muskelregeneration

Auf der Oberfläche von Muskelfasern direkt unter der Basalmembran sind Satellitenzellen zu finden. Diese einkernigen Myoblasten werden bei Regenerationsprozessen aktiviert. Sie proliferieren und verschmelzen mit anderen Satellitenzellen und vorhandenen Muskelfasern. Es entsteht neues Muskelgewebe.

Satellitenzellen sind irreversibel spezifizierte, aber noch nicht differenzierte, proliferierende Myoblasten [Mansouri et al., 1999]. An der Myogenese sind mehrere myogene Regulationsfaktoren beteiligt. Die paired box-Transkriptionsfaktoren PAX3 und PAX7 sind durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD ursächlich an der Entwicklung der Satellitenzellen zu Myozyten beteiligt [Mansouri et al., 1999; Le Grand und Rudnicki, 2007].

Neben den erwähnten Transkriptionsfaktoren ist eine Vielzahl weiterer Faktoren an der Regulation der Myogenese beteiligt: Unter dem Einfluss von Myogenin, einem myogenen Regulationsfaktor, wird mit dem Austritt aus dem Zellzyklus und der Expression muskelspezifischer Gene die Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten vorangetrieben, die schließlich miteinander zu großen Synzytien fusionieren. An der Fusion der entstandenen Myotuben zu großen Muskelfasern ist der myogene Regulationsfaktor MRF4 beteiligt [Mansouri et al., 1999; Le Grand und Rudnicki, 2007].

Es ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren der Muscle-Enhancer-Factor-2-Familie (MEF2) und die oben erwähnten MRFs sich gegenseitig in ihrer Genexpression regulieren und als Komplex die Expression von weiteren Genen kontrollieren, die Einfluss auf die Myogenese haben [Le Grand und Rudnicki, 2007;

Holterman et al., 2007]. Zahlreiche Studien demonstrieren regulatorische Aufgaben verschiedener Wachstumsfaktoren bei der Skelettmuskelregeneration: Die Wachstumsfaktoren fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β) und tumor necrosis factor- α (TNF- α) fördern die Proliferation und hemmen die Differenzierung der Satelittenzellen [Le Grand und Rudnicki, 2007]. Im Gegensatz dazu fördert insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ebenso wie Insulin die Skelettmuskeldifferenzierung [Le Grand und Rudnicki, 2007; Holterman et al., 2007].

Die Wachstumsfaktoren aktivieren die Proliferation von Fibroblasten, welche an der Organisation des Hämatoms zum Granulationsgewebe und später zum Bindegewebe beteiligt sind [Chiquet, 2003; Chargé und Rudnicki, 2004]. Die Vermehrung von Fibroblasten und die Produktion der extrazellulären Matrix sind für die Stabilisierung der betroffenen Extremität entscheidend [Cantini und Carraro, 1995; Chazaud et al., 2003; Grounds et al., 2002; LaBarge und Blau, 2002; Chargé und Rudnicki, 2004].

Bei einer übermäßigen Fibrosierung kann es jedoch zu Muskelverkürzungen und Funktionseinbußen der betroffenen Extremität kommen [Linkhart et al., 1981; Grounds, 1991; Grounds et al., 2002; LaBarge und Blau, 2002; Chargé und Rudnicki, 2004]. Eine ausgewogene Balance zwischen Muskelregeneration und Fibrosierung ist daher eine entscheidende Voraussetzung für eine optimale Muskelheilung [Jarvinen und Sorvari, 1975; Hurme und Kalimo, 1992; Rantanen et al., 1995; Johnson und Allen, 1995; Chan et al., 2003].

3.1.4 Therapie

Das moderne Versorgungsmanagement komplexer Extremitätenverletzungen basiert auf den pathophysiologischen Erkenntnissen von Tscherne und Oestern [Tscherne und Oestern, 1982] und verfolgt das Ziel, die Regeneration des Muskelgewebes zu fördern und die Fibrosierung zu reduzieren [Lefaucheur und Sebille, 1995; McFarland et al., 1993; Gal-Levi et al., 1998; Fukushima et al., 2001; Chan et al., 2003; Sato et al., 2003].

Die Ruhigstellung, Kryotherapie, Kompression und Hochlagerung stellen die vier Säulen der konservativen Therapie von Extremitätenverletzungen dar [Garrett et al., 1984; Garrett, 1990; Hughes et al., 1995; Beiner und Jokl, 2002]. Alle vier Therapieoptionen verfolgen das Ziel, die Anschwellung und die Einblutung im geschädigten Gewebe zu reduzieren und somit den weiteren Schäden durch Ischämie und

Reperfusion vorzubeugen [Buckwalter, 1995; Deal et al., 2002; Bleakley et al., 2004]. Durch die Reduktion des Hämatoms wird eine Abnahme der Bindegewebsformation erreicht. Eine Kombination aus einer frühen Kryotherapie und Kompression reduziert den Blutfluss im Skelettmuskel, wodurch die Ausbildung eines Hämatoms vermindert wird [Buckwalter, 1995; Deal et al., 2002; Bleakley et al., 2004]. Eine temporäre Ruhigstellung der Extremität beugt erfolgreich Retraktion und Rerupturen vor [Järvinen et al., 2002; Józsa et al., 1990; Buckwalter, 1995]. Das Hochlagern bewirkt eine Abnahme des hydrostatischen Druckes mit der Reduktion des interstitiellen Ödems im geschädigten Gewebe [Järvinen und Lehto, 1993; Järvinen et al., 2002; Järvinen et al., 2005].

Die meisten traumatischen Skelettmuskelschäden werden konservativ behandelt [Rantanen et al., 1999; Wilkin et al., 2004]. Manchmal ist jedoch der Einsatz operativer Techniken notwendig [Fukushima et al., 2001; Beiner und Jokl, 2001]. Neben den klassischen vier Therapiesäulen gewinnen innovative Therapiekonzepte wie die Anwendung pleiotroper Substanzen beispielsweise von EPO immer mehr an Bedeutung in der Behandlung peripherer Skelettmuskelverletzungen [Ku et al., 1996; Kuter und Begley, 2002; Wlodawer et al., 1993].

3.2 EPO und EPOR

3.2.1 Strukturelle Eigenschaften und Biosynthese von EPO

EPO ist ein Vertreter der Klasse-1-Zytokin-Familie [Jelkmann und Wagner, 2004]. Der Hauptanteil des im Blut zirkulierenden EPO kommt aus den Nieren, der kleinere Anteil wird von Leber, Uterus, peripheren Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Blutgefäße, Plazenta, Insulin produzierenden Zellen, Testis, Hippocampus, Capsula interna, Mittelhirn, zerebralem Endothel und Astrozyten produziert [Maiese et al., 2005, Moritz et al., 1997]. Das humane EPO-Gen befindet sich auf dem Chromosom 7q11-22 und enthält fünf Exone und vier Introne. Seine Transkription ist fein reguliert und unterliegt äußeren und inneren Einflüssen [Bunn et al., 1998].

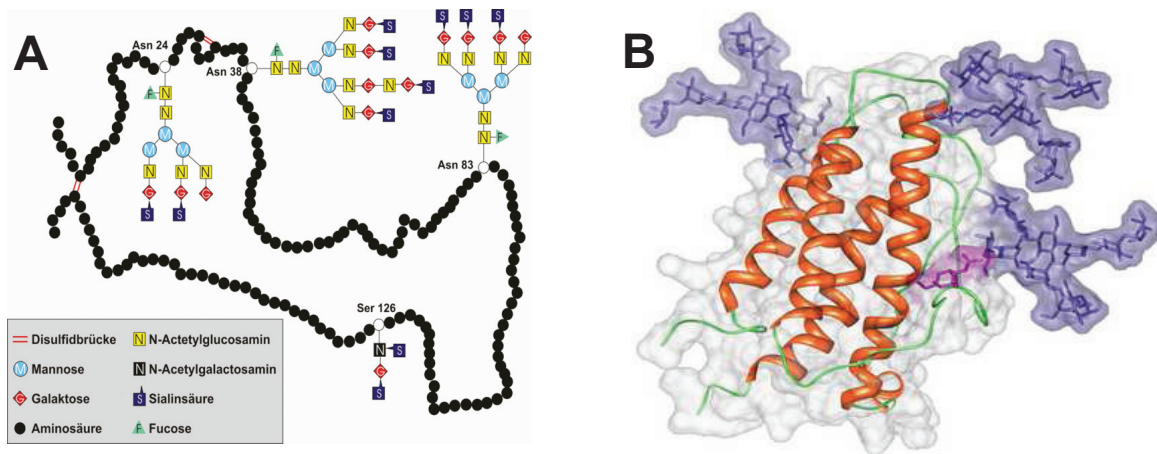


Abbildung 3: EPO ist ein Glykoprotein, dessen primäre Struktur durch die Reihenfolge von 165 Aminosäuren bestimmt wird (A). Seine tertiäre Struktur bildet eine Globusformation aus vier Helices (B). Quelle: Lappin, 2003.

Nach der Transkription besteht das Genprodukt, die Polypeptidkette, aus 193 Aminosäuren (Abbildung 3). Nach weiteren Veränderungen und Modifizierungen bilden 165 Aminosäuren die endgültige EPO-Struktur, wobei die Arg-166 unmittelbar vor dem Eintritt des EPO in die Blutbahn abgespalten wird [Nig et al., 2003]. EPO ist ein Glykoprotein, dessen tertiäre Struktur durch vier α -Helices A, B, C und D, die sich zu einer Globusformation vereinigen, bestimmt wird [Wen et al., 1994] (Abbildung 3). Sein Molekulargewicht beträgt 30,4 kDa, wobei es zu 39% aus Kohlenhydraten besteht [Lappin et al., 2002]. Die Zuckerseitenketten beeinflussen die Stabilität des EPO-Moleküls und üben dabei eine Schutzfunktion aus. Deglycosyliertes EPO ist deutlich empfindlicher gegenüber pH- und temperaturinduzierten Denaturierungen als natürliches, glycosyliertes EPO [Lappin et al., 2002]. Die biologische Aktivität von EPO wird durch die Abspaltung der Sialinsäure beendet. Das EPO wird in der Leber an den Galaktoserezeptor gebunden und dann renal ausgeschieden [Sasaki et al., 2000].

3.2.2 Biologische Funktionen von EPO

Die klassische EPO-Therapie unterstützt die Bildung roter Blutkörperchen bei Patienten mit renaler Anämie, Tumoranämie und Anämien als Folge von Chemotherapien [Eckardt, 2001; Dunst, 2004]. Neben der gut untersuchten physiologischen Rolle von EPO in der Erythropoese sind seine anti-apoptotischen und zellprotektiven Wirkungen von großem Interesse. Pleiotrope Eigenschaften von EPO konnten bei verschiedenen Gewebsschädigungen beobachtet werden. Das Ausmaß der

Apoptose wurde durch EPO in verschiedenen Gewebearten bei der hypoxischen Schädigung [Chong et al., 2002; Marti, 2004], toxischen Schädigung [Kawakami et al., 2001], bei der Exposition mit freien Radikalen [Chong et al., 2003] und bei Inflammation [Yatsiv et al., 2005; Erbayraktar et al., 2006] reduziert.

Besonders intensiv beschäftigen sich die neurologischen und kardiovaskulären Bereiche der wissenschaftlichen Forschung mit den protektiven Eigenschaften von EPO [Maiese et al., 2005]. Es konnte eine Reduktion der Apoptoserate in den Endothelzellen [Carlini et al., 1999], im postischämischen Hirn [Marti, 2004; Brines und Cerami, 2005] und Rückenmark [Celik et al., 2002; Gorio et al., 2002], Retina [Junk et al., 2002], Herzen [Rafiee et al., 2005; Minamino und Kitakaze, 2006], Niere [Yang et al., 2003; Sharples et al., 2004] und Leber [Sepodes et al., 2006] gezeigt werden. Nach Aussagen von Sterin-Borda und Mitarbeitern beeinflusst EPO positiv die Kontraktilität der Kardiomyozyten [Sterin-Borda et al., 2003]. Daher scheint EPO ein zytoprotektives Medikament mit großen Zukunftsperspektiven zu sein [Coleman und Brines, 2004].

Mit Ausnahme einer Untersuchung, welche die Effekte von EPO auf die Differenzierung der Myoblastenzelllinie C2C12 analysierte [Ogilvie et al., 2000], liegen keine Studien zum Einfluss von EPO auf die periphere Skelettmuskulatur vor. Ausgehend von der Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens und Bezug nehmend auf die anti-apoptotischen, mitogenen und kontraktionssteigernden Eigenschaften von EPO ist es daher von hoher klinischer Relevanz, die Einsatzmöglichkeiten von EPO nach Weichteiltrauma zur Verbesserung der Skelettmuskelregeneration zu untersuchen.

3.2.3 EPOR

EPOR ist ein nachfolgendes Glykoprotein aus 484 Aminosäuren, der zu Transmembranrezeptoren der Klasse-1-Zytokinrezeptoren gehört [Youssofian et al., 1993]. Der EPOR setzt sich aus drei Peptidketten zusammen und besteht aus den extrazellulären, transzellulären und intrazellulären Domänen (Abbildung 4).

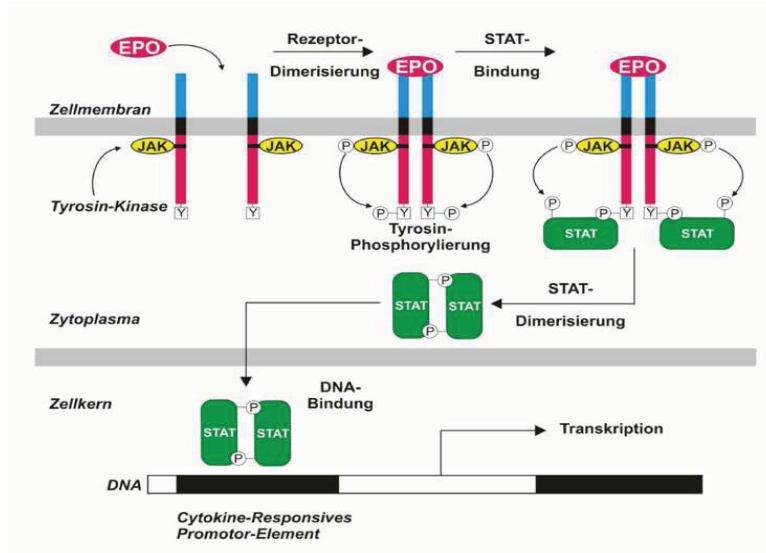


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Signalwegs vom aktivierten EPOR. Quelle: Lappin, 2003.

Die extrazelluläre Domäne hat eine ligandenbindende Funktion [Bazan, 1990]. Eine kurze Transmembrandomäne aus weitgehend hydrophoben Aminosäuren dient der Verankerung in der Membran. Die zytoplasmische Domäne des EPOR besitzt keine Kinase-Aktivität [Barber und D'Andrea, 1994]. Die fehlende katalytische Aktivität wird durch assoziierte Kinasen substituiert [Murakami et al., 1991].

Im Ruhezustand besitzen die Transmembrandomänen einen Abstand von 73 Å. Die Bindung von EPO führt zu einer Umordnung der Tertiärstruktur in der extrazellulären Domäne. Die Folge ist eine Verringerung des Abstandes der Transmembrandomänen auf 39 Å [Livnah et al., 1999; Yoshimura et al., 1990; Yoshimura und Lodish, 1992]]. Die Jak2 ist mit der zytoplasmatischen Domäne des EPOR in An- und Abwesenheit von EPO assoziiert [Witthuhn et al., 1993]. Die Bindung von EPO bringt durch die beschriebene Konformationsänderung jeweils zwei Jak2-Moleküle in enge räumliche Nähe [Watowich, 1992; Watowich, 1994]. Dadurch werden Transphosphorylierung und Aktivierung der Jak2-Moleküle ermöglicht [Ihle, 1995; Zhuang et al., 1994].

Die Signalwege vom aktivierten EPOR führen über mehrere Kaskaden mit PI3-K, STAT3 und MAPK zum Zellkern, wo die Expression der Gene beeinflusst wird, die für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle entscheidend sind [Youssofian et al., 1993; Sasaki et al., 2000; Lappin, 2003]. Am Ende nimmt die Produktion pro-apoptotischer Proteine ab, dagegen steigt die Synthese anti-apoptotischer Proteine (Bcl-2).

4 ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, *in vitro* und *in vivo* die Wirkung und Effektivität von EPO auf die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur nach einem offenen Trauma zu analysieren. Dabei wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

1. Wie beeinflusst eine einmalige i.m. EPO-Applikation die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur nach einem offenen Kontusionstrauma?
2. Wie beeinflusst eine einmalige i.m. EPO-Applikation die Rehabilitation kontraktile Funktionen des traumatisch geschädigten Skelettmuskels?
3. Welchen Einfluss hat EPO auf den apoptotischen Zelltod der Skelettmuskelzellen?
4. Welchen Einfluss hat EPO auf die inflammatorischen Prozesse im Skelettmuskel nach Trauma?
5. Welchen Einfluss hat EPO auf die Proliferation der Satellitenzellen?

5 MATERIALIEN UND METHODEN

5.1 *In vitro* Untersuchungen

5.1.1 L8-Myoblasten: Kultivierungsbedingungen und Apoptoseinduktion

Für die *in vitro* Untersuchungen wurde die adhärent wachsende L8-Myoblastenzelllinie (Zelllinie L8, Rattus norvegicus, ATCC, CRL-1769) verwendet. Kultiviert wurden die Zellen im DMEM-Medium F12 (Dulbecco`s Modifikation von Eagle`s Minimum Essential Medium F12), versetzt mit 199-EARLE-Medium in einem Verhältnis von 4:1, 10% Pferdeserum, 1% Hühnerserum, 100 IU/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C in einer wasergesättigten Atmosphäre, angereichert mit 10% CO₂, kultiviert.

Die Zellen wurden mittels der Trypsinierung vom Boden entnommen und dreimal mit 37°C warmem, serumfreiem DMEM-199-EARLE-Medium gewaschen. Nach Dekantieren der dritten Waschlösung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 10⁵ Zellen/ml eingestellt und in 10⁵ ml-Ansätzen in ein Eppendorfgefäß (Durchmesser 30 mm) ausgesät. Anschließend wurden sie unter Kulturbedingungen 6 Stunden inkubiert. Nach 6 Stunden Inkubation erfolgte die randomisierte Zuordnung der Zellen der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Apoptose wurde bei der verwendeten Zelllinie durch Serumentzug ausgelöst.

5.1.2 Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll

Insgesamt wurden 12 Ansätze von L8-Myoblasten untersucht. Nach Randomisierung und Zuordnung der Zellansätze zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte die Apoptoseinduktion im "Zellkultur ohne Serum"-Studienarm (n=6) mittels Serumentzug. Der "Zellkultur mit Serum"-Studienarm (n=6) diente als Kontrolle. In beiden Studienarmen wurden entweder EPO (50 IU/ml) oder eine Trägerlösung (äquivalente Volumina von 12,5 µl NaCl) zu den jeweils drei Ansätzen gegeben. Die erste Gabe von EPO- bzw. Trägerlösung fand unmittelbar nach der Randomisierung statt. Anschließend wurden die Ansätze nach 24, 48 und 72 Stunden mit EPO bzw. Trägerlösung behandelt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen nach der 7AAD-Methode gefärbt und mittels FACS-Analyse quantifiziert (Abbildung 5).

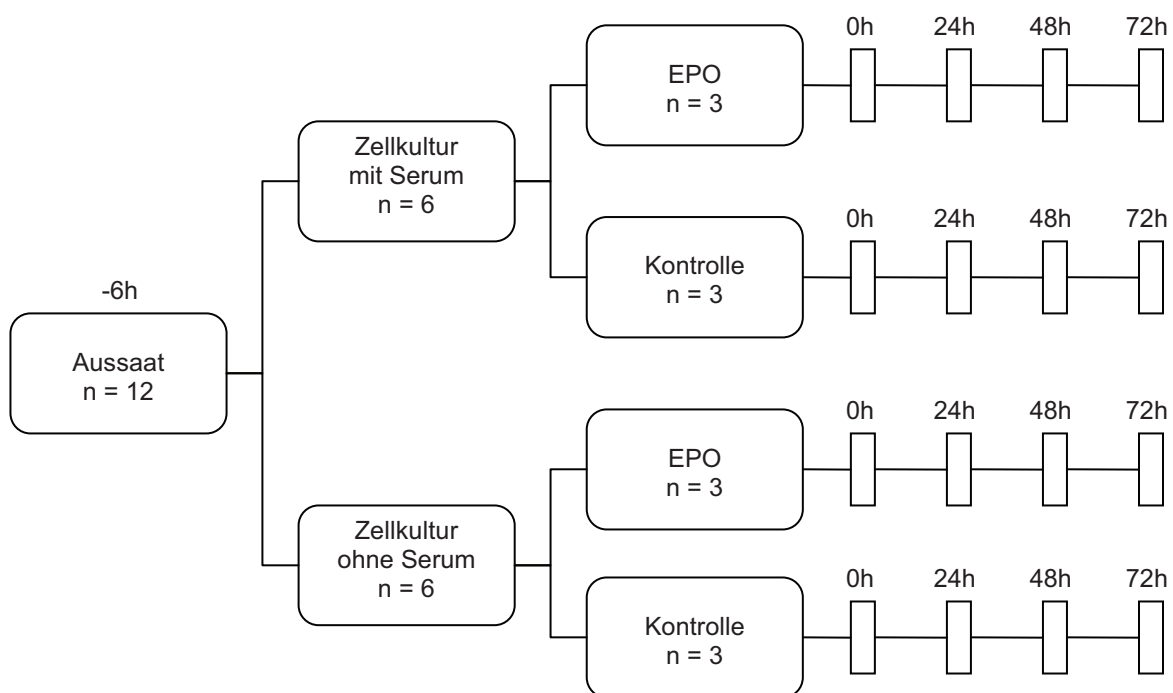


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der *in vitro* Untersuchungen.

5.1.3 7AAD-Färbung und FACS-Analyse

Mittels der FACS-Analyse lässt sich der DNA-Gehalt der Zellen nach der 7AAD-Färbung bestimmen, dadurch werden die Zellen einer bestimmten Phase im Zyklusverlauf zugeordnet. 7AAD ist ein fluoreszierender Farbstoff, der selektiv an die

Guanin- und Cytidin-reichen DNA-Regionen der Zellen bindet. Der Gehalt des fluoreszierenden 7AAD-Farbstoffs ist proportional zum DNA-Gehalt der Zellen.

Die Zellzyklusstadien sind durch ihren unterschiedlichen DNA-Gehalt gekennzeichnet. Im Histogramm werden Zellpopulationen entsprechend ihrem DNA-Gehalt typischerweise mit drei Peaks dargestellt. Nach der mitotischen Zellteilung, treten die Zellen in die G_0 - oder G_1 -Phase ein. Sowohl in der G_1 -Phase, die der Wachstumsphase entspricht, als auch in der G_0 -Phase, der Ruhephase, weisen eukaryote Zellen einen diploiden Chromosomensatz ($2n$) auf. In der darauf folgenden S-Phase, der Synthesephase, variiert der DNA-Gehalt zwischen $2n$ und $4n$, bis in der G_2 -Phase ein doppelter diploider Chromosomensatz ($4n$) vorliegt. Im Gegensatz dazu verfügen apoptotische Zellen infolge der DNA-Fragmentierung über den hypodiploiden Chromosomensatz ($<2n$) und bilden die Sub- G_0 -Population (Sub- G_0 -Peak).

Durch Anregung des an DNA gebundenen 7AAD mit einem Laser wird der DNA-Gehalt über das emittierte Fluoreszenzlicht (Anregung 546 nm, Emission 647 nm, 7AAD-DNA-Komplexe Emission 610 nm) bestimmt und die Sub- G_0 -Population mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Die 7AAD-Färbung von L8-Myoblasten erfolgte entsprechend der von Philpott beschriebenen Technik [Philpott et al., 1996]. Nach der schonenden Behandlung mit Trypsin wurde die Adhäsion der Zellen aufgehoben und die Zellen wurden in 70% Methanol für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Ansätze mit jeweils 10 μ l 7AAD (200 μ l/ml; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) versetzt.

Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln fand die Analyse der Zellen auf dem FACS-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) im dunkelroten Spektrum eines 650 nm Filters statt. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software LYSYSTM (Becton DickinsonTM).

5.2 *In vivo* Untersuchungen

5.2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River; Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 275-325 g durchgeführt. Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen wurden die Tiere für mindestens eine Woche in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Institutes für Experimentelle

Chirurgie, Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar; Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Einzellaborkäfigen bei 12-stündigem Tag/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter ad libitum gehalten. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz genehmigt (LVL-MV/TSD/7221.3-1.1-049/04).

5.2.2 Narkose und chirurgische Präparation

Die Anästhesie der Tiere wurde mit Pentobarbital (55 mg/kg KG; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos) intraperitoneal eingeleitet. Anschließend wurden die Tiere an Hals, Abdomen, Rücken und den Hinterläufen rasiert, desinfiziert und in Rückenlage positioniert. Die Körperkerntemperatur wurde mittels Heizplatte und rückgekoppelter rektaler Sonde konstant bei 36-37°C gehalten.

Der chirurgische Eingriff am Hals erfolgte mit einem horizontalen Hautschnitt. Nach stumpfer Dissektion des Unterhautfettgewebes wurde die Trachea freigelegt und zur nachfolgenden Beatmung (Tidalvolumen 1 ml/100g KG, Frequenz: 50/min) tracheotomiert. Es schloss sich die Darstellung der Arteria carotis communis dextra an. Nach Anschlingen des Gefäßes wurde das Lumen durch eine quere Inzision eröffnet und kanüliert. Über den eingeführten Katheter (PE-50; Portex, Hythe, Kent, Großbritannien) erfolgte die Applikation des Anästhetikums Pentobarbital zur Aufrechterhaltung der Narkose sowie die Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Alle Eingriffe wurden mit mikrochirurgischen Instrumenten unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

5.2.3 Traumamodell

Nach der Freilegung des M. soleus erfolgte mittels einer instrumentierten Klemme eine standardisierte Kontusion des Muskels mit einer konstanten Kraft von 25 N und einer Dauer von jeweils 10 s (DMC PLUS, HBM Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Deutschland) (Abbildung 6). Der Muskel wurde manuell 7 mal im gesamten Verlauf geklemmt, wobei der Eintrittspunkt neurovaskulärer Strukturen im mittleren Bereich medial des M. gastrocnemius ausgenommen wurde. Zur Vermei-

dung der Verletzung der Muskelfaszie ist die Klemme leicht gebogen und die Branchen sind mit Polyethylenschläuchen überzogen (Abbildung 6).

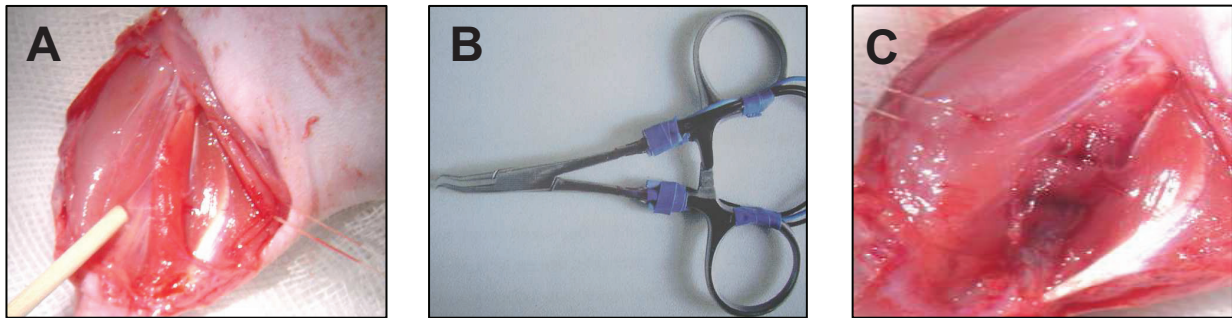


Abbildung 6: In der Abbildung (A) ist der frei präparierte M. soleus dargestellt. Nach der Freilegung des M. soleus erfolgte eine standardisierte Kontusion des Muskels mittels einer instrumentierten Klemme(B). Der M. soleus wurde manuell 7 mal im gesamten Verlauf unter Aussparung des Eintrittspunktes neurovaskulärer Strukturen geklemmt (C).

5.3 Untersuchungstechniken

5.3.1 Biomechanik

Das Experimentaria-Messsystem erlaubt eine *in vivo* Charakterisierung der Kontraktionskräfte peripherer Skelettmuskulatur [Matziolis et al., 2005]. Das System besteht aus dem Drei-Panel-Manipulator zu Veränderung der Position des FSG-01 Krafttransduktors, des AM-04-Manipulators, der Stimulierungselektrode, der Verbindung zum Kraftumwandler und dem Halterungs- und Fixierungsapparats. Der Kraftumwandler empfängt ein mechanisches Signal vom Transduktor und wandelt es in einen elektrischen Impuls um, welcher mit der speziell dafür entwickelten Software ausgewertet wird.

Die anästhesierten Tiere wurden in Bauchlage und der rechte Oberschenkel jeweils in eine erhöhte Lage gebracht. Die Orientierungspunkte Femurkopf und Kniegelenk wurden ertastet und mit einem Skalpell ein ca. 3 cm langer Hautschnitt unterhalb des Femurkopfes parallel zum Oberschenkelknochen gesetzt. Danach wurde die Haut stumpf vom Bindegewebe sowie der Muskelfaszie befreit. Die Lücke zwischen M. biceps femoris, M. gluteus maximus und M. tensor fasciae latae wurde aufgesucht, die Muskulatur stumpf auseinander gedrängt und der N. ischiadicus in der Tiefe dargestellt (Abbildung 7). Nach der anschließenden kontralateralen Präparation des N. ischiadicus und des M. soleus wurde die Achillessehne durchtrennt und die untere Extremität im Halter der Kraftmessapparatur (Experimentaria, Budapest, Un-

garn) fixiert. Der distale Teil des M. soleus wurde mit der Transduktionseinheit des Messgerätes über einen Faden (4-0 Prolene) verbunden.



Abbildung 7: Die Abbildung (A) zeigt schematisch die anatomischen Verhältnisse des Hinterlaufs der Ratte unter dem Aspekt der Freilegung des M. soleus und des N. ischiadicus. In der Abbildung (B) ist der freipräparierte N. ischiadicus dargestellt. Nach der Präparation des M. soleus und des N. ischiadicus wurde die Achillessehne durchtrennt und die untere Extremität im Halter der Kraftmessapparatur fixiert (C).

Die Positionierung des Tieres im Halteapparat des Experimentaria-Messsystems erfolgte in Bauchlage in einer physiologischen Neutralstellung aller Gelenke der unteren Extremität. Durch eine zusätzliche Fixierung der Extremität im Knie- und Sprunggelenk wurden sichere Bedingungen für eine isometrische Kontraktion geschaffen (Abbildung 7).

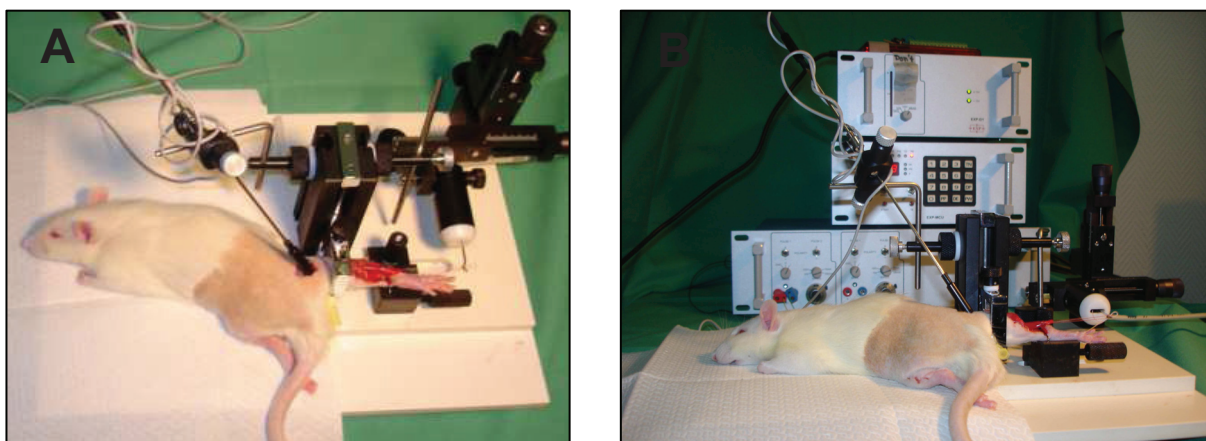


Abbildung 8: Die Abbildungen (A) und (B) zeigen die Positionierung des Versuchstieres im Halteapparat der Experimentaria-Messsysteme. Die Fixierung der Extremität erfolgte im Knie- und Sprunggelenk (A). Das Tier wurde in Bauchlage in einer physiologischen Neutralstellung der Gelenke der unteren Extremität gelagert (B).

Die Optimierung der Extremitätenpositionierung und eine Muskelvordehnung von 20 g wurden mittels des beweglichen Manipulators erreicht. Erst nachdem eine

optimale Position des Tieres sicher eingestellt war, wurde die Stimulierungselektrode an den N. ischiadicus angebracht (Abbildung 8). Zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit wurde an die Kontaktstelle der Elektrode Kochsalzlösung appliziert.

Wie in der Tabelle 1 dargestellt, wurde der N. ischiadicus durch ein bipolares Signal im „fast twitch“- und „tetanus“-Modus stimuliert (Abbildung 9) [Matziolis et al., 2006].

Tabelle 1: Stimulierungsprotokoll zur Ableitung kontraktile Kräfte des *M. soleus*

Modus	Signalstärke	Signalfrequenz	Bipolare Stimulation	Intervalldauer
Fast twitch	9 mA	75 Hz	5x je 0,1 s	5 s
Tetanus	9 mA	75 Hz	5x je 3 s	5 s

Die Stärke der Kontraktionskraft im „fast twitch“- und „tetanus“-Modus wurden durch Berechnung des Mittelwertes der Amplituden von der fünf nacheinander folgenden Muskelreaktionen erfasst. Die Ergebnisse wurden in Prozent der Muskelkraft der unbehandelten Seite in den analogen Stimulationsmodulen vom gleichen Tier angegeben.

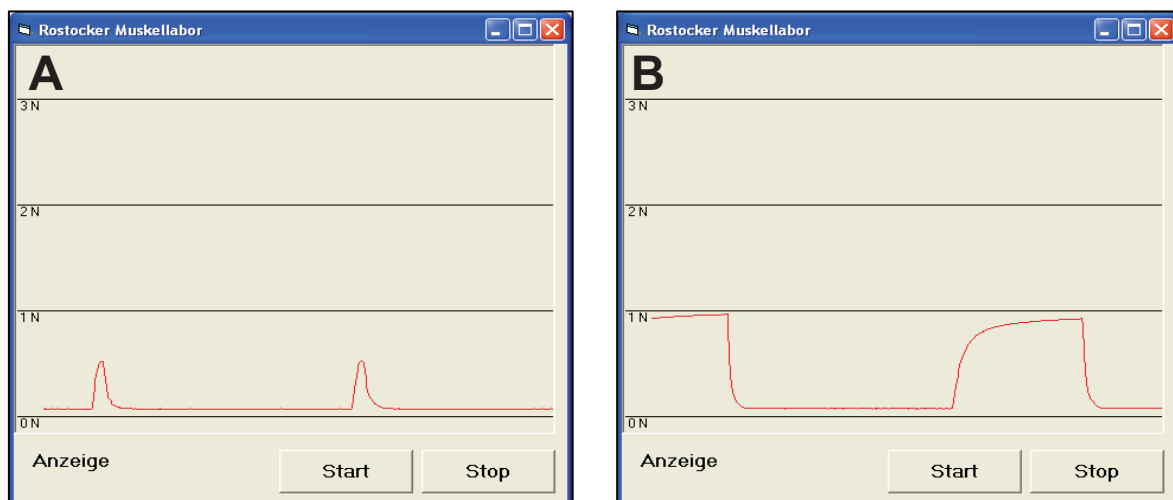


Abbildung 9: Der N. ischiadicus wurde durch ein bipolares Signal im „fast twitch“- (A) und „tetanus“- (B) Modus stimuliert. Die infolge der indirekten Stimulation des *M. soleus* entwickelten Kontraktionskräfte wurden als Einzel- bzw. Tetanus-Kontraktion mit einer speziell dafür entwickelten Software ausgewertet.

5.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die mikrochirurgische Präparationstechnik des M. soleus entspricht der erstmals von Tyml und Budreau [Tyml und Budreau, 1991] beschriebenen und durch Schaser und seine Mitarbeiter [Schaser et al., 1999] für die *in vivo* Mikroskopie modifizierten Präparation des M. extensor digitorum longus (EDL).

Die zuvor rasierte und desinfizierte Haut des linken Hinterlaufes wurde posterolateral in der Längsachse (auf einer imaginären Linie zwischen Patella und Sprunggelenk) auf einer Länge von ca. 2,5 cm inzidiert. Nach Präparation und Darstellung der Faszie wurde diese in der Länge des Zugangs eröffnet. Anschließend erfolgte die Präparation der Beugermuskulatur (M. gastrocnemius/M. soleus). Dazu wurde der laterale Bauch des M. gastrocnemius soweit mobilisiert, dass der M. soleus frei lag. Auftretende kleinste Blutungen wurden mit einer feinen bipolaren Pinzette koaguliert.

Nach der Darstellung des M. soleus wurden zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie die benachbarten Muskelgruppen jeweils mit einem Haltefaden (4-0 Prolene) retrahiert. Nach der abgeschlossenen Präparation erfolgte eine Ruhepause von 20 Minuten zur Stabilisierung des Zustandes des Tieres. Am Ende wurde die gesamte Präparation unter Wasserimmersion mit einem feinen, für die Objektträgerendeckung üblichen Deckglas abgedeckt.

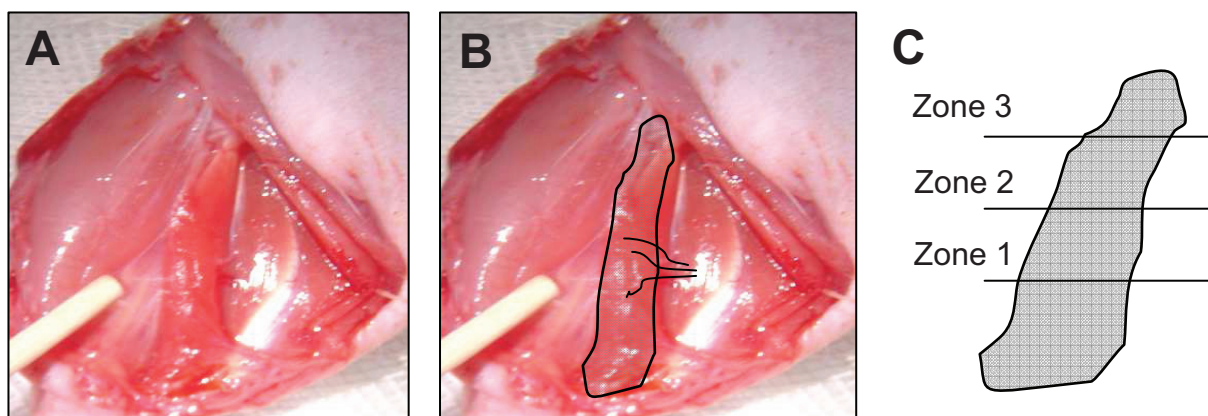


Abbildung 10: Die Abbildung (A) zeigt den für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie frei präparierten M. soleus. Die Abbildung (B) ist eine stilisierte Darstellung des M. soleus mit der Eintrittsstelle neurovaskulärer Strukturen. In der Abbildung (C) ist die schematische Aufteilung des M. soleus in drei morphologische Zonen dargestellt.

Zur Vereinfachung und Vereinheitlichung der komplexen Morphologie des geschädigten Muskels wurden drei Zonen definiert. Zone 1 entspricht der zentralen Region des Muskels mit der Eintrittsstelle der neurovaskulären Strukturen. Der Penumbrabereich wurde als Zone 2 bezeichnet und die Zone 3 umschreibt das Muskelgewebe in unmittelbarer räumlicher Nähe zum traumatisch geschädigten Areal. Der gewählte Untersuchungsmodus beinhaltet ein Vorgehen von medial nach lateral mit der intravitalfluoreszenzmikroskopischen Erfassung von je drei Gesichtsfeldern pro Zone.

5.3.2.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Druck wurde über einen druckstabilen PE-50 Katheter (Portex, Hythe, Kent) auf einen Druckwandler übertragen, von Vorverstärkern aufgenommen und kontinuierlich aufgezeichnet (Sirecust; Siemens, Deutschland). Die Herzfrequenz der Versuchstiere wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplitude fortlaufend aufgezeichnet.

5.3.2.2 Mikrozirkulation

Am Tag 1, 7, 14 und 42 nach dem traumatischen Muskelschaden erfolgte die intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Alle Analysen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop in Epi-Illumination durchgeführt (E600-FN; Nikon, Tokyo, Japan). Nach Injektion von Fluorescein-Isothiocyanat-markiertem Dextran (FITC-Dextran, 15 mg/kg KG, MW 15 kDa, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zur Kontrastierung des mikrovaskulären Gefäßbettes und Rhodamin-6G (1,5 mg/kg KG, MW 496 Da, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zur *in vivo* Anfärbung von Leukozyten erfolgte die Intravitalfluoreszenzmikroskopie. Die Lichtgebung erfolgte mit einer 100-W Quecksilberdampfampe und entsprechenden Filtersets zur blauen (465-495 nm/>505 nm), grünen (510-560 nm/>575 nm) und ultravioletten (340-380 nm/>400 nm) Epi-Illumination.

Die quantitative Analyse der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur erfolgte unter Nutzung von Wasser-Immersionsobjektiven (Nikon; x20/0,75 W und x40/0,80 W), welche eine Vergrößerung von 306- bzw. 630-fach erlaubten. Unter Verwendung des 20x Wasser-Immersionsobjektives erfolgte die Analyse der NADH-

Autofluoreszenz, der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität und des Fließverhaltens der Leukozyten. Mittels des 40x Objektivs wurde die Bestimmung der funktionellen Kapillardichte und die Quantifizierung apoptotischer Zellen durchgeführt. Die drei morphologisch definierten Zonen des M. soleus wurden von medial nach lateral abgescannt und jeweils drei Gesichtsfelder in jeder Zone untersucht. Zu jedem Meßzeitpunkt wurden Kapillarfelder, Venolen und Arteriolen für 30 s aufgezeichnet.

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990-IQ; Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgezeichnet und nach Umwandlung in ein digitales Bildformat und Zwischenschaltung eines Time-Code Generators mit einem SVHS-Videorecorder auf Videoband gespeichert (Panasonic AG-7350; Osaka, Japan).

Die Auswertung der Bilder erfolgte offline an einem Bildverarbeitungsprogramm (Capimage; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Datum und Uhrzeit wurden über einen in das Videosignal eingearbeiteten Videozeitgenerator (TCI-70 RTV; Alpermann/Velte, Hamburg, Deutschland) aufgezeichnet.

5.3.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Die Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (FKD) diente der quantitativen Erfassung der nutritiven Perfusionsstörung. Dieser Parameter beschreibt die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld (cm/cm^2). Die Visualisierung der Kapillaren erfolgte mittels Kontrastierung des Plasmas nach intraarterieller Applikation von 5% FITC markiertem Dextran (15 mg/kgKG, MW 15 kDa, Blaufilter: Exzitation/Emission 465-495 nm/>505 nm). Zur Messung der FKD wurden die mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren am Auswertebildschirm durch Nachzeichnen markiert und die Dichte durch Erfassung der Kapillarlänge pro Beobachtungsfeld (cm/cm^2) berechnet.

5.3.2.2.2 NADH-Autofluoreszenz

Die NADH-Autofluoreszenz stellt einen Indikator für die Gewebeoxygenierung im Skelettmuskel dar [Ince, 1992; Vollmar et al., 1997]. Die Gewebeoxygenierung kann mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Analyse der Skelettmuskeloberfläche ohne vorherige Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen im UV-Licht beurteilt und

quantifiziert werden [Vollmar et al., 1997]. Dieses Verfahren macht sich die Eigenfluoreszenz des Nikotinadenin-Dinukleotids (NADH) zunutze, welches bei Beleuchtung mit UV-Licht angeregt wird und unter Zerfall der Doppelbindungen seinerseits Licht emittiert. NADH akkumuliert im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung bei mangelnder Sauerstoffversorgung der Zelle. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gewebegehalt an NADH, welcher wiederum negativ mit der Gewebeoxygenierung korreliert [Vollmar et al., 1997].

NADH emittiert nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm selbst Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 470-475 nm. Nach ultravioletter Epillumination wurden Grauwerte des Skelettmuskelgewebes computerassistent mittels Densitometrie ermittelt und in arbiträren Einheiten wiedergegeben [Vollmar et al., 1992; Vollmar et al., 1997]. Um Interferenzen mit mikrovaskulären Strukturen zu verhindern, wurde die Messung im Gewebe unter strenger Aussparung von Gefäßen durchgeführt [Gierer et al., 2005].

5.3.2.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die intravitalmikroskopische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als Ausmaß der inflammatorischen Reaktion wurde durch die intraarterielle Injektion von 1% Rhodamin 6G (1,5 mg/kg KG, Grünfilter: Excitation/Emission 530-560/>580 nm), welches sich gut zur Visualisierung von Leukozyten in Blutgefäßen [Baatz et al., 1995; Horobin und Rashid, 1990] eignet, ermöglicht. Die Bestimmung der Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel fand in den postkapillaren Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von 30-60 µm und einer maximalen Länge von 200 µm statt. Die beobachteten Leukozyten wurden in Abhängigkeit von ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel in drei Gruppen klassifiziert. Dazu zählen die nichtadhärenten Leukozyten („floating leukocytes“), die temporär adhären Leukozyten („rolling leukocytes“) und die permanent adhären Leukozyten („sticking leukocytes“).

Frei fließende Leukozyten („floating leukocytes“) passierten den untersuchten Gefäßabschnitt ohne Interaktion mit der Gefäßwand. Die Zellen wurden als rollend definiert, wenn sie eine imaginär durch das Gefäß gelegte Linie mit einer mindestens um 40% geringeren Geschwindigkeit durchflossen als die Leukozyten mit Zentralstromgeschwindigkeit. Die Anzahl rollender Leukozyten wurde in Relation zur Ge-

samtzahl aller den untersuchten Gefäßabschnitt passierten Leukozyten gesetzt und in Prozent angegeben. Als adhärent („sticking leucocytes“) wurden die Leukozyten bezeichnet, die über einen Zeitraum von 30 s stationär an der Endotheloberfläche hafteten (Anzahl pro mm^2). Die Endotheloberfläche (F) wurde aus Gefäßdurchmesser (d) und Länge (L) des untersuchten Gefäßsegmentes berechnet, wobei eine zylindrische Geometrie des entsprechenden Abschnittes angenommen wurde ($F=L \times \pi \times d/10^6$ in mm^2).

5.3.2.2.4 Gefäßpermeabilität

Die Beurteilung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität erfolgte durch Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran. Für diesen hochmolekularen Plasma-Marker (Molekulargewicht 15 kDa) ist eine geringe Extravasation charakteristisch. Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. nach einem Weichteiltrauma kann es auf Grund der Erhöhung der Gefäßpermeabilität zum Austritt von FITC-Dextran in den paravaskulären Raum kommen. Mittels Densitometrie [Pries, 1988] wurden computerassistent die Grauwerte des paravaskulären Gewebes und des angefärbten Blutplasmas bestimmt und zueinander in Relation gesetzt (paravaskulär/intravaskulär). Unter physiologischen Bedingungen ergibt sich ein Wert $< 0,8$, während unter pathologischen Bedingungen Werte > 1 möglich sind, da bei erhöhter Permeabilität die Fluoreszenz des paravaskulären Raumes die des intravaskulären Blutplasmas übersteigen kann [Vollmar et al., 1997]. Die Messungen erfolgten an drei postkapillaren Venolen pro Gesichtsfeld.

5.3.2.2.5 Apoptose

Die apoptotischen Zellen wurden durch Injektion von 1% Bisbenzimid (15 mg/kg KG, UV-Filter: Excitation/Emission 330-380/>415 nm) sichtbar gemacht. Bisbenzimid lagert sich in Zellkernen an Adenin- und Thymidinreiche Regionen der DNA an und färbt somit alle Zellkerne an. Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid ist anhand kernmorphologischer Zeichen wie Kondensation, Fragmentation und Margination des nukleären Chromatins die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen möglich [Menger und Vollmar,

2000; Eipel et al., 2004]. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde pro mm² Fläche errechnet.

5.3.3 Vollblutanalyse

Vor Beginn und nach Abschluss der intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde das Blut aus dem arteriellen Katheter entnommen. Für die Blutgasanalyse wurde eine heparinisierte Glaskapillare mit ca. 90 µl Blut verwendet. Anschließend konnten die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff (PaO₂) und Kohlendioxid (PaCO₂), pH, Hb und Hk bestimmt werden (Rapidlab 348; Bayer Vital, Fernwald, Deutschland). Zur Erstellung des Blutbildes wurde arterielles Blut in 200 µl EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend mittels eines Blutanalysegerätes (Rapidlab 348; Bayer Vital, Fernwald, Deutschland) untersucht.

5.3.4 Histomorphologie

Für die histomorphologischen Untersuchungen des M. soleus wurde am Ende der *in vivo* Versuche die Skelettmuskulatur entnommen und in 4%-iger Formalinlösung 3 Tage fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung des Muskelgewebes in voller Länge in Paraffin. Von den Paraffingewebeblöcken wurden 4 µm Serienschritte in longitudinaler Richtung von proximal nach distal angefertigt. Dadurch wurde eine sichere Identifizierung der drei morphologischen Zonen des M. soleus ermöglicht.

Die quantitative Analyse erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axioskop 40; Zeiss, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung eines 40x Objektivs (Achromplan 0,65 NA; Zeiss, Göttingen, Deutschland).

5.3.4.1 TUNEL-Methode

Während des apoptotischen Zelluntergangs kommt es zur Aufspaltung der nukleären DNA durch Endonukleasen in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren Länge. Mit der TUNEL-Methode lassen sich diese kleinen DNA-Fragmente nachweisen [Gavrieli et al., 1992]. Das Enzym Terminaldesoxynucleotidyltransferase (TdT) reagiert mit 3'-OH Enden der DNA und fügt an diese biotinylierte

Polydesoxyuridylnukleotide an, welche nach der Streptavidin-Blotin-Technik gefärbt werden. Die Biotinenden der Nukleotide reagieren mit Streptavidin, das an Peroxidase gekoppelt ist (Link, Dako Cytomation, Deutschland). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (S 3000; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland), die im histologischen Präparat als braune Färbung sichtbar wird.

Nach der Darstellung der Basalmembran mittels der Laminin-Färbung mit dem polyklonalen Kaninchen-Anti-Laminin-Antikörper (1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) und der Gegenfärbung mit Hämalun konnte die Anzahl apoptotischer Satelittenzellen unter Berücksichtigung ihrer Lokalisation direkt unter der Basalmembran bestimmt werden [Bucher und Wartenberg, 1997]. Im Unterschied dazu wurden die Zellen außerhalb der Basalmembran als intestitielle Zellen bezeichnet und nicht näher differenziert. Die quantitative Auswertung fand durch Auszählen von TUNEL-positiven Zellen in 25 Gesichtsfeldern statt. Angegeben wurde die Anzahl der Zellen pro 10 Myozyten.

5.3.4.2 Sirius-Red-Färbung

Dem histologischen Nachweis der interstitiellen Fibrose im Skelettmuskelgewebe nach Trauma diente die Darstellung von Kollagenfasern mittels der Sirius-Red-Färbung (Direct Red 80; Aldrich, Toronto, Canada). Die Färbung wurde mit der 0,1%-igen Sirius-Red-Lösung (Direct Red 80; Aldrich, Toronto, Kanada) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt [Shi et al., 1996].

Die mit Hilfe der hoch auflösenden Digitalkamera (Zeiss AxioCam MRC 5; Göttingen, Deutschland; 10x Objektiv, Apertur 0,50) gewonnenen Sirius-Red-Präparatbilder wurden so, wie es in der Literatur für Herzmuskelgewebe beschrieben wurde, im Zirkularpolarisationslicht unter Nutzung der Photoshopfunktionen (Version 7, Adobe Systems Europe Ltd, Uxbridge, England) analysiert und ausgewertet [Sterin-Borda et al., 2003]. Die Formation der Kollagenfasern wurde als Prozentsatz zur gesamten Geweboberfläche der Skelettmuskelpräparate angegeben.

5.3.4.3 BrdU/Laminin-Doppelfärbung

Für den immunhistochemischen Nachweis proliferierender Satellitenzellen erfolgte die Analyse der Paraffinschnitte mittels der BrdU/Laminin-Doppelfärbung. Das Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde den Tieren eine Stunde vor dem Versuchsende intraperitoneal verabreicht (50 mg/kg KG; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland). Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, bauen BrdU in die DNA ein.

Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnittpräparate entsprechend den Angaben des Herstellers nach der Streptavidin-Biotin-Methode (Primärantikörper: Kaninchen-Anti-BrdU-IgG, 1:50; Sekundärantikörper: Link, Anti-Kaninchen-IgG aus Maus, 1:100; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin (S 3000; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland).

Nach der Visualisierung der Basalmembran mittels der Laminin-Färbung (Anti-Laminin-Antikörper aus Kaninchen, 1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) konnten BrdU-positive Satellitenzellen anhand ihrer Lage unmittelbar unter der Basalmembran identifiziert werden. Die Auszählung erfolgte, wie von Ferreira und Mitarbeitern [Ferreira et al., 2006] beschrieben wurde, in 10 Gesichtsfeldern. Die Anzahl BrdU-positiver Satellitenzellen wurde als Zellzahl pro 10 Myozyten angegeben.

5.3.4.4 „Cleaved“-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung

Während der „Cleaved“-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung wird die Anwesenheit eines für die Apoptose typischen Enzyms, der „Cleaved“-Caspase-3, nachgewiesen. „Cleaved“-Caspase-3 geht aus der Spaltung der Procaspase-3 hervor und stellt die aktivierte Form dieses an der Regulation des Apoptoseprozesses beteiligten Enzyms dar [McConkey et al., 1996; Hengartner, 2000; Hengartner, 2001]. Mit Hilfe eines spezifischen Anti-„Cleaved“-Caspase-3-IgG-Antikörpers aus Kaninchen (1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) werden die zytoplasmaständigen „Cleaved“-Caspase-3-Enzyme markiert und nach der Streptavidin-Biotin-Methode sichtbar gemacht. Als Sekundärantikörper diente der biotinylierte Anti-Kaninchen-Antikörper aus Maus (1:100, Link, LSAB, HRP, Dako Cytomation). Der chromogene Nachweis erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidin (S 3000; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Die Darstellung der Basalmembran fand mittels Laminin-Färbung (Anti-Laminin-Antikörper aus Kaninchen, 1:50; Dako Cytomation, Hamburg, Deutsch-

land) statt. Die "Cleaved"-Caspase-3-positiven Satellitenzellen der Penumbrazone wurden, wie von Ferreira und Mitarbeitern [Ferreira et al., 2006] beschrieben wurde, einzeln in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt und als Zellzahl pro 10 Myozyten angegeben.

5.3.5 Molekularbiologie: RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist ein hochempfindliches Verfahren zum molekularbiologischen Nachweis der Expression spezifischer Gene in Zellen. Zunächst wurde RNA aus den L8-Myoblasten isoliert. Für die Durchführung der reversen Transkription wurde M-MLV Reverse Transcriptase, RNaseH Minus (Promega) verwendet. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zunächst wurden 2 µg der isolierten RNA im gelösten Zustand mit 2 µl Oligo-dT Primer versetzt. Mit destilliertem Wasser wurde auf 14 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der mRNA wurde der Ansatz 5 min bei 70°C inkubiert.

Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTP und 1 µl Reverse Transkriptase zugefügt. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde der Reaktionsansatz 60 min bei 42°C inkubiert. Hier kommt es zur Bindung der Primer an die RNA und zur Synthese der cDNA.

Tabelle 2: Auflistung der in der RT-PCR verwendeten Chemikalien

Verwendete Chemikalien/Bestandteile	Endkonzentration
Primer: Oligo-dt Primer (50 µM)	5 µM
verdünnte RNA: 2 µg Total-RNA	50 ng/µl
Reaktionspuffer: 5x M-MLV Reaction Buffer	1x
dNTP: dNTP mix (jeweils 10 mM)	jeweils 0,5 mM
Enzym: M-MLV Reverse Transcriptase (200 IU/µl)	10 IU/µl

Die Länge des RT-PCR-Produktes betrug 395 Basenpaare. Der Reaktionsansatz wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, und es wurde die Länge des erwartenden Fragments verifiziert. Zur Visualisierung der DNA im UV-Licht wurde dem Agarosegel 0,3 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 90 V, als Laufpuffer diente Tris-Borat-EDTA-Puffer.

5.4 Versuchsgruppen und experimentelles Protokoll

Die *in vivo* Analyse des Einflusses von EPO auf die Skelettmuskelregeneration nach Trauma erfolgte an 80 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River; Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und es erfolgte die standardisierte Kontusion des M. soleus (Abbildung 11). Unmittelbar nach dem Kontusionstrauma erhielten die Tiere der EPO-Gruppe (n = 10 Tiere pro Zeitpunkt) eine einmalige EPO-Injektion in den M. soleus (Epoetin alfa, Reconorm®; 5000 IE/kg KG, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) mittels einer 1 ml-Spritze und einer 25 G Nadel. Tiere der Kontrollgruppe (n = 10 Tiere pro Zeitpunkt) erhielten äquivalente Volumina isotoner Kochsalzlösung in der gleichen Weise i.m. appliziert. Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden, wurde das exponierte Gewebe intermittierend mit warmer 0,9% NaCl-Lösung superfundiert. Anschließend wurden die oberflächliche Muskelfaszie und die Haut mit 4-0 Prolenefäden vernäht.

Im Verlauf des gesamten Versuchzeitraums wurde das Aussehen und Verhalten der Tiere qualitativ beurteilt und dokumentiert. Während der chirurgischen Präparation erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der systemischen Hämodynamik. Die Blutabnahme erfolgte unmittelbar vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die biomechanische Testung und die Intravitalfluoreszenzmikroskopie wurden nach dem Zeitplan am Tag 1, 7, 14 und 42 nach dem traumatischen Muskelschaden durchgeführt.

Nach Abschluss der Untersuchungen und Vertiefen der Narkose wurden die Tiere durch direkte Herzpunktion getötet. Der ipsi- und kontralaterale M. soleus wurden für weitere histomorphologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen.

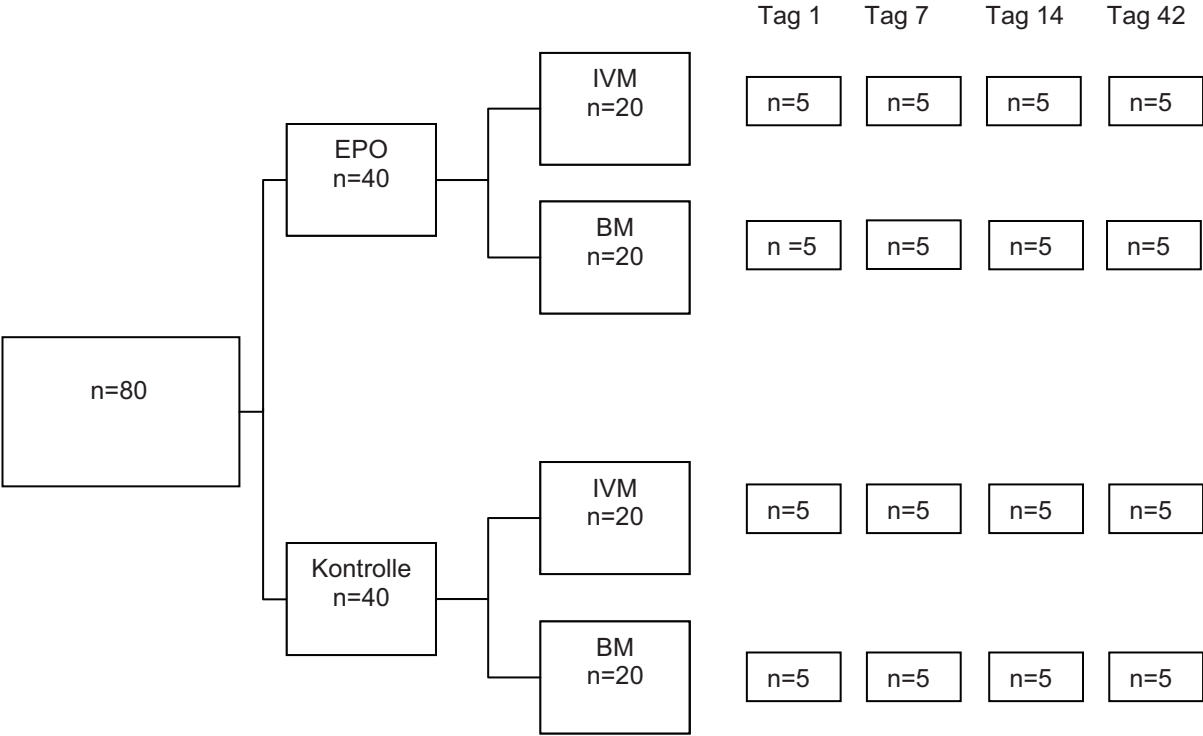


Abbildung 11: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen und des Versuchsprotokolls der *in vivo* Untersuchungen. IVM= intravitale Mikroskopie, BM= Biomechanik.

5.5 Statistische Auswertung

Die aus den *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel erfasst und die Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen Parameter aus den Einzelwerten pro Tier pro Versuchsgruppe.

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt vom Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mittels Kruskal Wallis Varianzanalyse und dem paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney Rang Summen Test. Entsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt.

Die graphische Darstellung sämtlicher statistischer Tests erfolgte unter Verwendung des Software Pakets SigmaPlot Version 9.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

6 ERGEBNISSE

6.1 *In vitro* Untersuchungen: 7AAD-Färbung und FACS-Analyse

Unter den regulären Kultivierungsbedingungen mit Serum zeigten die L8-Myoblasten nach 72 Stunden eine spontane Apoptoserate von ca. $6,1 \pm 1,0\%$.

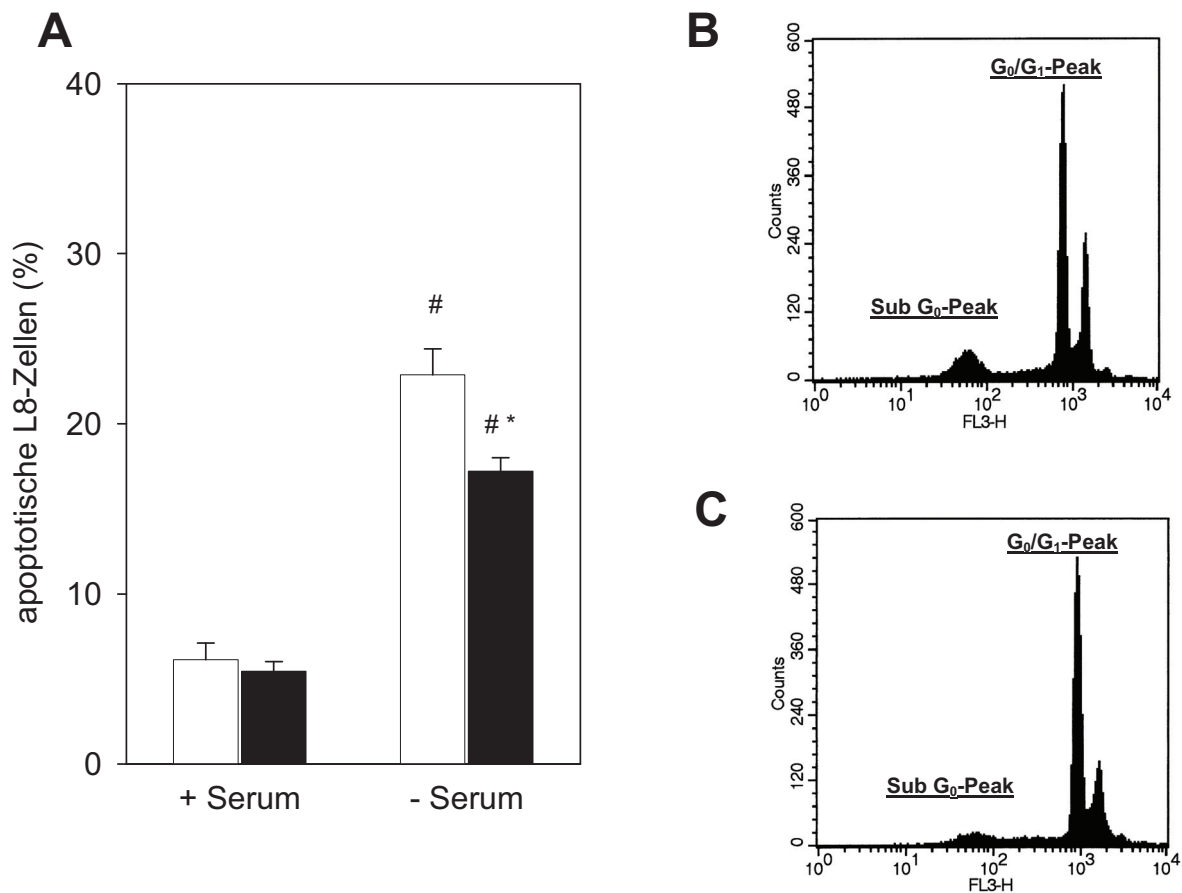


Abbildung 12: Die Abbildung (A) zeigt den Prozentsatz apoptotischer L8-Myoblasten in serumhaltiger (+ Serum) und serumfreier (- Serum) Kultur. FACS-Analyse, Kontrollgruppe (weiß, $n = 3$), EPO-Gruppe (schwarz, $n = 3$). Die Abbildungen (B) und (C) zeigen repräsentative Histogramme der FACS-Analyse, auf der X-Achse ist die relative Intensität des Fluoreszenzsignals und auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen aufgetragen. B: Histogramm, FACS-Analyse, Kontrollgruppe. C: Histogramm, FACS-Analyse, EPO-Gruppe. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs Kontrolle, # $p < 0,05$ vs + Serum.

Wie Abbildung 12 zeigt, änderte sich die spontane Apoptoserate der L8-Myoblastenkultur mit Serum unter dem Einfluss von EPO nicht signifikant und zeigte nach 72 Stunden einen Mittelwert von ca. $5,5 \pm 0,6\%$. In der Kontrollgruppe (NaCl) bewirkte der Serumentzug einen Anstieg der spontanen Apoptoserate auf ca. $23,9 \pm$

1,5%. Im Vergleich dazu führte die EPO-Exposition in der Kultur ohne Serum nach 72 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose auf ca. $17,2 \pm 0,8\%$.

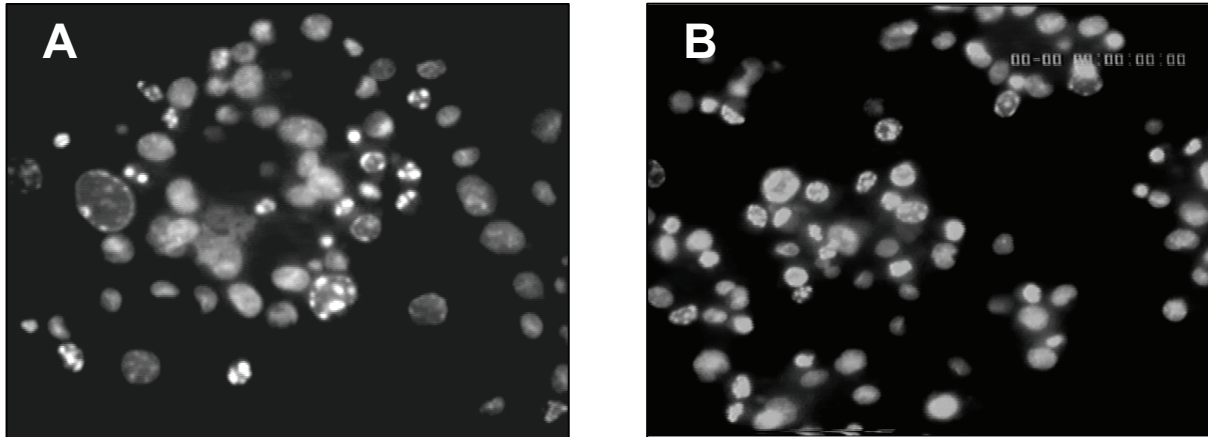


Abbildung 13: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen apoptotischer L8-Myoblasten der Zellkultur ohne Serum. A: Kontrollgruppe, B: EPO-Gruppe. 40x Vergrößerung.

6.2 *In vivo* Untersuchungen

Nach der Operation wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgebracht. Es erfolgte eine fortlaufende Beobachtung bis zum Erwachen der Tiere durch den Operateur. Anschließend wurden sie ihrem gewohnten 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus zugeführt. Es konnten keine Infektionen an der operierten Extremität festgestellt werden. Lediglich wurde in den ersten Tagen ein Schonverhalten des linken Hinterlaufs beobachtet. Alle Tiere, die dem offenen Kontusionstrauma unterzogen wurden, erwachten ohne Komplikationen aus der Narkose. Die Tiere erholten sich rasch nach der Operation und zeigten nach wenigen Stunden eine Wiederaufnahme des Ess- und Trinkverhaltens.

6.2.1 Biomechanik

Die Reduktion der Amplitude der kontraktiven Muskelkraft korreliert positiv mit dem Ausmaß der Gewebeschädigung. Als physiologische Richtwerte dienten die kontraktiven Kräfte des nicht geschädigten M. soleus der kontralateralen Seite. Bei Einzelzuckung des nicht geschädigten M. soleus wurde der Mittelwert der Kontrakti-

onskraft von $ca. 0,50 \pm 0,02$ N ermittelt, während für die Kraftamplitude bei tetanischer Kontraktion der Mittelwert bei $ca. 0,88 \pm 0,05$ N lag. Wie Abbildung 14 zeigt, verursachte das offene Kontusionstrauma am Tag 1 nach Trauma in beiden Gruppen eine signifikante Reduktion der Muskelkraft sowohl bei Einzelzuckung als auch bei tetanischer Kontraktion. Der größte Zuwachs der Kontraktionskraft über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen fand in beiden Gruppen bei Einzelzuckung und bei tetanischer Kontraktion vom Tag 1 zum Tag 7 statt.

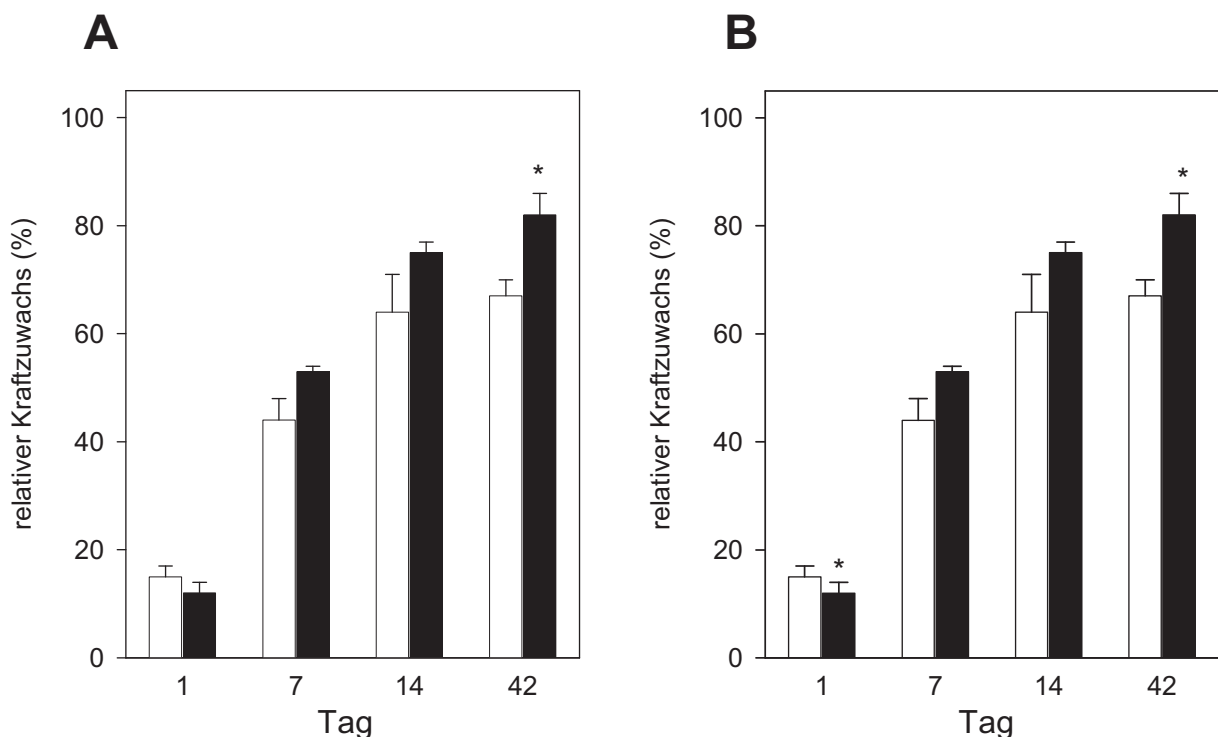


Abbildung 14: Kontraktionskraft des *M. soleus* bei Tieren der Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und Tieren der EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$) im „single twitch“- (A) und „tetanus“-Modus (B). Biomechanische Testung, Versuchsanordnung *Experimentaria*. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

Am Tag 7 nach Trauma betrug die Kraftamplitude bei Einzelzuckung des *M. soleus* der mit NaCl behandelten Tiere $ca. 44\%$ und bei tetanischer Kontraktion $ca. 30\%$ der Kraft der kontralateralen Seite. Im Vergleich dazu kam es zum signifikanten Anstieg der Kraftamplitude des *M. soleus* in der EPO-Gruppe am Tag 7 bei Einzelzuckung auf $ca. 54\%$ und bei tetanischer Kontraktion auf $ca. 42\%$ der Kraft der kontralateralen Seite. Während der weiteren Beobachtung wies das geschädigte Muskelgewebe beider Gruppen eine kontinuierliche Steigerung der Kontraktionskraft bei

Einzelzuckung und bei tetanischer Kontraktion auf. Nach 42 Tagen Beobachtung erreichten die registrierten Werte jedoch nicht die entsprechenden Ergebnisse der unverletzten Gegenseite. Am Tag 42 nach Trauma lag die Kraftamplitude bei Einzelzuckung des M. soleus der mit NaCl behandelten Tiere bei ca. 66% und bei tetanischer Kontraktion bei ca. 56% der Kraft der kontralateralen Seite. Im Vergleich dazu kam es zum signifikanten Anstieg der Kraftamplitude des M. soleus in der EPO-Gruppe am Tag 42 bei Einzelzuckung auf ca. 82% und bei tetanischer Kontraktion auf ca. 78% der Kraft der kontralateralen Seite. Ein Vergleich des Kraftzuwachses bei Einzelzuckung und bei tetanischer Kontraktion beider Gruppen nach Trauma zeigt eine zu allen Beobachtungszeitpunkten um 10 bis 20% größere Zunahme der Kontraktionskraft in der EPO-Gruppe gegenüber dem Kraftzuwachs in der Kontrollgruppe.

6.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

6.2.2.1 Makrohämodynamik

Während der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der Vitalparameter: mittlerer arterieller Druck (MAP) und Herzfrequenz (HF). In allen Gruppen zeigten sich physiologische Normwerte, die in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 3: Der mittlere arterielle Druck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) von Tieren der Kontrollgruppe (Kontrolle, $n = 5$) und Tieren der EPO-Gruppe (EPO, $n = 5$) am Tag 1, 7, 14 und 42. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM.

Tag	MAP [mmHg]		HF [n/min]	
	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO
1	112 \pm 3	112 \pm 3	311 \pm 12	310 \pm 14
7	114 \pm 2	115 \pm 2	322 \pm 12	320 \pm 8
14	112 \pm 3	111 \pm 3	318 \pm 14	316 \pm 10
42	111 \pm 5	113 \pm 2	312 \pm 8	314 \pm 12

6.2.2.2 Mikrozirkulation

Nach dem offenen Kontusionstrauma konnte das Gefäßsystem des M. soleus, bestehend aus terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen

und Sammelvenolen, mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie unter Anwendung von FITC-Dextran während des gesamten Beobachtungszeitraumes kontrastreich dargestellt werden (Abbildung 15).

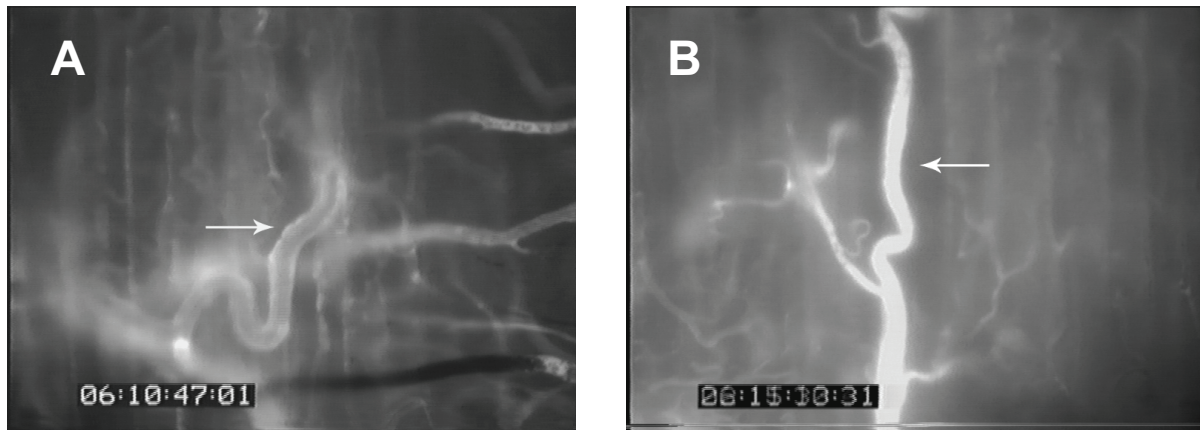


Abbildung 15: Repräsentative intravitale Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen der postkapillaren Venolen (Pfeil) mit dem kapillaren Netzwerk der Zone 3 des M. soleus am Tag 7. A: Kontrollgruppe; B: EPO-Gruppe. 20x Vergrößerung.

In beiden Gruppen verursachte das offene Kontusionstrauma des linken Hinterlaufs eine lokale inflammatorische Reaktion und eine Störung der nutritiven Gefäßperfusion im Sinne eines nutritiven Perfusionsversagens, wobei das größte Ausmaß der inflammatorischen Reaktion bei allen Tieren in der Zone 3 zu beobachten war. Diese Verhältnisse spiegeln die unterschiedliche Ausprägung der Gewebsschädigung nach Trauma in den drei Zonen innerhalb des M. soleus wider.

6.2.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Die Analyse der nutritiven Gefäßperfusion im M. soleus nach der Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran zeigte eine verminderte funktionelle Kapillardichte in beiden Gruppen am Tag 1 nach Trauma (Abbildung 16). In der Kontrollgruppe lag die funktionelle Kapillardichte in der Zone 3 bei $185 \pm 11 \text{ cm/cm}^2$ (Abbildung 17). Im Gegensatz dazu wiesen die mit EPO behandelten Tiere in der Zone 3 eine signifikant höhere funktionelle Kapillardichte von $245 \pm 14 \text{ cm/cm}^2$ auf.

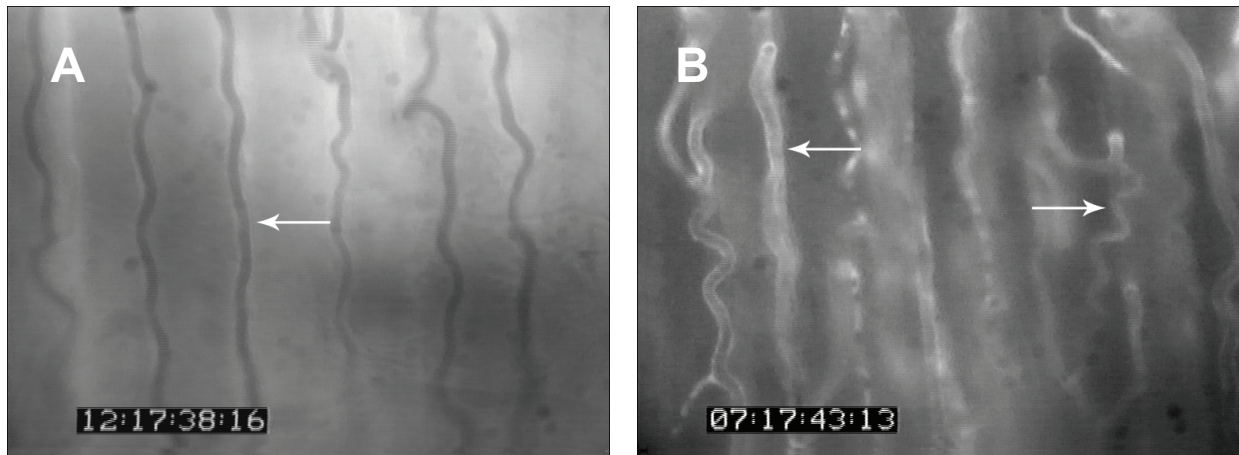


Abbildung 16: Repräsentative intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der funktionellen Kapillardichte der Zone 3 des *M. soleus* am Tag 1. Nach der Injektion von FITC-Dextran stellt sich die Mikrozirkulation des *M. soleus* in Form von parallel zueinander verlaufenden Kapillaren (Pfeil) dar. A: Kontrollgruppe, ($\sim 215 \text{ cm/cm}^2$), B: EPO-Gruppe, ($\sim 410 \text{ cm/cm}^2$), 630x Vergrößerung.

Zu betonen ist, dass der größte Anstieg der funktionellen Kapillardichte von ca. 67% in der Zone 3 der EPO-Gruppe von Tag 1 zu Tag 7 zu beobachten war. Der Anstieg der funktionellen Kapillardichte in der Zone 3 der mit NaCl behandelten Tiere von Tag 1 zu Tag 7 nach Trauma war mit ca. 20% deutlich geringer ausgeprägt. Im weiteren Verlauf nahm die funktionelle Kapillardichte in beiden Gruppen kontinuierlich zu.

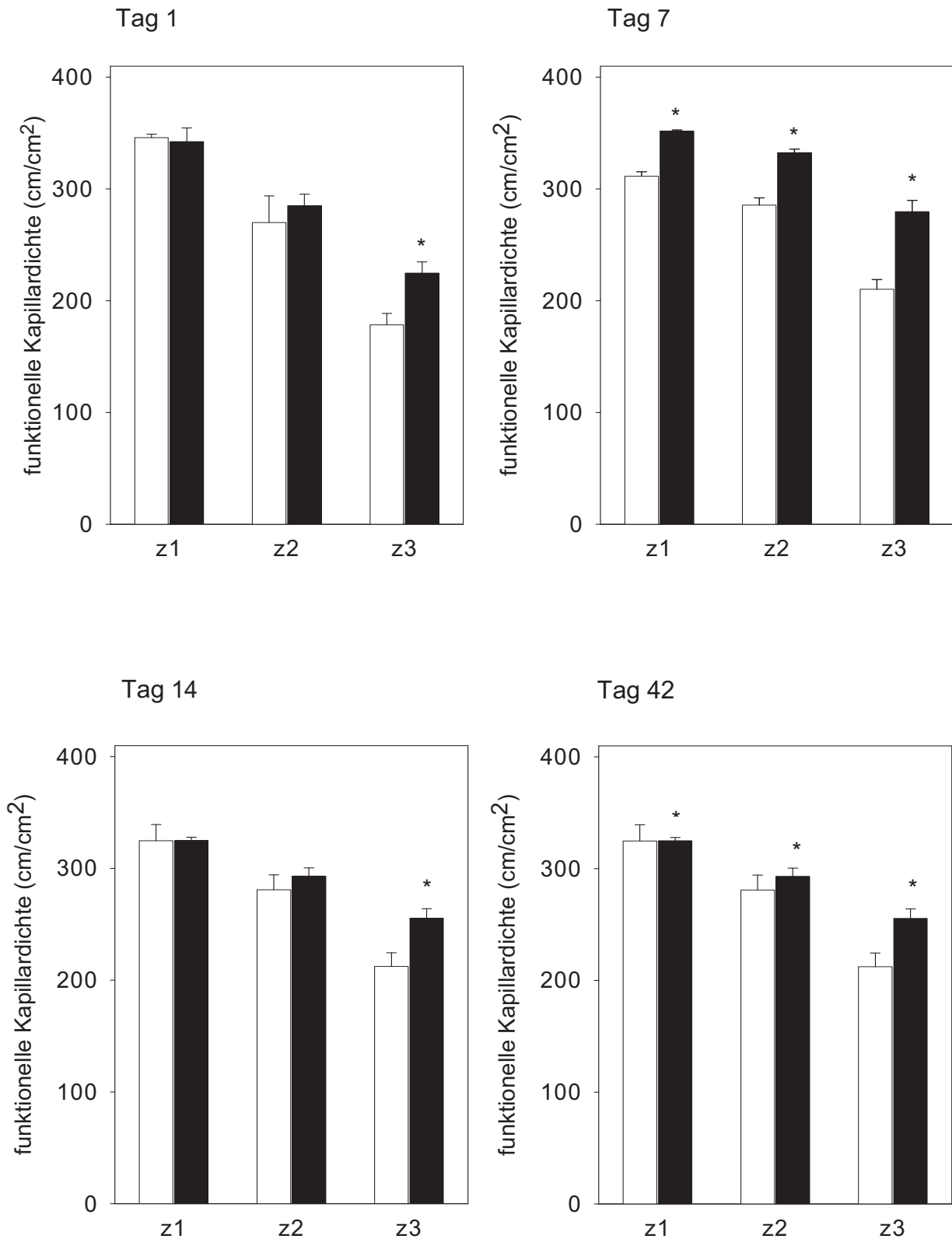


Abbildung 17: Funktionelle Kapillardichte der drei Zonen des *M. soleus*. Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). In vivo Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierte Bildanalyse. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

6.2.2.2.2 NADH-Autofluoreszenz

Die NADH-Autofluoreszenz diente als Maß für die Oxygenierung des Gewebes. Wie in Tabelle 4 dargestellt, ergab der Vergleich der NADH-Autofluoreszenz keine signifikanten Unterschiede. Es war jedoch die klare Tendenz zur Reduktion der NADH-Autofluoreszenz in der EPO-Gruppe am Tag 1 nach Trauma zu beobachten. Auf der Grundlage, dass der NADH-Gehalt negativ mit der mikrovaskulären Perfusion korreliert, spiegeln diese Verhältnisse die deutlich höhere mikrovaskuläre Perfusion des M. soleus in den mit EPO behandelten Tieren wider.

Tabelle 4: NADH-Autofluoreszenz des M. soleus von Tieren der Kontrollgruppe (Kontrolle, n = 5) und Tieren der EPO-Gruppe (EPO, n = 5). In vivo Fluoreszenzmikroskopie (x40) und computerassistierte Bildanalyse. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM.

Tag	Zone 1 (z1)		Zone 2 (z2)		Zone 3 (z3)	
	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO
1	55 \pm 16	29 \pm 6	54 \pm 19	29 \pm 6	54 \pm 19	30 \pm 16
7	30 \pm 19	38 \pm 15	33 \pm 10	28 \pm 18	36 \pm 16	45 \pm 8
14	31 \pm 12	29 \pm 16	33 \pm 14	42 \pm 8	38 \pm 12	35 \pm 16
42	37 \pm 18	35 \pm 8	34 \pm 12	38 \pm 16	34 \pm 8	38 \pm 12

6.2.2.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Mittels i.v.-Applikation von Rhodamin 6G zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillären Venolen des M. soleus untersucht (Abbildung 18). Gezählt wurden alle diejenigen Leukozyten, die sich während eines Beobachtungszeitraumes von 20 s nicht bewegten, diese wurden als fest adhärent definiert. In beiden Gruppen bewirkte das Kontusionstrauma eine gesteigerte Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel postkapillärer Venolen in der Zone 3 (Abbildung 19). Am Tag 7 nach dem Trauma betrug die Fraktion der am Endothel entlang rollenden Leukozyten in der Zone 3 der mit NaCl behandelten Tiere $21,6 \pm 2,4\%$. Im Vergleich dazu wurde eine signifikante Reduktion der Fraktion der am Endothel entlang rollenden Leukozyten von $15,9 \pm 2,3\%$ in der Zone 3 in der EPO-Gruppe am Tag 7 nach Trauma beobachtet.

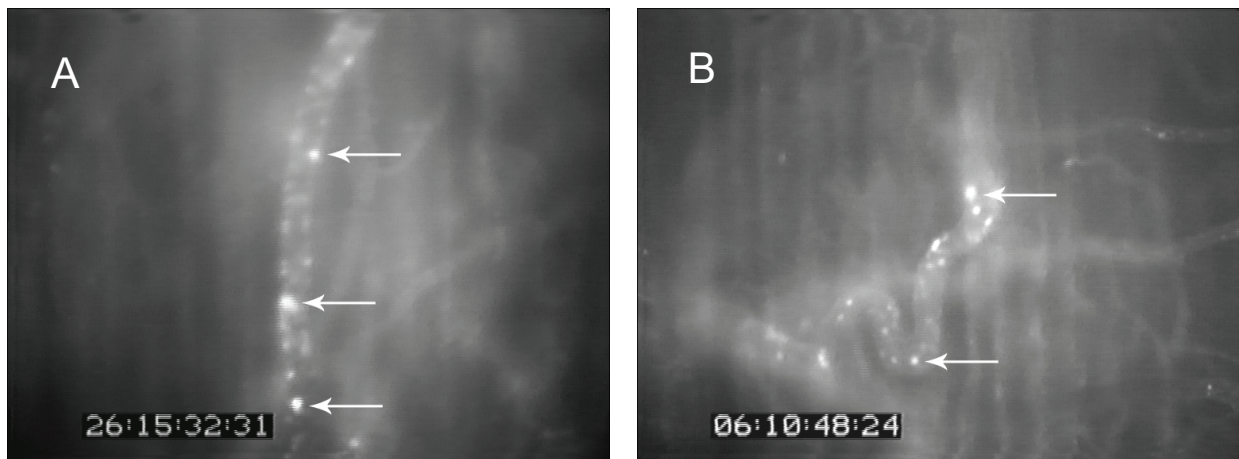


Abbildung 18: Die Abbildung zeigt repräsentative intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen postkapillärer Venolen mit am mikrovaskulärem Endothel adhären Leukozyten in der Zone 3 am Tag 7 nach Trauma. Nach Injektion von Rhodamin 6G stellen sich Leukozyten weiß dar (Pfeile). A: Kontrollgruppe ($n = 5$), B: EPO-Gruppe ($n = 5$). *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierte Bildanalyse. 20x Vergrößerung.

Zu den späteren Beobachtungszeitpunkten nahm die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion kontinuierlich ab. Am Tag 42 nach dem Trauma zeigte die Fraktion der am Endothel entlang rollenden Leukozyten in der Zone 3 der Kontroll- und der EPO-Gruppe annähernd gleiche Werte.

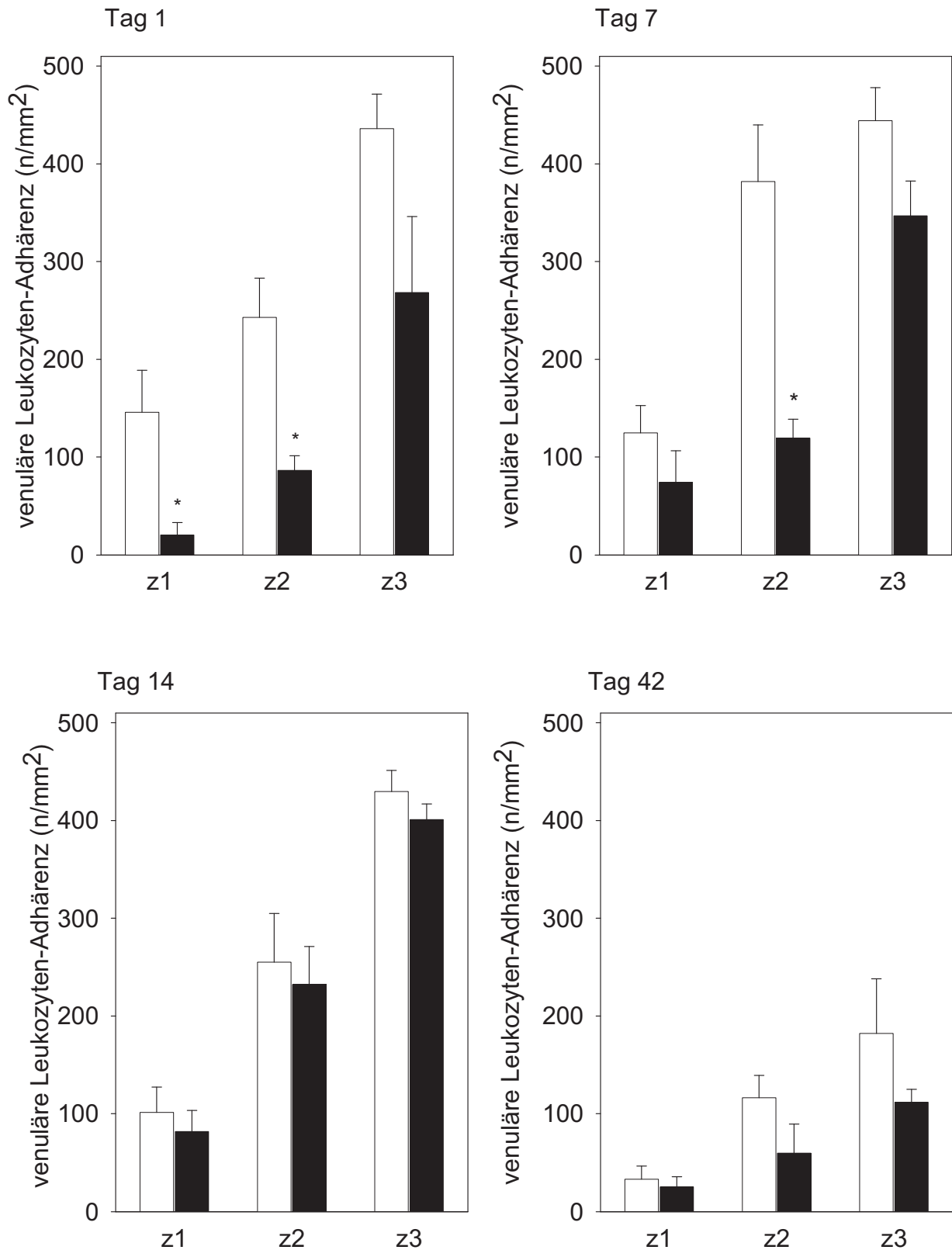


Abbildung 19: Anzahl fest adhärenter Leukozyten am mikrovaskulärem Endothel postkapillarer Venolen in drei Zonen des *M. soleus*. Tiere der Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und Tiere der EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). In vivo Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierte Bildanalyse. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

6.2.2.2.4 Gefäßpermeabilität/makromolekulare Leakage

Eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die eine vermehrte Extravasation des hochmolekularen Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran aus den postkapillaren Venolen ins Interstitium erlaubt, war in beiden Gruppen von Tag 1 bis zu Tag 14 zu beobachten. Wie die Abbildung 20 zeigt, war die makromolekulare Leakage in beiden Gruppen am Tag 1 nach Trauma am stärksten ausgeprägt. Am Tag 1 nach Trauma lag die makromolekulare Leakage in der Zone 3 der Kontrollgruppe bei $0,96 \pm 0,06$, während die Leakage in der Zone 3 der mit EPO behandelten Tiere am Tag 1 nach Trauma mit einem Mittelwert von $0,66 \pm 0,04$ deutlich geringer ausgeprägt war. Im weiteren Verlauf erreichte die makromolekulare Leakage physiologische Werte. Am Tag 42 nach dem Trauma zeigte die makromolekulare Leakage in der Zone 3 der beiden Gruppen annähernd gleiche Werte (Abbildung 20).

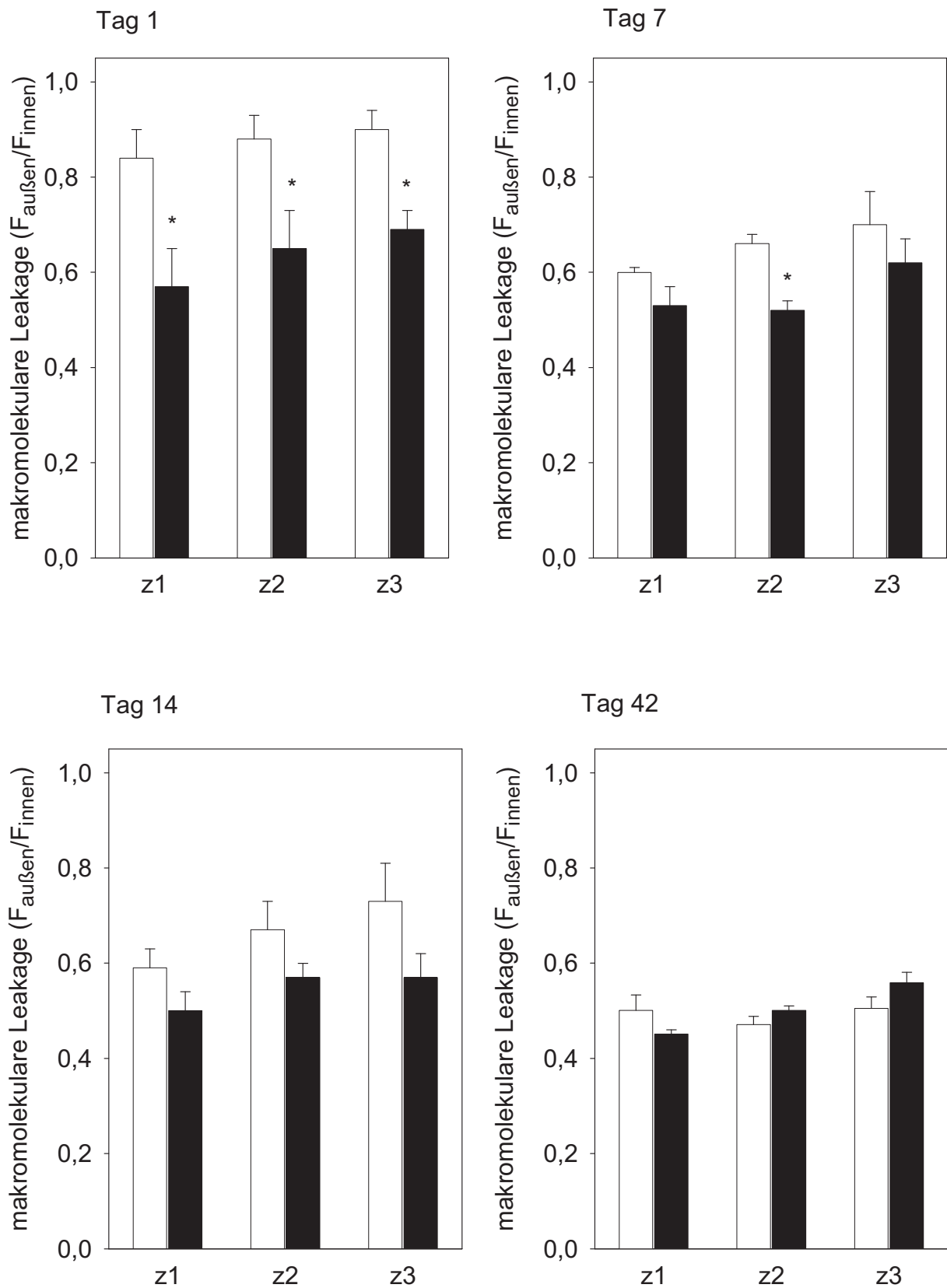


Abbildung 20: Gefäßpermeabilität (makromolekulare Leakage) postkapillarer Venolen der drei Zonen des M. soleus. Kontrollgruppe (weiß, n = 5) und EPO-Gruppe (schwarz, n = 5). In vivo Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierte Bildanalyse. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, *p < 0,05 vs Kontrolle.

6.2.2.2.5 Apoptose

Das Kontusionstrauma bewirkte einen Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen in der Zone 3 des M. soleus am Tag 1, 7 und 14, der sowohl in der Kontroll- als auch in der EPO-Gruppe beobachtet wurde. Im Vergleich dazu blieb die Anzahl apoptotischer Zellen in der Zone 1 über 42 Tage der Beobachtungszeit in beiden Gruppen bei ca. 2 Zellen/GF annähernd gleich. Die Abbildung 21 zeigt die Chromatinkondensation in den Zellkernen des M. soleus in Bisbenzimid-Färbung, ein charakteristisches Merkmal apoptotischer Zellen.

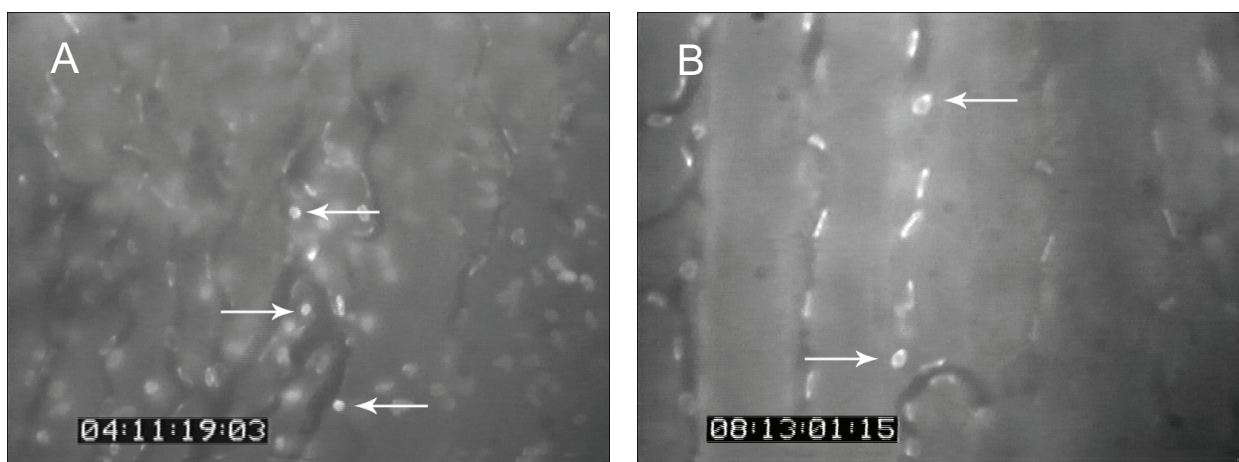


Abbildung 21: Repräsentative intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung apoptotischer Zellen in der Zone 3 des M. soleus am Tag 7 nach Trauma. A: Kontrollgruppe und B: EPO-Gruppe. Apoptotische Zellen können nach Bisbenzimid-Färbung anhand der charakteristischen Kondensation des Chromatins (Pfeil) erkannt werden. 40x Vergrößerung.

Die maximale Ausprägung der Apoptoserate im M. soleus war in beiden Gruppen am Tag 7 zu beobachten (Abbildung 22). Am Tag 7 nach Trauma lag die Apoptoserate in der Zone 3 der Kontrollgruppe bei ca. 11 ± 2 Zellen/GF, während die Apoptoserate in der Zone 3 der mit EPO behandelten Tiere am Tag 7 nach Trauma mit ca. 5 ± 2 Zellen/GF deutlich geringer ausgeprägt war. Am Tag 42 nach Trauma zeigten sich keine Unterschiede der Apoptoserate zwischen den beiden Gruppen.

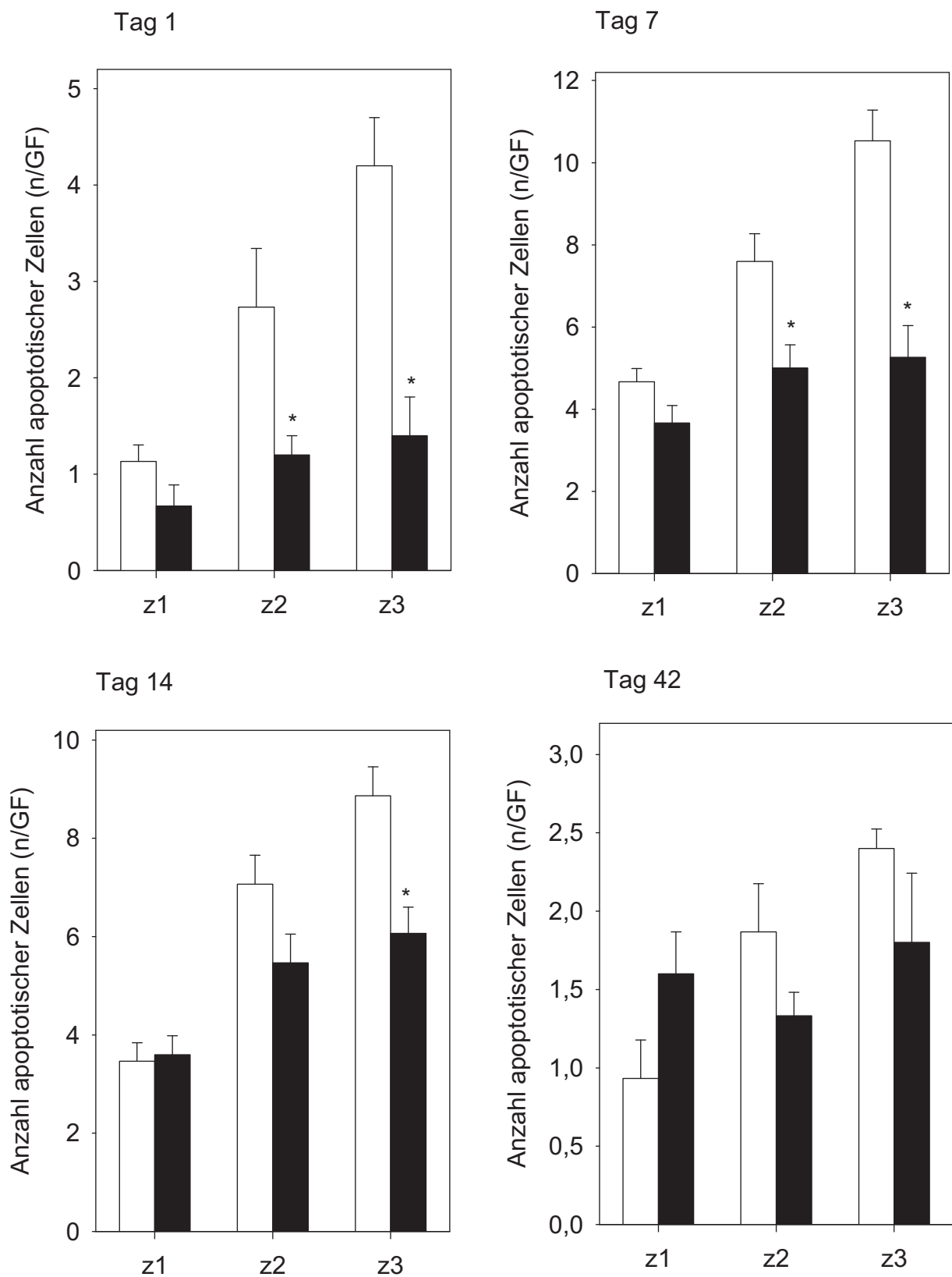


Abbildung 22: Anzahl apoptotischer Zellen der drei Zonen des *M. soleus*. Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). In vivo Fluoreszenzmikroskopie und computerassistierte Bildanalyse. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, $*p < 0,05$ vs Kontrolle.

6.3 Vollblutanalyse

Nach der chirurgischen Präparation und unmittelbar vor der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Analyse hämatologischer Parameter durchgeführt. Die intramuskuläre EPO-Applikation verursachte einen diskreten Anstieg der systemischen EPO-Konzentration und der relativen Retikulozytenzahl am Tag 1 nach Trauma auf ca. 32 mU/ml und $9,6 \pm 4,8\%$ (Tabelle 5).

Tabelle 5: Systemische Retikulozytenzahl und EPO-Konzentrationen in der Kontroll- und EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM.

Tag	Retikulozyten, rel. [%]		EPO [mU/ml]	
	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO
1	$4,5 \pm 0,9$	$9,6 \pm 4,8$	$2 \pm 0,5$	$31,5 \pm 12,3$
7	$3,8 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,7$	≤ 1	$1,2 \pm 0,2$
14	$3,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	≤ 1	$1,1 \pm 0,2$
42	$2,5 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,3$	≤ 1	$1,2 \pm 0,2$

Im Vergleich dazu wurden die systemische EPO-Konzentration und die relative Retikulozytenzahl in der Kontrollgruppe am Tag 1 nach Trauma mit ca. 2 ± 1 mU/ml und $4,5 \pm 0,9\%$ gemessen. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten war in beiden Gruppen die systemische EPO-Konzentration nicht messbar und die relative Retikulozytenzahl lag unter 4%.

Hämoglobin-Konzentrationen, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahlen zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen und lagen im physiologischen Normbereich (Tabelle 6).

Tabelle 6: Hämoglobinkonzentrationen, Hämatokrit und systemische Leukozytenzahlen in der Kontroll- und EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM.

Tag	Hb [mmol/l]		Hk [%]		Leukozyten [$\times 10^9/l$]	
	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO	Kontrolle	EPO
1	$8,6 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,4$	42 ± 2	44 ± 4	$5,5 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,9$
7	$9,2 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,3$	43 ± 2	51 ± 2	$5,5 \pm 0,9$	$4,1 \pm 0,9$
14	$9,9 \pm 0,4$	$10,4 \pm 0,3$	48 ± 1	50 ± 2	$5,1 \pm 0,6$	$4,2 \pm 1,3$
42	$10,0 \pm 0,3$	$9,7 \pm 1,3$	49 ± 2	53 ± 4	$4,8 \pm 1,4$	$5,5 \pm 1,1$

6.4 Histomorphologie

6.4.1 Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen

6.4.1.1 TUNEL-Methode

Die *in vivo* gewonnenen Daten des apoptotischen Gewebeschadens konnten erfolgreich mittels der histomorphologischen TUNEL-Methode verifiziert werden. In beiden Gruppen zeigte sich nach dem Kontusionstrauma einen Anstieg TUNEL-positiver Satellitenzellen, welcher am Tag 1 nach Trauma am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 23).

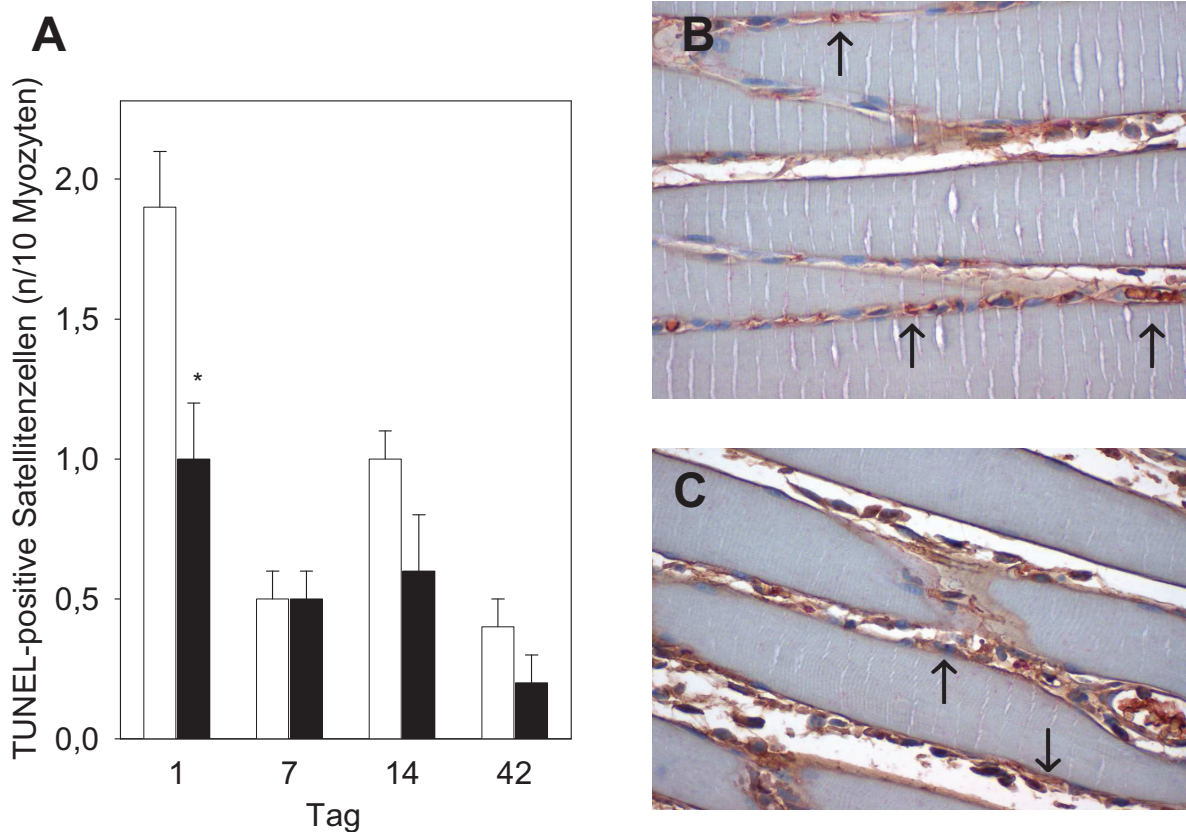


Abbildung 23: Nachweis apoptotischer Satellitenzellen mittels TUNEL-Analyse. A: Anzahl TUNEL-positiver Satellitenzellen am Tag 1, 7, 14 und 42, TUNEL-Analyse, Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$), EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). (B) und (C) sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von TUNEL-positiven Satellitenzellen (Pfeile) am Tag 1 nach Trauma, 400x Vergrößerung; B: Kontrollgruppe, C: EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

So wurden in der Kontrollgruppe am Tag 1 nach Trauma ca. 1,8 Satellitenzellen pro 10 Myozyten registriert. Die gewebsschützende Wirkung von EPO manifestierte sich am Tag 1 nach Trauma in einer deutlichen Reduktion der Apoptoserate auf ca. 1

Satellitenzelle pro 10 Myozyten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl apoptotischer Zellen in beiden Gruppen kontinuierlich ab und lag am Tag 42 nach Trauma bei ca. 0,3 Satellitenzellen pro 10 Myozyten.

6.4.1.2 "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung

Mittels der immunhistochemischen "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung wurde ein drastischer Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen als Indikator der Gewebeschädigung in beiden Gruppen am Tag 1 nach Trauma beobachtet (Abbildung 24).

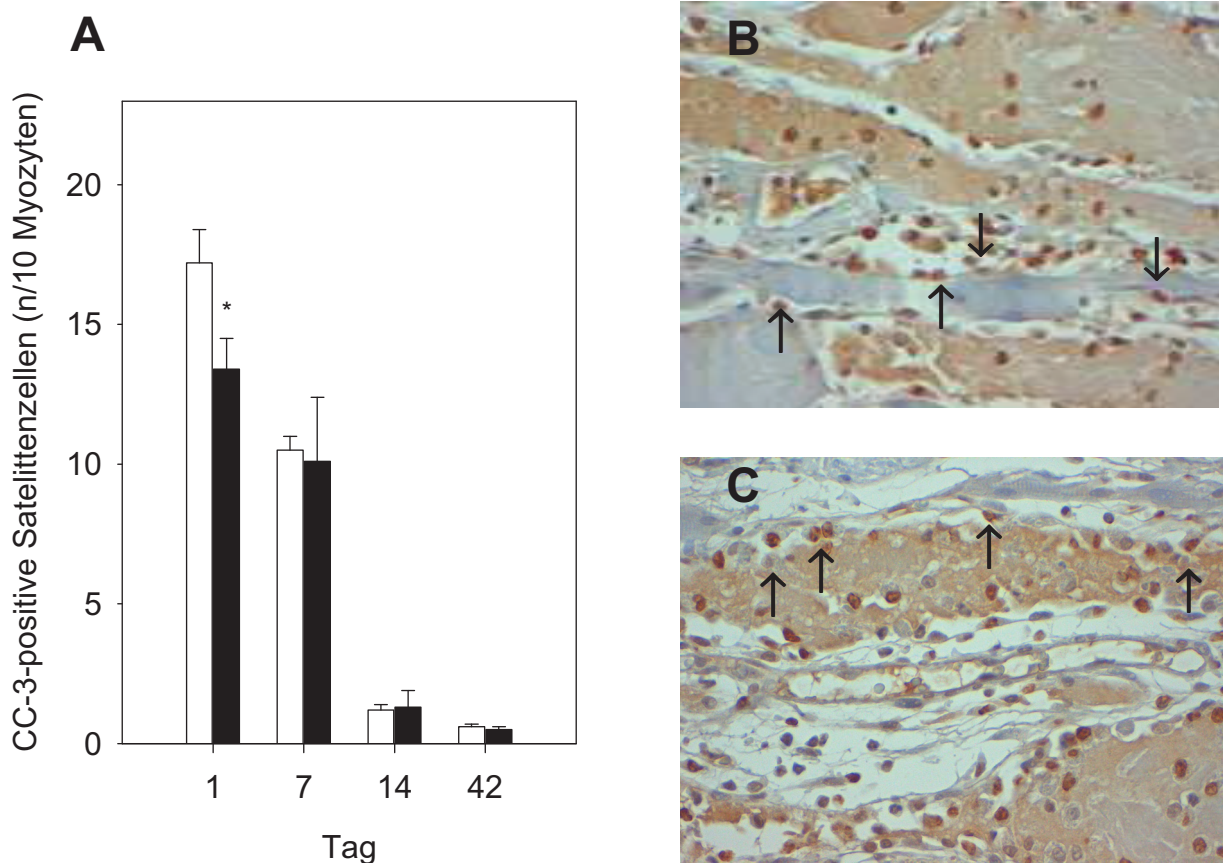


Abbildung 24: Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen mittels "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung. A: Anzahl "Cleaved"-Caspase-3-positiver Satellitenzellen, Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). (B) und (C) sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von "Cleaved"-Caspase-3-positiven Satellitenzellen (Pfeile) am Tag 1 nach Trauma, 20x Vergrößerung. B: Kontrollgruppe und C: EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

Die Anzahl apoptotischer Skelettmuskelzellen war unter EPO-Behandlung am Tag 1 nach Trauma mit $13,4 \pm 1,1$ Zellen pro 10 Myozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $17,2 \pm 1,2$ Zellen pro 10 Myozyten um ca. 20% deutlich geringer ausgeprägt. Im weiteren Verlauf erholte sich das Skelettmuskelgewebe in beiden Gruppen mit dem konsekutiven Abfall der Anzahl apoptotischer Skelettmuskelzellen bis Tag 42 nach Trauma.

6.4.2 Nachweis proliferationsaktiver Skelettmuskelzellen mittels BrdU/Laminin-Doppelfärbung

Nach dem Kontusionstrauma wurde in beiden Gruppen mittels der immunhistochemischen BrdU/Laminin-Doppelfärbung eine hohe Anzahl proliferierender

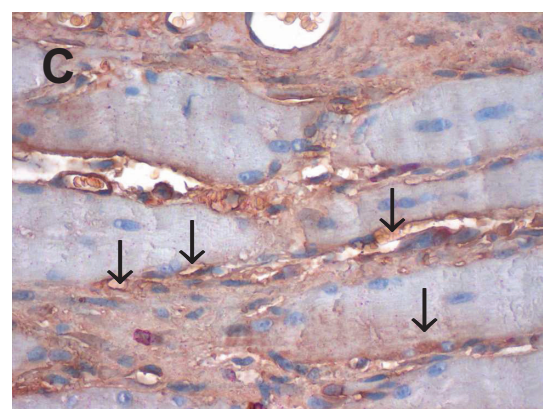
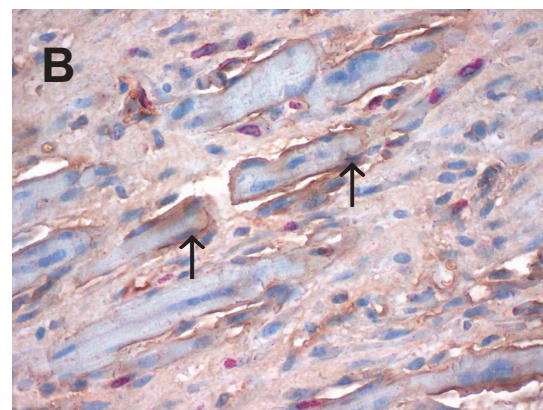
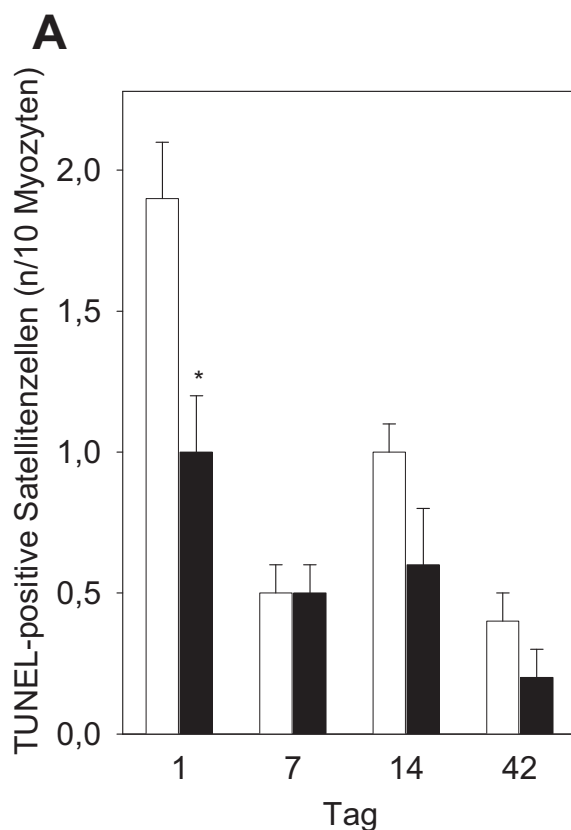


Abbildung 25: Doppelimmunhistochemische Untersuchung des *M. soleus* mittels BrdU/Laminin-Methode. A: Anzahl BrdU-positiver Satellitenzellen, Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). (B) und (C) sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von BrdU-positiven

*Satellitenzellen (Pfeile) am Tag 1 nach Trauma, 20x Vergrößerung. B: Kontrollgruppe. C: EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.*

Satellitenzellen mit konsekutiv abnehmenden Zahlen bis Tag 42 beobachtet (Abbildung 25). Es ist zu betonen, dass EPO einen signifikanten Anstieg der Anzahl proliferierender Satellitenzellen im Sinne der Skelettmuskelregeneration um nahezu 50% im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Tieren am Tag 1 nach Trauma bewirkte. So lag die Anzahl der proliferierenden Satellitenzellen am Tag 1 nach Trauma in der Kontrollgruppe bei ca. $3,8 \pm 0,3$ Zellen pro 10 Myozyten, während die Anzahl der proliferierenden Satellitenzellen in der EPO-Gruppe am Tag 1 nach Trauma einen Mittelwert von ca. $8,1 \pm 0,8$ Zellen pro 10 Myozyten erreichte.

6.4.3 Nachweis intestitieller Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung

Mittels Sirius-Red-Färbung konnte in beiden Gruppen ein kontinuierlicher Anstieg an Kollagen im M. soleus nach dem Kontusionstrauma im Sinne der Ausbildung von Narbengewebe beobachtet werden (Abbildung 26). So nahm der Anteil an Kollagen im gesamten Skelettmuskelgewebe in der Kontrollgruppe von ca. 1 auf 14% innerhalb der 42 Tage Regeneration zu. Im Gegensatz dazu war unter EPO-Behandlung die Bildung von Narbengewebe geringer ausgeprägt und erreichte nach 42 Tagen lediglich ca. 9%.

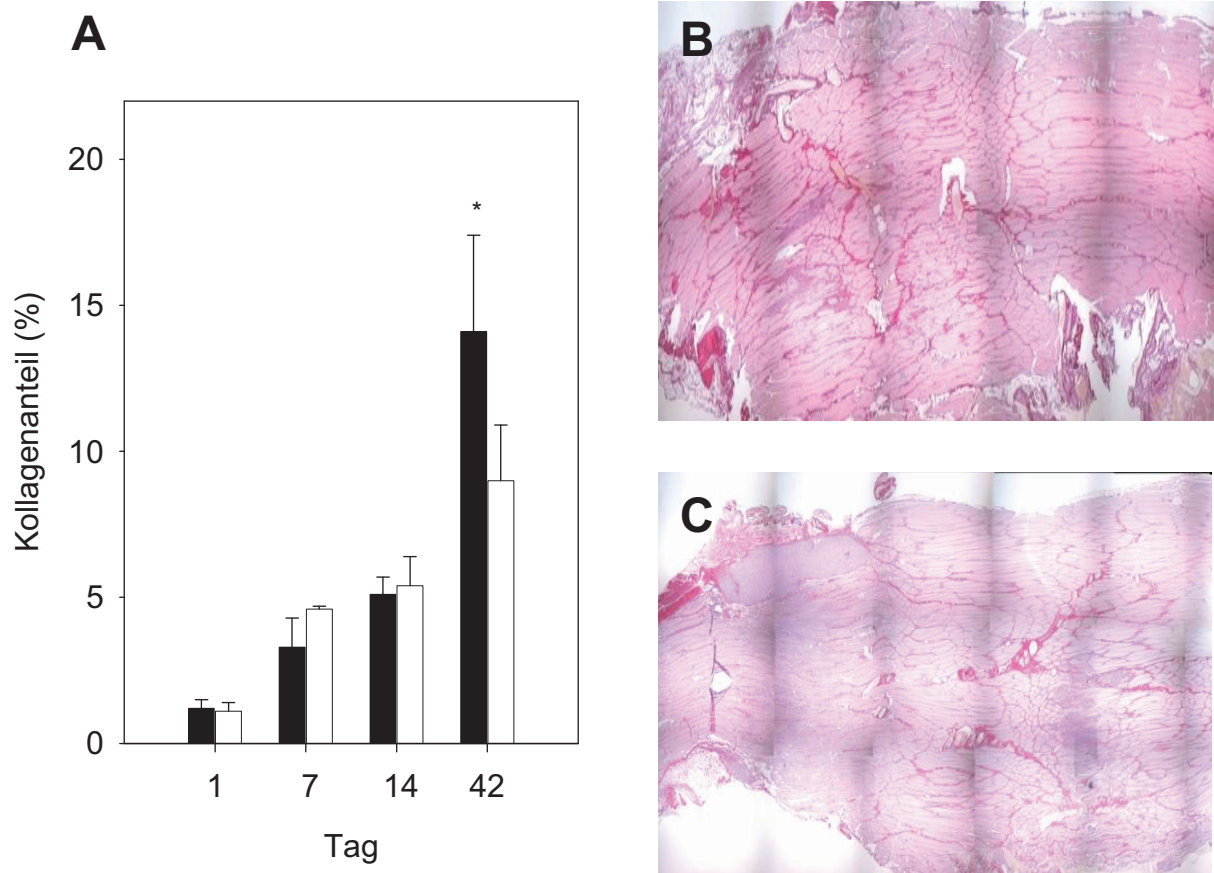


Abbildung 26: Nachweis intestinieller Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung. A: Quantitative Analyse des Sirius-Red-positiven Kollagenanteils, Sirius-Red-Färbung, Kontrollgruppe (weiß, $n = 5$) und EPO-Gruppe (schwarz, $n = 5$). (B) und (C) sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Sirius-Red-positiven Kollagenfasern am Tag 1 nach Trauma, 100x Vergrößerung. B: Kontrollgruppe und C: EPO-Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

6.5 Molekularbiologischer Nachweis der EPOR-Genexpression mittels RT-PCR

Zur Bestimmung der optimalen Anleaining-Temperatur für den Nachweis der EPOR-Genexpression im Skelettmuskelgewebe mittels RT-PCR wurde die EPOR-Amplifikation zunächst in zwei Skelettmuskelproben nach dem Kontusionstrauma (M1 und M2) sowie in der Leerkontrolle (RT-Kontrolle) und im Pankreasgewebe der Ratte als Positivkontrolle bei 52, 60 und 63°C untersucht (Abbildung 27A).

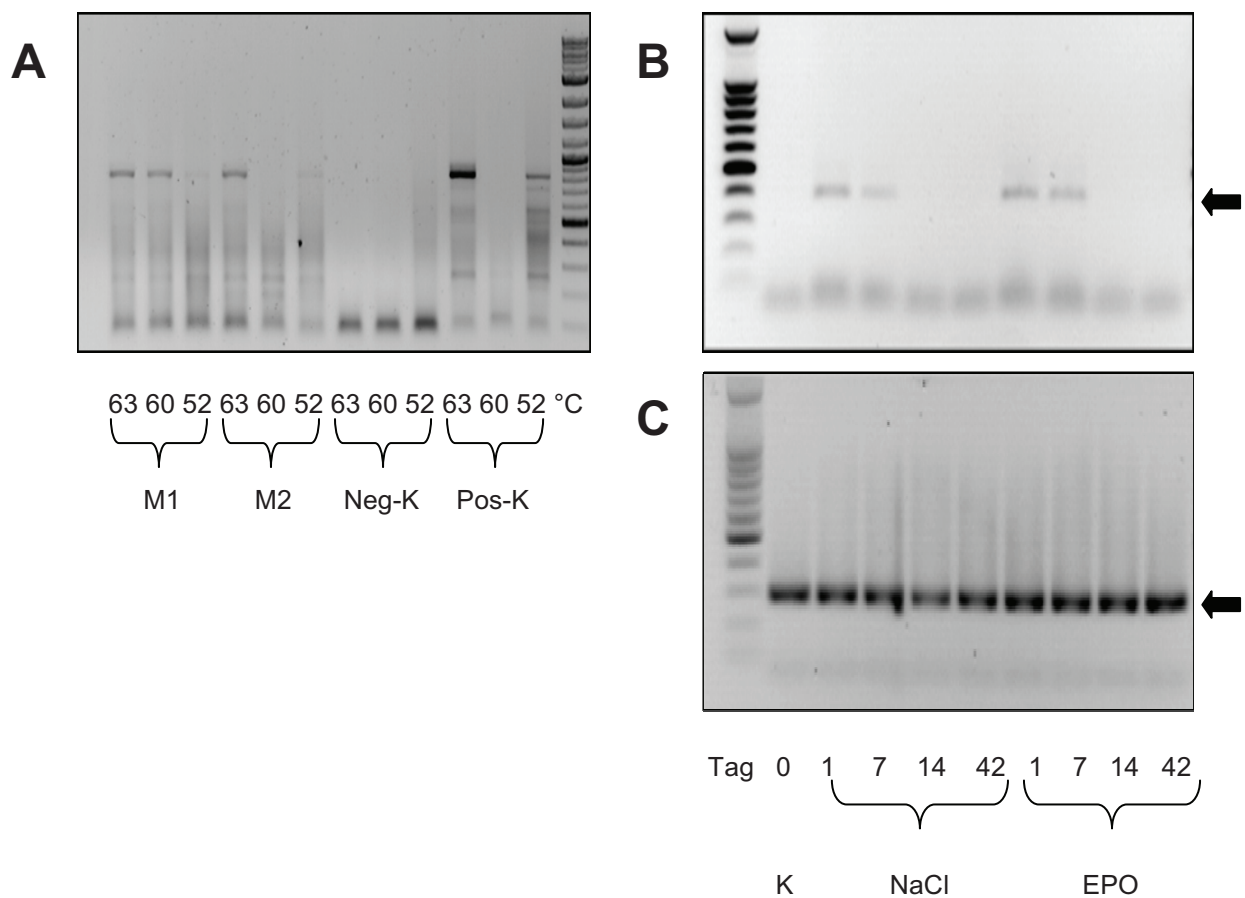


Abbildung 27: Molekularbiologischer Nachweis der EPOR-Genexpression mittels RT-PCR; A: Nachweis der EPOR-Genexpression bei verschiedenen Anleantemperaturen; B: Nachweis von EPOR-Genexpression (Pfeil) im *M. soleus* der EPO- und Kontrollgruppe; C: Nachweis von GAPDH-Genexpression (Pfeil) im *M. soleus* der EPO- und Kontrollgruppe.

Eine positive EPOR-Bande zeigte sich bei der Anleantemperatur von 63°C im Pankreas und in beiden Muskelproben (M1 und M2). Wie erwartet, war in der RT-Kontrolle, die als Negativkontrolle diente, bei keiner Anleantemperatur eine EPOR-Bande zu ermitteln. Da die beste Amplifikationsausbeute in beiden Muskelproben (M1 und M2) bei einer Anleantemperatur von 63°C zu beobachten war, wurde diese als Anleantemperatur für die nachfolgende RT-PCR gewählt. Als Expressionskontrolle diente der Nachweis der GAPDH-Amplifikation. Wie Abbildung 27C zeigt, ist eine GAPDH-Bande in beiden Gruppen zu allen Beobachtungszeitpunkten zu erkennen. Das Kontusionstrauma induzierte in beiden Gruppen (NaCl und EPO) einen erhöhten Umsatz von EPOR. Auf der Abbildung 27B ist eine EPOR-Bande in beiden Gruppen am Tag 1 und 7 nach dem Trauma zu sehen. Im Gegen-

satz dazu konnte keine EPOR-Expression im Skelettmuskelgewebe ohne Kontusionstrauma nachgewiesen werden.

7 DISKUSSION

7.1 Diskussion experimenteller Modelle

7.1.1 *In vitro* Modell der Apoptoseinduktion

Die *in vitro* Untersuchungen stellen eine Erfolg versprechende Methode zur Ergänzung der *in vivo* gewonnenen Daten dar. Zwar können die Bedingungen einer Zellkultur die Komplexität der Vorgänge in einem Organismus nicht wiedergeben, jedoch sind *in vitro* Untersuchungen besonders für Experimente, welche das Wachstum, die Differenzierung und den Tod von Zellen analysieren, gut geeignet. Die Auswahl der Zelllinie erfolgte vor dem Hintergrund, das *in vivo* Modell auf die *in vitro* Untersuchungen für Skelettmuskelzellen übertragen zu können. Es gibt zwei myogene Zelllinien, die vom Skelettmuskelgewebe der Ratte stammen. Im Gegensatz zu den durch Karzinogene modifizierten L6-Zellen (ATCC CRL-1458) weisen die L8-Myoblasten typische Eigenschaften myogener Progenitorzellen auf und erfüllen somit die Voraussetzungen, die an eine Zelllinie in der gegenwärtigen Studie gestellt werden. Sie synthetisieren eine Reihe für das intakte Skelettmuskelgewebe charakteristischer Proteine und können zu mehrkernigen Myotuben fusionieren. Es wurde eine EPOR-Genexpression in den L8-Myoblasten nachgewiesen [Arbeitsgruppe von Bittorff im Institut für Biochemie an der Universität Rostock, bisher nicht publiziert]. Die L8-Zelllinie wächst nicht zytokinabhängig. Damit kann der Einfluss des Serums als wesentlicher Überlebensfaktor unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Apoptoseinduktion beschrieben worden. So kann die Apoptose durch DNA-schädigende physikalische Einflüsse (z.B. UV- oder γ -Strahlung), Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin, Doxorubicin, Bleomycin, Paclitaxel, Cytocholasin B) [Galmarini et al., 2003; Wang, 2000], Hormone und Cytokine (TNF, Tamoxifen, Glucokortikoide) [Rath und Aggarwal, 1999] ausgelöst werden.

In der gegenwärtigen Studie wurde zur Apoptoseinduktion der L8-Myoblastenkultur das Serum entzogen. Eine Erniedrigung des Serumgehaltes führt zu einem Anhalten der Wachstums- und Differenzierungsprozesse in einer Zellkultur [Königsberg, 1971; Linkhart et al., 1982; Slack und Higgins, 1996; Yoshiko et al., 1996]. Die Lebensfähigkeit der Zellpopulationen erniedrigt sich schnell, wenn sie in ein serumarmes Medium umgesetzt werden. Die Untersuchungen von Amsterdam

und Duttaroy an Primärkulturen der Granulosazellen [Amsterdam et al., 1996] und an kultivierten 3T3- Mausfibroblasten [Duttaroy et al., 1997] haben erstmalig gezeigt, dass die Apoptose durch Serumentzug ausgelöst werden kann.

Mittlerweile ist die Methode der Apoptoseinduktion mittels Serumentzug eine etablierte Methode. Sie wurde bei Zellen unterschiedlichen Ursprungs wie neuronalen Zellen [Ahlemeyer und Krieglstein, 1997; Eves et al., 1998], β -Zellen des Pankreas [Mizuno et al., 1998], glatten Muskelzellen der Blutgefäße [Aoki et al., 1997], Endothelzellen [Karsan et al., 1997], Sertolizellen [Pognan et al., 1997] und ovariellen Zellen [Tilly et al., 1992; Markström et al., 2002] erfolgreich angewendet.

7.1.2 *In vivo* Modell der Traumainduktion

Experimentelle Untersuchungen zu traumatischem Skelettmuskelschaden erfordern aufgrund der komplexen Pathomechanismen Beobachtungen am intakten Organismus. Gerade die funktionellen, hämodynamischen und mikrozirkulatorischen Parameter können nur in *in vivo* Untersuchungen erfasst werden.

Zur *in vivo* Untersuchung der Regeneration des Skelettmuskels nach dem Trauma können sowohl unterschiedliche Tierspezies als auch verschiedene Gruppen und Typen von Skelettmuskulatur gewählt werden. In wissenschaftlichen Untersuchungen zum Skelettmuskelgewebe wurden der M. sartorius des Frosches [Tymel und Groom, 1980; Dietrich und Tymel, 1992] und der Katze [Henrich und Johnson, 1978; Sullivan und Johnson, 1981], der M. cremaster des Hamsters [Klitzman und Duling, 1979] und der Ratte [Hutchins et al., 1974; Lee, 2005], der M. tibialis anterior des Hamsters [Damon und Duling, 1987], der M. extensor digitorum longus der Ratte [Tymel et al., 1999], sowie der M. gracilis digitorum longus [Honig et al., 1977] und der M. retractor [Swain und Pittman, 1989] des Hamsters verwendet.

Aufgrund der hohen Invasivität können die Experimente dieser Studie nicht am Menschen durchgeführt werden, so dass auf etablierte Tiermodelle zurückgegriffen werden muss. Die Verwendung des M. soleus der Ratte zur Untersuchung des traumatischen Muskelschadens wurde in vielen Studien beschrieben [Potter et al., 1993; Pudupakkam et al., 1998; Tymel et al., 1999; Mittlmeier et al., 2003; Badhwar et al., 2004; Gierer et al., 2004; Schaser et al., 2005]. Anatomische Verhältnisse der Muskelkompartimente der Ratte zeigen eine große Ähnlichkeit zum menschlichen Unterschenkel. Der Muskelansatz, -ursprung, die nervale und vaskuläre Versorgung sind

vergleichbar, wodurch eine valide Übertragbarkeit auf den Menschen möglich ist [Mittlmeier et al., 2003].

Die meisten tierexperimentellen Modelle zur traumatischen Weichteilschädigung beinhalten die Erzeugung eines geschlossenen Traumas. Sie nutzen die Übertragung der kinetischen Energie eines Gewichtes auf das Zielgewebe. Ein durch Federkraft angetriebener Metallbolzen oder ein durch die Schwerkraft beschleunigtes herunterfallendes Gewicht definierter Größe können im Gewebe jedoch nur ein „low energy trauma“ hervorrufen. Der Skelettmuskel erholt sich in Kürze von alleine und seine kontraktile Funktionen werden vollständig wiederhergestellt.

Bei der Anwendung höherer Energien zur Erzeugung eines geschlossenen Traumas entwickelt sich ein Kompartmentsyndrom und macht die Untersuchung der Regenerationskapazität der Skelettmuskulatur sehr schwierig. Im Gegensatz dazu verursacht das in dieser Studie angewandte Modell des offenen Skelettmuskeltraumas [Matziolis et al., 2006] eine schwere offene Skelettmuskelverletzung, die den komplexen Verletzungen ohne spontane restitutio ad integrum entspricht.

Die Untersuchungen der posttraumatischen Regeneration der quergestreiften Muskulatur sind u.a. unter Anwendung der Rückenhautkammer möglich. Der Vorteil von Rückenhautkammermodellen zur Analyse der Mikrozirkulation quergestreifter Muskulatur liegt in der Möglichkeit der Durchführung von Sequenz- und Verlaufsuntersuchungen bis zu mehreren Wochen am wachen und nicht anästhesierten Tier. Der Hautmuskel unterscheidet sich jedoch von der quergestreiften Muskulatur der Extremität, da er eine andere Zusammensetzung der Muskelfasern, Kontraktilität und Kapillardichte aufweist.

In der vorliegenden Studie konnte durch Modifikation der Computer-assoziierten Technik eine standardisierte offene Skelettmuskelverletzung mittels einer instrumentierten Klemme im Sinne eines Kontusionstraumas der Extremitäten erzeugt werden, welche realitätsnah einen traumatisch bedingten Skelettmuskel-schaden simuliert. Der Kontusionvorgang wurde über eine Zeit/Weg-Änderungskurve aufgezeichnet, so dass die Kraftanwendung zu jeder Applikationszeit stets nachvollziehbar und kontrollierbar war.

Die chirurgische Präparation zur intravitale Untersuchung der Skelettmuskulatur macht eine Narkose der Tiere notwendig [Heap et al., 2006]. Das Anästhetikum Pentobarbital wird nach intraperitonealer Injektion resorbiert und anschließend von der Leber verstoffwechselt [Hoetzel et al., 2006]. Während der Narkose kommt es zur

Vasodilatation, wodurch Körpertemperatur und die basale metabolische Umsatzrate reduziert werden [Craft und Leitl, 2006]. Aufgrund der Gefahr einer Hypothermie des Versuchstieres mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und der Funktion der Skelettmuskulatur erfolgte eine permanente Kontrolle der Körpertemperatur während des gesamten Narkosezeitraumes, welche über eine rektale Sonde gewährleistet wurde. Ein Abkühlen des Tieres wurde durch Lagerung auf einer Heizplatte und Wärmen entsprechend der Rückkopplung über die rektale Sonde vermieden.

Der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz wurden mittels Narkosevertiefung innerhalb festgesetzter Grenzen gehalten, die es ermöglichen trotz individueller Abweichungen sicherzustellen, dass sie keinen signifikanten Einfluss auf die Hauptzielvariablen hatten. Ein Effekt auf die mikrozirkulatorischen, biomechanischen und histomorphologischen Ergebnisse ist somit nahezu auszuschließen.

7.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

7.2.1 7AAD-Färbung und FACS-Analyse

Die Apoptose ist ein phylogenetischer Prozess, der sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus für die Gewebemhomöostase eine entscheidende Rolle spielt [Kerr et al., 1972; Steller, 1995; Nicholson, 2000]. Es handelt sich um einen aktiven, energieabhängigen Prozess mit Erhalt der Zellmembran, aber typischer Fragmentierung der DNA [Thornberry und Lazebnik, 1998; Adams und Cory, 1998; Ashkenazi und Dixit, 1998; Evan und Littlewood, 1998]. Die Apoptose geht mit Zellschrumpfung, Schädigung der Mitochondrien, Kondensierung des Chromatins, Fragmentierung der DNA und Bildung von sogenannten "apoptotic bodies" einher [Hacker et al., 2000; Schwartz und Osborne, 1995; Lincz, 1998]. Störungen der Mikrozirkulation, die im Rahmen eines traumatischen Muskelschadens auftreten, führen zu prolongierter Gewebehypoxie und damit Apoptose der Muskelzellen [Fink und Cookson, 2005; Lauber et al., 2004; Hengartner, 2000; Thompson, 1995]. Das Apoptosesignal aktiviert über Signaltransduktionskaskaden ein komplexes intrazelluläres Netzwerk, bestehend aus Cytochrom C [Krippner et al., 1996; Bradham et al., 1998], proteolytischen Enzymen wie Caspasen [Neviere et al., 2001] sowie Proteinen der Bcl2-Familie. In der letzten Phase der Apoptose kommt es zur Degradation der DNA. *In vivo*, aber nicht unbedingt *in vitro*, werden diese sterbenden Zellen erkannt und von anderen Zellen phagozytiert [Vaux und Strasser, 1996].

In der Signaltransduktion der Apoptose spielen die Proteine der Bcl2-Familie eine bedeutende Rolle. Röntgenkristallographische Studien implizieren, dass die Bcl2-Proteine ionenselektive Poren in Membranen bilden [McDonnell et al., 1999]. Diese Beobachtung erklärt die veränderte Permeabilität der Zellmembranen apoptotischer Zellen und ihre Anfärbbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7AAD [Adams und Cory, 1998; Blink et al., 1999]. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, die Apoptoserate in Zellsuspensionen zu bestimmen. Die durch Apoptose induzierten Veränderungen in der Zellmorphologie, wie z.B. Zellgröße und Granularität, können in der Durchflusszytometrie erfasst werden. Hierfür können Kombinationen aus Antikörper und Farbstoff (Annexin V/FITC) oder Farbstoffe (7AAD, Propidiumjodid) verwendet werden, die eine von der Integrität und Zusammensetzung der Plasmamembran abhängige Färbung gestatten.

Annexin V ist ein 35-36kD- Ca^{2+} -abhängiges, phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. In vitalen Zellen ist Phosphatidylserin asymmetrisch in den Zellmembranen verteilt; dabei enthält die innere Schicht anionisch geladene Phospholipide und die äußere Schicht neutrale Phospholipide [Zachowski, 1993]. In der Apoptose kommt es sehr früh zu einer Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der inneren in die äußere Schicht der Plasmamembran, wodurch Phosphatidylserin der extrazellulären Umgebung gegenüber exponiert wird [Martin et al., 1995]. Diese veränderte Phospholipidanordnung scheint bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen [Fadok et al., 1992]. FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markiertes Annexin V bindet an Phosphatidylserin apoptotischer Zellen [van Engeland et al., 1996] und kann so mittels Durchflusszytometrie [Vermees et al., 1995] nachgewiesen werden.

Die Anwendung von FITC/Annexin V für adhärent wachsende Zellkulturen wird kontrovers diskutiert, da nach Meinung einzelner Autoren bereits die Ablösung der Zellen vom Kulturboden mittels Trypsin zur Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembran führt, also falsch positive Ergebnisse erzeugt [Sgonc und Wick, 1994]. Für 7AAD sind im Gegensatz zu Annexin V keine Einschränkungen dieser Art bei der Untersuchung adhärent wachsender Zellen beschrieben worden.

Neben der Analyse der Zellen nach morphologischen Kriterien bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit einer schnellen quantitativen Analyse von großen Zellpopulationen anhand ihres DNA-Gehaltes. Bestimmte Farbstoffe lagern sich stochiometrisch an die DNA an. Über den Gehalt des Farbstoffes kann dann der Gehalt an DNA errechnet werden. Heute ist eine Vielzahl von DNA-Farbstoffen auf dem Markt. Man unterscheidet DNA-spezifische Farbstoffe, die sich an die AT- oder GC-reiche Regionen der DNA anlagern, und unspezifische Farbstoffen die sowohl DNA als auch RNA anfärben und eine Vorbehandlung mit RNase nötig machen. Im Gegensatz zu den unspezifischen DNA-Farbstoffen wie Propidiumiodid, Mycinen z. B. Chromomycin 3, Cyan-Farbstoffen oder SYTO-Farbstoffen ist der in der vorliegenden Arbeit benutzte Farbstoff 7AAD DNA-spezifisch. So ist keine Vorbehandlung mit RNase nötig. Der benutzte DNA-Farbstoff 7AAD ist sehr gut geeignet, eine quantitative DNA-Analyse durchzuführen. Aus den vorgenannten Gründen wurde der Nachweis apoptotischer Zellmuskelzellen mit 7AAD-Färbung mittels FACS-Analyse in dieser Arbeit favorisiert.

7.2.2 Biomechanik

Statische und dynamische kontraktile Kräfte des Skelettmuskelgewebes sind ein wichtiger Gegenstand biomechanischer Untersuchungen. Der physiologische Begriff von Kraft lässt sich als die Fähigkeit des Nerv-Muskel-Systems, durch Muskelkontraktion Widerstände zu überwinden bzw. ihnen entgegenzuwirken, definieren [Tidball und Daniel, 1986].

Die Ausprägung der Maximalkraft wird von mehreren individuellen Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen beispielsweise der Muskelfaserquerschnitt, die Muskelfaserzahl, -struktur und -länge. Der Zugwinkel und die muskuläre Energiebereitstellung sind weitere Faktoren, die die Muskelkraft beeinflussen.

Eine sichere Methode zur exakten Muskelkraftmessung, die hinsichtlich der Kriterien der erzielten Messgenauigkeit einheitlich einsetzbar ist, stellt die Erfassung der maximalen Muskelkraft über isometrische Kontraktion mittels des Experimentaria-Messsystems dar. Der Versuchsaufbau zur isometrischen Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften des M. soleus wurde in dem Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte von Matziolis und seinen Mitarbeitern erstmals erstellt [Matziolis et al., 2005] und im Rahmen dieser Studie übernommen.

Die isometrische Kontraktionsform bietet gegenüber den dynamischen Kontraktionsformen einen entscheidenden Vorteil: durch die Ausschaltung der dynamischen Komponente wird eine isolierte Messsituation geschaffen, in der die Variablen Messposition, Schnelligkeit der Gelenkbewegung, Gelenkwinkel und Muskellänge konstant bleiben. Isometrische Messungen erreichen hierdurch einen hohen Grad an Standardisierung und Reliabilität [Tidball und Daniel, 1986].

Die Erregung der Muskeln erfolgt durch Aktionspotentiale der zugehörigen Nerven, die über neuromuskuläre Übertragung an den Endplatten Muskelaktionspotentiale auslösen. Für die einzelne Muskelfaser gilt hierbei die „Alles-oder-Nichts-Regel“. Unterschwellige Reize lösen kein Aktionspotential aus. Sobald aber eine bestimmte Reizschwelle überschritten wird, entsteht ein Aktionspotential, das eine maximal starke Einzelzuckung auslöst, die auch durch Reizverstärkung nicht weiter gesteigert werden kann [Tidball und Daniel, 1986].

Die Kraftentwicklung eines Muskels wird über die Frequenz der Aktionspotentiale in den zuständigen Motoneuronen bzw. Nerven gesteuert. Mit Hilfe dieser Frequenzmodulation ist eine Steuerung der entwickelten Muskelkraft durch das Nervensystem möglich. Die Zunahme der Kraft erfolgt über einen Anstieg in der Erregungsfrequenz, indem sich die Kräfte der Einzelkontraktionen summieren. Die maximale Kraftentwicklung ist bei der Fusionsfrequenz im Tetanus-Modus zu beobachten [Tidball und Daniel, 1986].

Quantitative Messungen für Einzelzuckung und Tetanuskontraktion dienen der Erfassung der maximalen Muskelkraft und der Beurteilung der funktionellen Restauration des traumatisch geschädigten Skelettmuskels nach i.m. Applikation von EPO bzw. Kochsalz.

Die absoluten Werte der Muskelkräfte sind dabei nur von einer eingeschränkten Aussagekraft, da ihre Beeinflussung durch individuelle Variablen des einzelnen Tieres nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Die Berechnung der relativen Werte der maximalen Muskelkraft minimiert nahezu vollständig den Einfluss individueller Schwankungen.

Als physiologischer Sollwert diente die maximale Kraft des M. soleus der unbehandelten Gegenseite des Versuchstieres. Durch den Vergleich der Kraftentwicklung des traumatisierten M. soleus mit der kontralateralen gesunden Seite des gleichen Tieres konnten prozentuelle Abweichungen vom Sollwert erfasst werden, welche die Beurteilung der funktionellen Regeneration der untersuchten Skelettmuskulatur ermöglichten.

7.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Eine Reihe von *in vivo* Modellen zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur sind durch eine schnelle Präparation der anatomischen Strukturen gekennzeichnet [Damon und Duling, 1987; Klitzman und Duling, 1979; Tysl und Groom, 1980; Tysl und Budreau, 1991; Dietrich und Tysl, 1992]. Der Nachteil dieser Modelle liegt in der Beeinflussung mikrohämodynamischer Parameter, wie der nutritiven Perfusion und der Zellinteraktionen, durch das präparationsbedingte chirurgische Trauma. Durch die in dieser Studie angewandte atraumatische Präparation des M. soleus wurde eine mögliche Beeinträchtigung der Mikrozirkulation des Muskels minimiert.

Die mikrochirurgische Präparation des M. soleus zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie erfolgte in Anlehnung an die von Tysl und Budreau [Tysl und Budreau, 1991] beschriebene Technik. Die atraumatisch präparierte Skelettmuskulatur zeigt physiologisch perfundiertes Gewebe mit intakter Mikrozirkulation. Präparationsbedingte Zeichen von Inflammation, wie z.B. die Akkumulation von Leukozyten oder das Auftreten von apoptotischen Zellen, werden bei sorgfältiger Durchführung der Präparation minimiert [Tysl und Budreau, 1991].

Die vorliegende Untersuchung zur Analyse der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur nach einem traumatischen Muskelschaden wurde an beatmeten Ratten unter intraperitonealer Narkose durchgeführt. Nach Katheteranlage und Präparation des M. soleus wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen. Mit Hilfe dieser Technik erfolgte eine quantitative Analyse mikrozirkulatorischer Parameter in den Kapillaren und postkapillaren Venolen der Skelettmuskulatur. Nach Applikation von spezifischen Fluoreszenzmarkern konnten individuelle Aspekte, wie z.B. das Fließverhalten von Leukozyten und das Auftreten apoptotischer Skelettmuskelzellen, quantitativ erfasst werden.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte Methode zur Untersuchung mikrovaskulärer, zellulärer und molekularer Phänomene unter physiologischen und pathologischen Bedingungen [Menger et al., 1999]. Mit ihrer Hilfe wurden die Aspekte der Inflammation [Smedegard et al., 1985], der Angiogenese [Menger et al., 1990], der Organentwicklung [Bigbauer et al., 1995], sowie ophtalmologische [Tozer et al., 2001], hämatologische [Cheung et al., 2001] und immunologische [Sumen et al., 2004] Prozesse an verschiedenen Gewebe näher charakterisiert.

Im Gegensatz zu anderen Verfahren zur Beurteilung der Mikrozirkulation, wie der Mikrosphärentechnik [Zwissler et al., 1991], Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs [Conzen et al., 1988; Vollmar et al., 1992], Xenon-Clearance-Technik [Hendel, 1983], photochemische Pletysmographie [Webster und Patterson 1976], Thermographie [Saumet et al. 1986], Laser-Dopler-Flowmetrie [Vollmar et al., 1999; Chaves-Cartaya et al., 1995], Farbstofftechniken [McKee Olds und Stafford, 1930; Elias und Petty, 1953] oder Techniken zum Anfertigen von Mikrokorrosionspräparaten [Forsman und McCormack, 1992], die nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation erlauben, ermöglicht die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine direkte Visualisierung eines Skelettmuskels am intakten Organismus.

Die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel kann anhand der Merkmale der Margination, Adhäsion und Migration [Springer, 1994] differenziert betrachtet werden („roller“ bzw. „sticker“). Mittels der Intravitalmikroskopie können dynamische Parameter der Mikrozirkulation des untersuchten Muskelgewebes, wie funktionelle Kapillardichte und Gefäßdurchmesser, charakterisiert werden. Die Anfärbung des Blutplasmas und damit die Kontrastierung des mikrovaskulären Netzwerkes erfolgte mit dem hochmolekularen, FITC-markierten Dextran.

In den Modellen der Rückenhautkammer des Hamsters wurden protektive Effekte dieses Plasmamarkers auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und funktionelle Kapillardichte beobachtet [Steinbauer et al., 1997]. In der biochemischen Forschung ist Dextran auch als Radikalfänger in Abhängigkeit zum Molekulargewicht bekannt, wobei insbesondere niedermolekulares Dextran als protektiv gilt. Steinbauer und Mitarbeiter wiesen einen positiven Einfluss von niedermolekularem Dextran (Molekulargewicht 60000 Da) auf die funktionelle Kapillardichte in der Reperfusionphase nach prolongierter Ischämie der Skelettmuskulatur nach [Steinbauer et al., 1998].

Im Gegensatz zum niedermolekularen Dextran zeigt das in dieser Studie angewandte hochmolekulare Dextran nur eine geringe Wirkung auf die funktionelle Kapillardichte [Laurent et al., 1976]. In der hier vorliegenden Studie erhielten die beiden Untersuchungsgruppen hochmolekulares FITC-Dextran in gleicher Menge und Weise appliziert. In der applizierten Form sind Veränderungen der Blutviskosität nahezu vollständig auszuschließen [Steinbauer et al., 1998].

Die Markierung der Leukozyten erfolgte mit Rhodamin 6G. Bereits ab einer Dosierung von > 0,1 mg/kg KG bei Ratten, > 0,2 mg/kg KG bei Hamstern und > 0,3 mg/kg KG bei Mäusen wird ein großer Teil der Granulozyten (99,9%), der Monozyten

(97,0%) und der Lymphozyten (75,2%) angefärbt [Baatz et al., 1995]. Auf Grund der hohen Spezifität und Sensitivität dieser Markierungsmethode kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass eine Visualisierung des größten Teils der Leukozyten *in vivo* mit Rhodamin 6G erfolgt.

Die *in vivo*-Darstellung apoptotischer Zellen erfolgte durch Bisbenzimid-Färbung. Bisbenzimid bindet in allen Zellkernen an adenin- und thymidinreiche Regionen der DNA. Die genaue Differenzierung apoptotischer Zellen ist anhand der morphologischen Kriterien der Apoptose, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation möglich [Westermann et al., 1999].

Während der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie kann es zur Auslösung phototoxischer Effekte im untersuchten Gewebe kommen. Gewöhnlich entstehen sie direkt durch Überwärmung bei hoher Intensität oder langer Einwirkdauer des Lichtes oder indirekt durch Anregung der verwendeten Fluorochrome [Povlishock et al., 1983]. Dabei werden die Doppelbindungselektronen bzw. nichtbindenden Elektronen in antibindende Energieniveaus gehoben. Die Störung der Elektronenverteilung verursacht Schädigungen im untersuchten Gewebe. Zur Vermeidung der phototoxischen Effekte erfolgte eine zeitliche Begrenzung der Fluoreszenzlichtexposition des M. soleus auf insgesamt 15 Minuten [Rosenblum und El-Sabbam, 1978; Reed, 1988; Gawlowski et al., 1989; Saetzler et al., 1997; Friesenecker et al., 1994]. Zusätzlich erfolgte die Auswertung der Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie offline und erlaubte eine zusätzliche Beschränkung der direkten Fluoreszenzlichtexposition auf ein Minimum.

7.2.4 Histomorphologie

7.2.4.1 Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen mittels TUNEL-Methode und "Cleaved"-Caspase-3/Laminin-Doppelfärbung

Zum Nachweis der Apoptose dienen eine Reihe qualitativer und quantitativer Methoden. Unter Verwendung verschiedener Nachweismethoden gelingt die Detektion apoptotischer Zellen anhand der Chromatinkondensation und der DNA-Fragmentation, der Erfassung der Caspaseaktivität, der Darstellung der mitochondrialen Membranpermeabilität [Bedner et al., 1999, Stein et al., 2001], der Cytochrom-C-Freisetzung [Smyth et al., 2002], der Translokation des Phosphatidylserins sowie der Detektion von Apoptose regulierenden Oberflächenre-

zeptoren (z.B. fas/TNF) und Proteinen (z.B. Bcl-2). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode. Bei der TUNEL-Methode überträgt die terminale Transferase Digoxigenin- oder Fluoreszeinkomplexe markierte Nukleotide in die gesplittete DNA, die anschließend über die Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden [Sgonc und Wick, 1994].

Eine alternative Detektion der DNA-Strangbrüche ist mit einer DNA-Polymerase („nick“-Translokation) möglich. Der Nachteil dieser Technik ist ihre geringere Sensitivität und Spezifität, denn die „nick“-Methode benötigt im Gegensatz zur terminalen Transferase überhängende DNA-Enden, an die Nukleotide in komplementärer Weise eingebaut werden [Gold et al., 1994; Bortner et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Unteregger 1997; Stein et al., 2001; Smyth et al., 2002].

Die „Cleaved“-Caspase-3-Färbung ist eine gut etablierte, sensitive immunhistochemische Methode zum Apoptosenachweis. Durch die proteolytische Aktivität des Enzyms „Cleaved“-Caspase-3 wird die für den Zellzyklus wichtige Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zerstört (Patel et al., 1996). Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen mit der „Cleaved“-Caspase-3-Färbung dienten der Erfassung der Apoptoserate im Skelettmuskelgewebe im Sinne des Ausmasses der Gewebeschädigung.

7.2.4.2 Nachweis proliferationsaktiver Satelittenzellen mittels BrdU/Laminin-Doppelfärbung

Die DNA-Synthesephase (S-Phase) stellt einen begrenzten Zeitabschnitt innerhalb des Zellzyklus dar [Howard und Pelc, 1951]. Während der S-Phase verdoppelt die Zelle ihre DNA, was eine wichtige Voraussetzung für die darauffolgende Mitose darstellt. Die BrdU-Methode nutzt die Inkorporation und den immunzytochemischen Nachweis von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) zur Detektion proliferierender Zellen. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, das in der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv anstelle von Thymidin in die Zell-DNA eingebaut wird [Nowakowski et al., 1989; Kuhn et al., 1996; Ehninger und Kempermann, 2003].

Die [³H]-Thymidin-Methode verwendet ein mit radioaktivem Tritium (³H) markiertes Thymidin [Taylor et al., 1992]. Dieses wird analog zum DNA-Baustein Thymidin von den in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen kompetitiv in die DNA eingebaut. Durch Autoradiographie läßt sich das in die DNA eingebaute [³H]-Thymidin photographisch durch β -Strahlung darstellen und quantitativ erfassen. Die

Radioaktivität ist bei der üblich verwendeten Menge Tritium zwar sehr gering, jedoch beträgt dessen Halbwertszeit mehr als 12 Jahre. Diese Methode nimmt sehr viel Zeit in Anspruch (wochen- bis monatelange Expositionszeiträume) und ist sehr kostenintensiv. Bei der [³H]-Thymidin-Methode ist die Penetration von β -Strahlung im Gewebe sehr schwach. Die Detektion und Auswertung werden somit dadurch erschwert, dass nur die an der Oberfläche der histologischen Schnitte gelegenen proliferationsaktiven Zellen registriert werden können. Bei übereinstimmenden Resultaten in vergleichenden Studien war die BrdU-Methode insgesamt der [³H]-Thymidin-Methode überlegen [Nowakowski et al., 1989; Kuhn et al., 1996]. Daher wurde in der vorliegenden Studie der BrdU-Einbau zum Nachweis proliferierender Satellitenzellen gewählt.

7.2.4.3 Nachweis interstitieller Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung

Kollagen spielt eine entscheidende Rolle in der strukturellen Organisation des Skelettmuskels nach dem Trauma. Studien von Junqueira et al. zeigten, dass die Sirius-Red-Färbung ein klares histologisches Bild des Kollagen-Bindegewebes liefert. Durch den Farbstoff Sirius-Red wird die natürliche Doppelbrechung von kollagenen Bindegewebsfasern verstärkt [Constantine und Mowry, 1968; Weatherford, 1972; Junqueira et al., 1979]. Gegenüber der alternativen Methode zum Nachweis von Kollagen mittels Trichrome, welche häufig variable Färbeergebnisse hervorbringt und nicht spezifisch für Kollagen ist, ermöglicht die Sirius-Red-Färbung spezifischere und sensitivere Aussagen über den Kollagenanteil im Skelettmuskegewebe [Junqueira und Montes, 1983].

7.2.5 Molekularbiologischer Nachweis der EPOR-Genexpression mittels RT-PCR

Die in dieser Studie verwendete konventionelle RT-PCR ist heute die empfindlichste Methode für den qualitativen Nachweis minimalster Mengen einer bestimmten RNA. Die konventionelle RT-PCR zeichnet sich im Vergleich zu anderen Methoden zum Nachweis spezifischer RNA durch eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie der Möglichkeit einer automatisierten Analyse aus. Die Northern-Blot-Hybridisierung als alternative Methode der RNA-Analyse ist oftmals nicht sensitiv genug, um RNA mit einer geringen Expressionsstärke nachweisen zu können [Gilliland et al., 1990]. So liegt die maximale Nachweisgrenze im Northern-Blot bei ca. 0,5 pg spezifischer RNA [Mocharla et al., 1990]. Im Vergleich dazu ermöglicht die konventionelle RT-

PCR mit der Nachweisgrenze von ca. 0,05 pg den Nachweis deutlich geringerer RNA-Mengen [Mocharla et al., 1990].

Gerade die hohe Sensitivität der Methode birgt jedoch auch die Gefahr einer ungewollten Kontamination und falsch positiver Ergebnisse. Um mögliche Schwankungen in der RNA-Qualität auszugleichen, erfolgte in Anlehnung an die von Watzka et al. [Watzka et al., 1997] beschriebene Methode eine Relativierung der ermittelten EPOR-RNA-Expression gegenüber der GAPDH-RNA-Expression. Festgestellt werden konnte, dass die GAPDH-RNA-Expression im Skelettmuskel nach Trauma nicht reguliert und während der Beobachtungszeit von 42 Tagen nach Trauma konstant expremiert wird. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurden bei allen Proben Negativkontrollen durchgeführt. Weiterhin gelang es uns durch Modifikation der Anleaningtemperatur die RT-PCR-Methode für die verwendeten Primer maximal zu spezifizieren, da die Möglichkeit einer unspezifischen Anlagerung der Primer bei der Temperatur von 63°C deutlich reduziert ist [Mocharla et al., 1990].

7.3 Diskussion der Ergebnisse

7.3.1 EPO: Zeitpunkt, Dosis und Applikation

EPO zeichnet sich als Therapeutikum durch eine geringe Toxizität und große therapeutische Breite aus. Entsprechend den WHO-Richtlinien wird die EPO-Dosis im klinischen Alltag an das Gewicht des Patienten angepasst und meist oral verabreicht. Zur Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen sowie zur Erhöhung des Standardisierungsgrades erfolgt auch in den wissenschaftlichen Studien eine gewichtsadaptierte EPO-Applikation. Die Untersuchungen von Belayev et al. zur EPO-Wirkung im neuronalen Gewebe nutzten eine Dosis von 5000 IE/kg KG [Belayev et al., 2005]. Calvillo et al. wandten in ihrer Studie zur EPO-Wirkung im Herzmuskelgewebe auch eine EPO-Dosis von 5000 IE/kg KG an [Calvillo et al., 2003]. In Anlehnung an die schon publizierten Arbeiten zur gewebsschutzenden Wirkung von EPO im neuronalen und myokardialen Gewebe wurde für die lokale Applikation von EPO im Skelettmuskelgewebe eine Dosis von 5000 IE/kg KG gewählt. In den meisten dieser Publikationen wurde das EPO i.v. oder i.p. über mehrere Tage verabreicht [Calvillo et al., 2003; Johnson et al., 2006; Belayev et al., 2005]. In unserer Studie wurde eine einmalige lokale EPO-Gabe durch eine i.m. Injektion favorisiert, welche im Gegensatz zu anderen Verabreichungsformen eine Minimierung unerwünschter systemischer Nebenwirkungen ermöglicht.

Im Hinblick auf eine besonders hohe Inzidenz traumatischer Skelettmuskelschäden in Verbindung mit schweren Verletzungen, die operativ versorgt werden müssen [Bleakley et al., 2004], bietet die i.m.-Applikationsform gerade bei der Behandlung peripherer Skelettmuskelschäden eine ideale Möglichkeit die notwendige EPO-Sättigungsdosis im betroffenen Gewebe schnell zu erreichen. Bei Verletzungen, die ohne chirurgischen Eingriff behandelt werden, stellt eine sonographisch gestützte i.m. EPO-Injektion eine alternative Applikationsform dar.

Rantanen et al. sowie Chargé und Rudniki weisen auf eine zentrale Bedeutung der aktiven Muskeldegeneration und Inflammation in den ersten Tagen nach einem Trauma für den Heilungsprozess im peripheren Skelettmuskel hin [Rantanen et al., 1995; Chargé und Rudniki, 2004]. Rantanen et al. demonstrieren das Vorliegen einer besonders hohen Sensibilität des geschädigten Muskels auf die regenerationsunterstützenden Maßnahmen von Tag 1 bis Tag 7 nach einem Trauma [Rantanen et al., 1995]. In Anlehnung an die oben genannten Publikationen und unter Berücksichtigung des praktischen Aspekts in der Therapie schwerer Skelettmuskelerletzungen erfolgte die EPO-Applikation in der hier vorliegenden Studie direkt im Anschluss an das Kontusionstrauma am Tag 0. Die in dieser Studie registrierte transiente Hochregulation des EPOR im Skelettmuskelgewebe am Tag 1 und Tag 7 nach dem Trauma ist auf die durch ein Kontusionstrauma induzierte schwere Hypoxie zurückzuführen und weist auf eine bedeutende Rolle von EPO im Regenerationsprozeß im Skelettmuskelgewebe in den ersten Tagen nach einem Trauma hin.

In Übereinstimmung mit den Aussagen von Rantanen et al. sowie von Chargé und Rudniki konnte in der hier vorliegenden Studie die maximale Ausprägung der gewebsschutzenden Effekte von EPO am Tag 7 nach dem Trauma beobachtet werden. Die erzielten Ergebnisse belegen damit die enorme Bedeutung der Qualität der Erstversorgung im Gesamtkonzept des Therapiemanagements bei traumatischen Skelettmuskelerletzungen.

7.3.2 Regeneration der Kontraktionskräfte des M. soleus

In Anlehnung an die von Matziolis et al. durchgeführten Untersuchungen der spontanen funktionellen Regeneration der Skelettmuskulatur nach offenem Kontusionstrauma [Matziolis et al., 2005] gelang es in der hier vorliegenden Studie mittels der bipolaren elektrischen Stimulation des N. ischiadicus die Kontraktionspotentiale

des M. soleus erfolgreich abzuleiten und diese über einen Zeitraum von 42 Tagen quantitativ zu analysieren.

Trotz unterschiedlicher Gruppengröße und abweichendem Versuchsaufbau konnten die von Matziolis und Kollegen ermittelte Regenerationskapazität des M. soleus in der hier vorliegenden Studie bestätigt werden. Die Kontraktionskraft des M. soleus der mit NaCl behandelten Tiere erreichte nach 42 Tagen im „single-twitch“-Modus den Mittelwert von ca. 66% der Kraft der kontralateralen Seite. Im Vergleich dazu erfolgte eine Rehabilitation der tetanischen Kontraktionskraft auf 80% der Kraft des kontralateralen Muskels.

Calvillo und seine Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von EPO auf die Kontraktionskraft des linken Ventrikels im postischämischen Myokard [Calvillo et al., 2003]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie befinden sich in Übereinstimmung mit denen von Calvillo et al. und demonstrieren eine effektive Steigerung der Regeneration der Kontraktionskräfte im Skelettmuskelgewebe durch EPO. Es gibt Diskrepanzen in den Ergebnissen dieser Studie mit denen der oben genannten Studie bezüglich des Ausmaßes der kontraktionsteigernden Wirkung von EPO. Diese könnten durch unterschiedliche kontraktile Eigenschaften des Myokards im Vergleich zum peripheren Skelettmuskelgewebe erklärt werden. Sterin-Borda et al. zeigten ebenfalls eine Steigerung der Kontraktionskraft im Myokard unter dem Einfluss von EPO [Sterin-Borda et al., 2003]. In Übereinstimmung mit diesen Daten weisen die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie eine 60- bis 80%ige Wiederherstellung der Skelettmuskelkraft unter dem Einfluss von EPO nach.

Nach den vielversprechenden Berichten über kontraktionssteigernde Wirkungen von EPO im postischämischen Myokard [Calvillo et al., 2003; Sterin-Borda et al., 2003], demonstriert die in dieser Studie durchgeführte *in vivo* Untersuchung erstmals eine Steigerung der kontraktilen Funktion des peripheren Skelettmuskels nach einer einmaligen i.m. EPO-Applikation.

7.3.3 Mikrozirkulation im Skelettmuskel nach dem Trauma und EPO

Die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion im peripheren Skelettmuskelgewebe nach geschlossenem Trauma ist zahlreich in der Literatur beschrieben worden [Schaser et al. 1999; Mittlmeier et al., 2003]. Die hier vorliegende Studie belegt erstmalig, dass ein offenes Kontusionstrauma in ähnlicher Weise wie ein ge-

schlossenes Trauma zu einer inflammatorischen Reaktion führt. Mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie konnte die Mikrozirkulation in den drei Zonen im M. soleus nach offenem Kontusionstrauma untersucht werden.

Ein offenes Kontusionstrauma verursacht lokale Ischämie im betroffenen Skelettmuskel. Die während der Ischämie und der anschließenden Reperfusion gebildeten Radikale verursachen eine direkte Zerstörung von Zellmembranen durch Lipidperoxidation und fördern die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und dem Gefäßendothel [Geng et al., 1990; Wetzel et al., 2004]. Durch ihre oxidative und proteolytische Aktivität tragen die Leukozyten erheblich zur Inflammation im verletzten Gewebe bei [Weiss, 1989]. Sie setzen zahlreiche zytolytische und zytotoxische Substanzen frei, die den inflammatorischen Prozess weiterhin unterhalten und für sekundären Gewebeschaden mitverantwortlich sind. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie demonstrieren das gleichzeitige Auftreten von Leukozytenadhärenz mit mikrovaskulärer Perfusionsstörung, makromolekularer Leakage und apoptotischen Zellen bei allen Tieren nach Trauma und belegen eindrucksvoll die von Wetzel et al. beschriebene Schlüsselrolle von Leukozyten im inflammatorischen Prozeß [Wetzel et al., 2004].

Entsprechend der in der Literatur beschriebenen protektiven Funktionen von EPO bei Erhaltung der Gewebshomöostase und Mikrozirkulation durch Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Reaktion und Verstärkung der Endothelintegrität im Nerven- und Myokardgewebe [Calvillo et al., 2003; Johnson et al., 2006; Belayev et al., 2005], demonstriert die vorgelegte Studie erstmalig eine anti-inflammatorische Wirkung von EPO im peripheren Skelettmuskelgewebe nach dem Trauma.

Brines und Cerami führten Untersuchungen zur Reduktion des sekundären Gewebsschadens nach Ischämie durch und demonstrierten eine gewebsschützende Wirkung von EPO im Sinne der Anti-Inflammation im Nervengewebe der Ratten nach einer i.p. EPO-Applikation [Brines und Cerami, 2005]. Auch in dieser Studie konnte unter Gabe von EPO eine signifikante Reduktion der Apoptoserate, Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und makromolekularen Leakage im untersuchten Muskelgewebe nachgewiesen werden.

Die Interaktion der aktivierten Leukozyten mit den Endothelzellen erfolgt in mehreren Schritten und wird durch Rollen, Anheften, Diapedese und Migration der Leukozyten charakterisiert [Geng et al., 1990; Worthylake und Burridge, 2001; Wetzel et al., 2004]. Die Diapedese erfolgt überwiegend durch die Endothelzellen, aber

auch zwischen diesen in das interstitielle Gewebe. Die mikrovaskuläre Leukozytenadhärenz [Bagge et al., 1983; Braide et al., 1984] behindert den Blutfluss und ausgeschüttete Mediatoren weisen eine direkte konstringierende Wirkung auf Kapillaren auf [Menger et al., 1992; Menger et al., 1997]. Die Folge ist eine Schädigung des Endothels mit konsekutiver Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren eine Reduktion des Endothelschadens und Verbesserung der nutritiven Versorgung des geschädigten Gewebes unter EPO-Einfluss.

7.3.4 Apoptose und Regeneration der Skelettmuskelzellen nach dem Trauma und EPO

Dass EPO eine anti-apoptotische und pro-proliferative Wirkung in zahlreichen Gewebearten ausübt, ist in der Literatur beschrieben. Auch die Forschungsgruppe von Chong und Mitarbeitern untersuchte die anti-apoptotische Wirkung von EPO auf die Mikroglia [Chong et al., 2005]. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zur Apoptose demonstrieren erstmalig eine signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen im peripheren Skelettmuskelgewebe unter dem Einfluss von EPO. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten der im Rahmen dieser Studie durchgeführten intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Somit bestätigen sich die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Chong et al. [Chong et al., 2005], die einen anti-apoptotischen Effekt von EPO im Nervengewebe zeigen konnten. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Brines und Cerami fiel der anti-apoptotische Effekt von EPO in der vorliegenden Studie höher aus [Brines und Cerami, 2005]. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedliche Reaktionsbereitschaft von Nerven- und Muskelgewebe sowie unterschiedliche Applikationsarten von EPO (i.v. versus i.m.) zurückzuführen. Zu einem mit den Daten der vorliegenden Studie vergleichbaren Ergebnis gelangte auch die Arbeitsgruppe von Yatsiv [Yatsiv et al., 2005], die eine gewebsschützende Wirkung von EPO im Sinne der Anti-Inflammation und Anti-Apoptose im Nervengewebe demonstrierte. In Anlehnung an die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von Brines und Cerami [Brines und Cerami, 2005], Yatsiv et al. [Yatsiv et al., 2005] und Chong et al. [Chong et al., 2005] weist die vorliegende Studie auf EPO als einen pleiotropen Faktor hin, der die Mechanismen der mikrovaskulären

Schädigung und den inflammatorischen Zusammenbruch der Endothelintegrität im Sinne der Gewebeprotektion beeinflusst.

Yatsiv und Mitarbeiter sowie Maise und Chong zeigten unter dem Einfluss von EPO einen signifikanten Anstieg proliferierender Zellen im neuronalen Gewebe [Yatsiv et al., 2005; Maise und Chong, 2005]. In Übereinstimmung damit konnten in der hier vorliegenden Studie vergleichbare Resultate im Sinne einer erhöhten Anzahl proliferierender Satellitenzellen im peripheren Skelettmuskelgewebe nach EPO-Gabe aufgezeigt werden. Diese Studie kann damit die von Maise und Chong vertretene Auffassung belegen, dass die pro-proliferativen Effekte auf die mitogene Wirkung von EPO im betroffenen Gewebe hinweisen [Maise und Chong, 2005].

Satellitenzellen stellen die primäre Stammzellquelle für die Regeneration des Skelettmuskelgewebes dar. Die vorliegende Studie demonstriert eine EPO vermittelte Steigerung der Anzahl proliferierender Satellitenzellen sowie Reduktion der Fibrose im Skelettmuskelgewebe nach Kontusionstrauma. Wie die vorliegenden Daten zur Muskelkraft zeigen, resultiert eine Steigerung der Proliferationsrate der Satellitenzellen in einer schnelleren und intensiveren Regeneration des Skelettmuskels.

Die molekularbiologischen Untersuchungen im Rahmen der hier vorliegenden Studie zeigen eine Hochregulation der EPOR-Genexpression im Skelettmuskelgewebe im Anschluss an die durch das Kontusionstrauma verursachte Hypoxie. Schon in den letzten Dekaden des zwanzigsten Jahrhunderts konnte die EPOR-Genexpression in verschiedenen non-hämatopoetischen Geweben wie beispielsweise Nieren- und Nervengewebe demonstriert werden [Beru et al., 1986; Bondurant und Koury, 1986; Schuster et al., 1987]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Beru et al. [Beru et al., 1986], die EPOR-Expression im Nierengewebe zeigte, konnte in der vorliegenden Studie die EPOR-Genexpression im Skelettmuskelgewebe nach dem Trauma nachgewiesen werden, die ausschließlich am Tag 1 und 7 nach Trauma zu beobachten war. Dass zu den späteren Beobachtungszeitpunkten sowie bei den Tieren ohne Kontusionstrauma keine EPOR-Genexpression registriert werden konnte, ist dadurch zu erklären, dass diese Tiere keine Hypoxie im peripheren Skelettmuskelgewebe hatten. Die Ergebnisse dieser Studie stehen somit in Übereinstimmung mit den Studien von Semenza [Semenza, 1998] und Beck und Mitarbeitern [Beck et al., 1991], welche die Bedeutung der Hypoxie für die Induktion der EPO-Bildung aufzeigen. In Anlehnung an die in der Li-

teratur beschriebenen Daten zum anti-apoptischen und pro-regenerativen Effekt von EPO in non-hämatopoetischen Organen demonstrieren die Ergebnisse dieser Studie eine Möglichkeit der Verbesserung der Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur durch i.m. EPO-Applikation zur Mobilisation und Aktivierung der Muskelstammzellen sowie zur Reduktion der Apoptose und der Fibrose nach einem Trauma.

7.4 Ausblick, Grenzen und Perspektiven

EPO und sein Rezeptor sind Gegenstand intensiver Forschung [Maiese et al., 2005]. EPO ist bekannt als ein Zytokin, das die Differenzierung, Proliferation und Apoptose erythroid determinierter Progenitorzellen steuert. Die pleiotropen Eigenschaften von EPO auf die Zellen des hämatopoetischen Systems finden schon seit zwei Jahrzehnten klinische Anwendung in der Behandlung von anämischen Patienten.

Die Voraussetzung für die Entfaltung der Wirkung von EPO ist die Bindung an seinen Rezeptor [Kawakami et al., 2001; Brines und Cerami, 2006]. Es ist bekannt, dass EPOR nicht nur auf der Oberfläche von Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert wird. EPOR wurde auch auf vielen anderen Zelltypen identifiziert, wie zum Beispiel Kardiomyozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Enterozyten, plazentaren Synzytiotrophoblasten, Leydig-Zellen, Astrozyten und Neuronen des Gehirns [Juul, 2000]. Die Aussagen von Ogilvie und Mitarbeitern über die Beeinflussung der Differenzierung der Myoblasten der C2C12-Zelllinie durch EPO [Ogilvie et al., 2000] waren Anlass, in der hier vorliegenden Studie die gewebsschutzenden Effekten von EPO in Skelettmuskulatur zu untersuchen. Im Ergebnis konnte der Nachweis der EPOR-Genexpression im peripheren Skelettmuskel nach dem Trauma belegt werden. Es wurde hiermit die Grundlage geschaffen, die Regeneration der Skelettmuskulatur durch i.m. Applikation von EPO zu beeinflussen.

Die vorgelegte Studie diskutiert pleiotrope Effekte von EPO im Skelettmuskel. Dabei werden nach offenem Kontusionstrauma Wirkungen von EPO im Sinne von Anti-Entzündung, Anti-Apoptose, Proliferation und funktioneller Rehabilitation charakterisiert. Die zu Beginn dieser Arbeit gestellten Fragen zur Beeinflussung der Regeneration der Skelettmuskulatur nach traumatischem Muskelschaden durch i.m.

Applikation von EPO konnten mit den ausgewählten Methoden erfolgreich beantwortet werden. Die Ergebnisse dieser Studie tragen erheblich zur Ergänzung und Erweiterung der in Literatur beschriebenen gewebsschutzlichen Effekte von EPO bei. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zeigen erstmalig, dass EPO die histologische und funktionelle Regeneration der Skelettmuskulatur nach dem Trauma effektiv unterstützt.

In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten zum gewebsschutzlichen Effekt von EPO im Nerven-, Nieren- und Herzgewebe demonstrierten unsere *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion, eine Erhöhung der nutritiven Blutversorgung des Gewebes, eine Erhöhung der Proliferationsrate von Satellitenzellen sowie eine Reduktion der Apoptose und der Fibrose im Skelettmuskel nach dem Trauma unter EPO-Behandlung. Die genannten gewebsschutzlichen Effekte von EPO resultierten in einer effektiveren Regeneration des Skelettmuskelgewebes. Folglich entwickelten die mit EPO behandelten Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen signifikant höhere Kontraktionskräfte als die Tiere der Kontrollgruppe.

Die Klärung der molekularen Mechanismen von EPO, die zur Unterstützung der funktionellen und histologischen Skelettmuskelregeneration führen, sollte Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein. Weiterhin ist zu untersuchen, ob die Reduktion der makromolekularen Leakage die Folge einer verminderten Leukozytenakkumulation ist und inwieweit die Reduktion der makromolekularen Leakage die kapilläre Perfusion begünstigt.

Der anti-apoptotische Effekt von EPO in den erythroiden Vorläuferzellen ist schon weitgehend charakterisiert worden [Fischer, 2003; Jelkmann, 2004]. Die Autoren gehen von der gleichen EPO-EPOR-Signalkaskade auch in den nicht-hämatopoetischen Zellen aus [Green, 2000; Mak, 2000; Chong et al., 2002; Chong et al., 2003; Maiese et al., 2005]. Weiterhin haben die Arbeitsgruppen von Chin et al. und Leist et al. gezeigt, dass der EPOR unter Beteiligung seiner membranproximalen, Jak2-bindenden Region die β -Einheit eines Heterorezeptors, auch als CD131 bekannt, aktiviert [Chin et al., 1998; Leist et al., 2004]. Dies stellt auch den gemeinsamen Signaltransduktionsweg von GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Rezeptor dar [Livnah et al., 1999; Remy et al., 1999]. Die Konsequenzen dieser Kreuzaktivierung und einer ligandenunabhängigen Apoptose suppressierenden Wir-

kung von EPOR im Bezug auf die Therapie von traumatischen Skelettmuskelschäden gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.

Die relativ kurze Halbwertszeit von EPO kann einen limitierenden Faktor für seinen optimalen klinischen Einsatz bei lokaler Applikationsform darstellen. Eine alternative Therapie könnte die Applikation synthetischer EPO-Derivate mit einer längeren Halbwertszeit oder viraler Vektoren zum Zwecke des Transfers des EPO-Gens in das geschädigte Gewebe beinhalten. Eine gezielte EPO-Produktion in der geschädigten Region, z.B. mittels adenoviraler Vektoren, könnte einen effektiven Schutz vor fortschreitendem apoptotischem Zelltod und die Reduktion des sekundären Gewebsschadens ermöglichen.

Das Einbringen eines viralen Vektors in den Organismus ist jedoch mit zahlreichen Risiken verbunden. Hierdurch kann es zu Immunreaktionen, Problemen bezüglich der Spezifität der Fremdgenexpression sowie bei genomintegrierenden Vektorsystemen zur Insertionsmutagenese kommen. Die potentiell mit dem Gentransfer verbundenen Risiken und hohe Kosten schränken bislang die Möglichkeiten für ihren klinischen Einsatz ein.

Im Gegensatz dazu gewinnen das klinisch vielfältig bei Behandlung von Anämien erprobte EPO und seine synthetischen Derivate an Attraktivität. Das Spektrum der Nebenwirkungen ist bekannt und somit gut einschätzbar. Neue, synthetische EPO-Derivate wie carbamyliertes EPO haben darüberhinaus eine längere Halbwertszeit und weisen rein zytoprotektive Wirkkomponenten auf, ohne Einfluß auf die Erythropoese zu nehmen. Damit bleibt die Steigerung des Hämatokrits mit konsekutivem Hypertonus oder potentieller Thrombemboliegefahr aus [Leist et al., 2004]. Nicht zuletzt kann rekombinantes EPO kostengünstiger hergestellt werden als virale Vektoren zum EPO-Transfer.

Ein potentielles Risiko im Falle eines längerfristigen lokalen Einsatzes von EPO als therapeutisches Agens bei Skelettmuskelschäden birgt STAT3 durch seine Funktion im Zellzyklus. Physiologischerweise wird STAT3 nur vorübergehend phosphoryliert. In vielen Tumorzelllinien findet sich jedoch konstant phosphoryliertes STAT3. Dieses dauerhaft aktivierte, proliferativ wirkende Protein ist für die Vermehrung von Tumorzellen, und somit für Tumorwachstum und Invasivität von großer Bedeutung [Bromberg et al., 1999]. Entsprechend konnte bei Leukämie oder dem hepatozellulären Karzinom dauerhaft aktiviertes STAT3 nachgewiesen werden. Wenn STAT3 nach i.m. EPO-Applikation dauerhaft aktiviert wird, muß die Frage ei-

ner potentiellen Onkogenese gestellt werden bzw. ob eine Therapie mit EPO möglicherweise tumorinduzierend wirken kann.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde EPO einmalig lokal verabreicht und ist als lokal wirksames und systemisch nebenwirkungsarmes Agens zu betrachten, welches zu kaum nachweisbaren hämatopoetischen Effekten führte. Nur bei hohen Dosen und einer systemischen Dauertherapie wären relevante Nebenwirkungen einer EPO-Gabe wie Hypertonus und Hyperkoagulation des Blutes zu befürchten [Leist et al., 2004; Ehrenreich et al., 2007].

EPO ist ein etabliertes und gut erforschtes Medikament, welches eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Optimierung der posttraumatischen Skelettmuskelheilung darstellt. Obwohl eine zurückhaltende Interpretation sicherlich erforderlich ist, darf man hoffen, dass weiterführende Arbeiten zum besseren Verständnis der Mechanismen der anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und regenerationsfördernden Wirkungen von EPO beitragen werden. Dieses Verständnis könnte es in Zukunft ermöglichen, Patienten mit traumatischen Erkrankungen des Skelettmuskelgewebes eine gewebsschutzende und regenerationsfördernde Therapie unter Kriterien höchster Sicherheit zu ermöglichen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
2. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:1344-1351.
3. Agnello D, Bigini P, Mennuni T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effects on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;952:128-134.
4. Ahlemayer B, Kriegelstein J. Stimulation of 5-HT_{1A} receptor inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons from chick embryo. *Brain Res* 1997;777:179-186.
5. Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth-factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1989;138:311-315.
6. Allen RE, Rankin LL. Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;194:81-86.
7. Almekinders LC. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Spots Med* 1999;28:3-388.
8. Almekinders LC. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sports. *Sports Med* 1993;15:139-145.
9. Almekinders LC. Results of surgical repair versus splinting of experimentally transected muscle. *J Orthop Trauma* 1991;5:173-176.
10. Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D. Cross-talk between cAMP and p53-generated signals in induction of differentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells. *Steroids* 1996;61:252-256.
11. 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.
12. Aoki M, Morshito R, Matsushita H, Nakano N, Hayashi S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. Serum deprivation-induced apoptosis accompanied by up-regulation of p53 and bax in human aortic vascular smooth muscle cells. *Heart Vessels Suppl* 1997;12:71-75.
13. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
14. Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain*. 1990;41:235-251.
15. Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *J Microcirc Clin Exp* 1995;15:85-91.
16. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL, Harris KA, Potter RF. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2004;36:371-379.
17. Badhwar A, Dungey AA, Harris KA, Scott JA, McCarter SD, Scott JR, Forbes TL, Potter RF. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. *J Surg Res* 2003;109:62-67.
18. Badhwar A, Forbes TL, Lovell MB, Dungey AA, McCarter SD, Scott JR, DeRose G, Harris KA, Potter RF. Chronic lower extremity ischemia: a human model of ischemic tolerance. *J Surg* 2004;47:352-358.
19. Bagge U, Blixt A, Strid KG. The initiation of post-capillary margination of leukocytes: studies in vitro on the influence of erythrocyte concentration and flow velocity. *J Microcirc Clin Exp* 1983;2:215-227.
20. Barber DI, D'Andrea AD. Erythropoietin and interleukin-2 activate distinct JAK-Kinase family members. *Mol Cell Biol* 1994;14:6506-6516.
21. Barber DI, D'Andrea AD. The erythropoietin receptor and the molecular basis of signal transduction. *Hematol* 1993;29:293-304.
22. Barlow Y, Willoughby J. Pathophysiology of soft tissue repair. *Med Bull* 1992;48:698-711.

23. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β -chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:788-795.
24. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6934-6938.
25. Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *Biol Chem* 1991;266:15563-15566.
26. Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1999;35:181-195.
27. Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *J Sports Med* 1999;27:2-9.
28. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Acad Orthop Surg* 2001;9:227-237.
29. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injury and myositis ossificans traumatica. *Clin Orthop* 2002;403:110-119.
30. Belayev L, Khoutorova L, Zhao W, Vignatelli A, Belayev A, Busto R, Magal E, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of darbepoietin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2005;36:1071-1076.
31. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004;104:2073-2080.
32. Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986;6:2571-2575.
33. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med* 2000;11:251-266.
34. Bigbauer E, Sechrist J, Bronner-Fraser M, Fraser S. Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* 1995;121:935-945.
35. Bleakley C, McDonough S, MacAuley D. The use of ice in the treatment of acute soft tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *J Sports Med* 2004;34:251-261.
36. Blink EJ, Trapani JA, Jans DA. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999;77:206-215.
37. Bohl D, Naffakh N, Heard JM. Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med* 1997;3:299-305.
38. Bohl D, Salvetti A, Moullier P, Heard JM. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* 1998;92:1512-1517.
39. Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 1986;1:675-683.
40. Bortner CD, Nicklas BE, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995;5:21-26.
41. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor α -mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998;18:6353-6364.
42. Braide M, Amundson B, Chien S, Bagge U. Quantitative studies on the influence of leukocytes on the vascular resistance in a skeletal muscle preparation. *Microvasc Res* 1984;27:331-352.
43. Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:2010-2015.
44. Brickson S, Ji LL, Schell K, Olabisi R, St Pierre Schneider B, Best TM. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation and myofiber damage following stretch injury. *J Appl Physiol* 2003;95:969-976.
45. Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 2006;70:245-246.
46. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:484-494.

47. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14907-14912.
48. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.
49. Bucher O, Wartenberg H. *Zytologie. Hystologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Bern 1997; Verlag Hans Huber.
50. Buckwalter JA. Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. *J Orthop* 1995;15:29-42.
51. Buckwalter JA. Pharmacological treatment of soft-tissue injuries. *J Bone Joint Surg* 1995;77:1902-1914.
52. Buckwalter JA. Should bone, soft tissue, and joint injuries be treated with rest or inactivity. *J Orthop Res* 1995;13:155-156.
53. Bunn HF, Gu J, Huang LE, Park JW, Zhu H. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol* 1998;201:1197-1201.
54. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4802-4806.
55. Cantini M, Carraro U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:121-128.
56. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, Bellorin-Font E. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney* 1999;55:546-553.
57. Casar JC, McKechnie BA, Fallon JR, Young MF, Brandan E. Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Dev Biol* 2004;268:358-371.
58. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2258-2263.
59. Chan YS, Li Y, Foster W, et al. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol* 2003;95:771-780.
60. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-238.
61. Chaves-Cartaya RE, Romero PR, Jamieson NV. Hemoglobin Saturation in the rat liver after ischemia and reperfusion: Study using a laser photometry technique and correlation with liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995;27:82-92.
62. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol* 2003;163:1133-1143.
63. Cheung AT, Harmatz P, Wun T, Chen PC, Larkin EC, Adams RJ, Vichinsky EP. Correlation of abnormal intracranial vessel velocity, measured by transcranial Doppler ultrasonography, with abnormal conjunctival vessel velocity, measured by computer-assisted intravital microscopy, in sickle cell disease. *Blood* 2001;97:3401-3444.
64. Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* 1998;91:3734-3745.
65. Chiquet M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* 2003;22:73-80.
66. Chong ZZ, Maise K. Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. *Br J Pharmacol* 2007;150:839-850.
67. Chong ZZ, Kang JQ, Maise K. Angiogenesis and plasticity: role of erythropoietin in vascular systems. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:863-871.
68. Chong ZZ, Kang JQ, Maise K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *J Pharmacol* 2003;138:1107-1118.

69. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002;106:2973-2979.
70. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:503-545.
71. Coleman T, Brines M. Science review: recombinant human erythropoietin in critical illness: a role beyond anemia? *Crit Care* 2004;8:337-341.
72. Constantine VS, Mowry RW (1968): Selective staining of human dermal collagen II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 1968;50:419-423.
73. Conzen P, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988;69:643-651.
74. Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res.Dev.Brain Res* 2002;134:13-21.
75. Corr DT, Levenson GE, Vanderby R, Best TM. A nonlinear rheological assessment of muscle recovery from eccentric stretch injury. *Med Sci Sport Exe* 2003;35:1581-1588.
76. Craft RM, Leitel MD. Potentiation of morphine antinociception by pentobarbital in female vs. male rats. *Pain*. 2006;121:115-125.
77. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *J Sports Med* 1994;22: 702-710.
78. Damon DH, Duling BR. Are physiological changes in capillary tube hematocrit related to alterations in capillary perfusion heterogeneity? *J Microcirc Clin Exp* 1987;6:309-319.
79. Deal DN, Tipton J, Rosencrance E, Curl WW, Smith TL. Ice reduces edema: a study of microvascular permeability in rats. *J Bone Joint Surg*. 2002;84:1573-1578.
80. Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnick E, Metcalf D. Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines, *J Exp Med* 1980;152:1036-1047.
81. Dickson J, Magee B, Stewart A, West CM. Relationship between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients. *Radiother Oncol* 2002;62:321-326.
82. Dietrich HH, Tyml K. Capillary as a communicating medium in the microvasculature. *Microvasc Res* 1992;43:87-99.
83. Dunst J. Management of anemia in patients undergoing curative radiotherapy. Erythropoietin, transfusions, or better nothing? *Strahlenther Onkol* 2004;180:671-681.
84. Duttaroy A, Qian JF, Smith JS, Wang E. Upregulated P21C1P1 expression is part of the regulation quantitatively controlling serum deprivation-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 1997;64:434-446.
85. Eckardt KU. After 15 years of success- perspectives of erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1745-1749.
86. Ehninger D, Kempermann G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex* 2003;13:845-851.
87. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
88. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, Ritzen M, Mohr A, Wagner M, Schneider U, Bohn M, Huber M, Czernik A, Pollmacher T, Maier W, Siren AL, Klosterkotter J, Falkai P, Ruther E, Aldenhoff JB, Krampe H. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 2007;12:206-220.
89. Ehrhard CJ, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol* 2005;18:548-553.
90. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:769-776.

91. Elias H, Petty D. Terminal distribution of the hepatic artery. *Anat Rec* 1953;116:9-17.
92. Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbiniere A, Knisely JP, Erbayraktar Z, Yilmaz O, Cerami A, Coleman TR, Brines M. Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. *Mol Med* 2006;12:74-80.
93. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-1322.
94. Eves FM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tschlis PN, Rosner MA, Hay N. Akt, a target of phosphoinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* 1998;18:2143-2152.
95. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, and Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029-4035.
96. Ferreira R, Neupath 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. *J Appl Physiol* 2006;97:340-346.
97. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005;73:1907-1916.
98. Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005;57:187-215.
99. Fischer JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003;228:1-14.
100. Forsman AD, McCormack JT. Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrous cycle. *Anat Rec* 1992;233:515-520.
101. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res* 2003;21:798-804.
102. Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M. Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *J Physiol.* 1994;267:2204-2212.
103. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *J Sports Med* 2001;29:394-402.
104. Gal-Levi R, Leshem Y, Akoi S, Nakamura T, Halevy O. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1402: 39-51.
105. Galmarini CM, Voorzanger N, Falette N, Jordheim L, Cros E, Puisieux A, Dumontet C. Influence of p53 and p21(WAF1) expression on sensitivity of cancer cells to cladribine. *Biochem Pharmacol* 2003;65:121-129.
106. Garrett WE Jr, Seaber AV, Boswick J, Urbaniak JR, Goldner JL. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. *J Hand Surg* 1984;9: 683-692.
107. Garrett WE Jr. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med Sci Sports Exerc* 1990;22: 436-443.
108. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
109. Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ. Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek-Pouch *Microvasc Res* 1989;37:1-15.
110. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343:757-760.
111. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11:37-44.
112. Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, Schaser KD, Gradl G, Vollmar B. Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:153-160.
113. 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.
114. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994;71:219-225.

115. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9450-9455.
116. Gowdak LH, Poliakova L, Wang X, Kovessi I, Fishbein KW, Zacheo A, Palumbo R, Straino S, Emanuelli C, Marrocco-Trischitta M, Lakatta EG, Anversa P, Spencer RG, Talan M, Capogrossi MC. Adenovirus-mediated VEGF(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation* 2000;102:565-571.
117. Gradl G, Gaida S, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in hindlimb muscle of neuropathic rats. *Pain* 2004;112:121-130.
118. Green DR. Apoptotic pathway: Paper wraps stone blunts Scissors. *Cell* 2000;102:1-4.
119. 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.
120. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 1991;187:1-22.
121. Hacker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5-17.
122. Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G, McCarthy D. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Methods* 1992;146:219-228.
123. Hayashi S, Aso H, Watanabe K. Sequence of IGF-1, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 2004;122:427-434.
124. Heap SJ, Fulgenzi GL, Hudlicka O. Microcirculation in rat soleus muscle after eccentric exercise: the effect of nifedipine. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:687-694.
125. Hendel D. Electric stimulation in the treatment of non-fusion on bones. *Harefuah* 1983;104:423.
126. Hengartner MO. Apoptosis: DNA destroyers. *Nature* 2001;412:27-29.
127. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
128. Henrich H, Johnson PC. Influence of arterial pressure on reactive hyperemia in skeletal muscle capillaries. *Am J Physiol*. 1978;234:352-360.
129. Hoetzel A, Leitz D, Schmidt R, Tritschler E, Bauer I, Loop T, Humar M, Geiger KK, Pannen BH. Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. *Anesthesiology* 2006;104:101-109.
130. Holterman CE, Le Grand F, Kuang S, Seale P, Rudnicki MA. *Megf10* regulates the progression of the satellite cell myogenic program. *J Cell Biol* 2007;179(5):911-922.
131. Honig CR, Feldstein ML, Frierson JL. Capillary lengths, anastomoses, and estimated capillary transit times in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1977;233:122-129.
132. Horobin RW, Rashid F. Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chinese box model. *Histochemistry* 1990;94:205-209.
133. Howard A, Pelc SR. Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res* 1951;2:178-187.
134. Hughes C 4th, Hasselman CT, Best TM, Martinez S, Garrett WE Jr. Incomplete, intrasubstance strain injuries of the rectus femoris muscle. *Am J Sports Med* 1995;23:500-506.
135. Huiqing Cao, Nagadhara Dronadula, Farhan Rizvi, Quanyi Li, Kalyan Srivastava, William T. Gerthoffer, and Gadiparthi N. Rao. Novel Role for STAT-5B in the Regulation of Hsp27-FGF-2 Axis Facilitating Thrombin-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth and Motility. *Circ Res* 2006;98:913-922.
136. Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24:197-205.
137. Hutchins PM, Bond RF, Green HD. Participation of oxygen in the local control of skeletal muscle microvasculature. *Circ Res* 1974;40:85-93.
138. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995;377:591-594.
139. Ince C, Coremans JM, Bruining HA. In vivo NADH fluorescence. *Adv Exp Med Biol* 1992;317:277-296.
140. Jacobson MD, Pedowitz RA, Oyama BK, Tryon B, Gershuni DH. Muscle functional deficits after tourniquet ischemia. *Am J Sports Med*. 1994;22:372-377.
141. Järvinen M, Lehto MUK. The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med* 1993;15:78-89.

142. 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 Path Microbiol Scand* 1975;83:259-265.
143. Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle: an immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23:245-254.
144. JarvinenTA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005;33:745-764.
145. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Hematol* 2004;83:673-686.
146. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43:649-659.
147. Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC. Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int* 2006;69:1806-1813.
148. Johnson SE, Allen RE. Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptors. *Exper Cell Res* 1995;219:449-453.
149. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue: a morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:293-297.
150. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10659-10664.
151. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. (1979): Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-455.
152. Juul SE. Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate. *Clin Perinatol* 2000;27:527-541.
153. Kam PC, Kavanagh R, Yoong FF. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*. 2001;56:534-545.
154. Kanzaki M, Soda K, Gin PT, Kai T, Konishi F, Kawakami M. Erythropoietin attenuates cachectic events and decreases production of interleukin-6, a cachexia-inducing cytokine. *Cytokine* 2005;32:234-239.
155. Karsan A, Yee E, Poirier GG, Zhou P, Craig R, Harlan JM. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am J Pathol* 1997;151:1775-1784.
156. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem* 2001;276:39469-39475.
157. 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.
158. Kirkpatrick UJ, Adams RA, Lardi A, McCollum CN. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br J Haematol* 1998;101:364-368.
159. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Klein CL, Hauptmann S, Klosterhalfen B. The role of the microcirculation in multiple organ dysfunction syndrome (MODS): a review and perspective. *Virchows Arch* 1996;427:461-476.
160. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N; Vallance P, Deanfield J, MacAllister R. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circ* 2001;103:1624-1630.
161. Klar E, Werner J. New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis. *Chirurg* 2000;71:253-264.
162. Klinken SP, Nicola NA, Johnson GR. In vitro derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8506-8510.
163. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol* 1979;237:481-490.
164. Königsberg IR. Skeletal myoblasts in culture. *Cell Culture* 1979;23:511-527.
165. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood*. 1991;77:419-434.

166. Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb RA, Babior BM. Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:21629-21636.
167. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of Mice. *Blood* 1996;87:4544-4551.
168. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16:2027-2033.
169. Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002;100:3457-3469.
170. 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.
171. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist* 2003;8:15-18.
172. Lappin T, Maxwell A, Johnston P. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 2002;20:485-492.
173. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004;14:277-287.
174. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003;113:717-730.
175. Laurent TC, Sundelof LO, Wik KO, Warmegard B. Diffusion of dextran in concentrated solutions. *Eur J Biochem* 1976;68:95-102.
176. Lee CH. Vasomotion enhanced by normovolemic hemodilution in rat diaphragmatic microcirculation. *J Formos Med Assoc* 2005;104:630-638.
177. Lee H, Natsui H, Akimoto T, Yanagi K, Ohshima N, Kono I. Effects of cryotherapy after contusion using real-time intravital microscopy. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1093-1098.
178. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A1 and A3 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:380-387.
179. Lefaucheur JP, Sebille A. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I. *J Neuroimmunol* 1995;57:85-91.
180. Le Grand F, Rudnicki M. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development*. 2007;134(22):3953-7.
181. Lehr HA, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods Enzymol* 1999;300:462-481.
182. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305:239-242.
183. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-598.
184. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2006;71:684-694.
185. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM, Farr AL Jr, Su CY, Frank N, Mulligan DC. Inhibition of the initial wave of NF-kappa-B activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle Nerve* 2001;24: 534-541.
186. Limana F, Urbanek K, Chimenti S, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Izumo S, Anversa P. bcl-2 overexpression promotes myocyte proliferation. *PNAS* 2002;99: 6257-6262.
187. Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 1998;76:1-19.

188. Linkhart TA, Clegg CH, Hauschika SD. Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev Biol* 1981;86:19-30.
189. Linkhart TA, Clegg CH, Hauschka SD. Control of mouse myoblast commitment to terminal differentiation by mitogens. *J Supramol Struct* 1980;14:483-498.
190. Linkhart TA, Lin RW, Hauschka SD. Regulation of normal and variant mouse myoblast proliferation and differentiation by specific growth factors. *Growth of cells in hormonally defined media*, HG. GH Sato, AB Pardee, DA Sirbasku. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982;867-876.
191. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimmers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999;283:987-990.
192. Mac Auley DC. Ice therapy: How good is the evidence? *Int J Sports Med* 2001;22:379-384.
193. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993;177:1277-1286.
194. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90-95.
195. Mak T. The execution complex of apoptosis. *Biochemica* 2000;1:39-41.
196. Mansouri A, Goudreau G, Gruss P. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res* 1999;59(7):1707-1709.
197. Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002;123:23-30.
198. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004;207:3233-3242.
199. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1556.
200. Martinez-Estrada OM, Rodriguez-Millan E, Gonzalez-De Vicente E, Reina M, Vilaro S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci* 2003;18:2538-2544.
201. Matziolis G, Winker 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.
202. McConkey DJ, Zhivotovsky B, Orrenius S. Apoptosis: molecular mechanism and biochemical implications. *Mol Aspects Med* 1996;17:1-110.
203. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, and Cowburn D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 1999;96:625-634.
204. McFarland DC, Pesall JE, Gilkerson KK. The influence of growth factors on turkey embryonic myoblasts and satellite cells in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 1993;89:415-424.
205. McKee Olds J, Stafford ES. On the manner of anastomosis of the hepatic and portal circulations. *John Hopkins Bull* 1930;47:176-185.
206. Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990;38:139-145.
207. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992;263:1901-1906.
208. Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:542-556.
209. Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 1997;8:2-7.
210. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992;263:1892-1900.
211. Menger MD, Vollmar B. In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 1994;15:383-399.

212. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000;7:291-306.
213. Minamino T, Kitakaze M. New therapeutic application of erythropoietin against ischemic heart diseases. *J Pharmacol Sci* 2006;101:179-181.
214. 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.
215. Mizuno N, Yoshitomi H, Ispida H, Kuromi H, Kawaki J, Seino Y, Seino S. Altered bcl-2 and bax expression in intracellular Ca²⁺ signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998;139:1429-1439.
216. Mocharla H, Mocharla R, Hodes ME. Coupled reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive and rapid method for isozyme genotyping. *Gene* 1990;93(2):271-275.
217. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997;273:1829-1844.
218. Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin-6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11349-11353.
219. Nash GB, Jones JG, Mikita J, Christopher B, Dormandy JA. Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 1988;70:171-176.
220. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:218-225.
221. Nig T, Marx G, Littlewood T, Macdougall I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med J* 2003;79:367-376.
222. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-816.
223. Nilsson GE, Tenland T, Oberg PA. Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *Trans Biomed Eng* 1980;27:597-604.
224. Norman MU, Lister KJ, Yang YH, Issekutz A, Hickey MJ. TNF regulates leukocyte-endothelial cell interactions and microvascular dysfunction during immune complex-mediated inflammation. *Br J Pharmacol* 2005;144:265-274.
225. Nowakowski RS, Hayes NL. New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science* 2000;288:771.
226. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 1989;18:311-318.
227. Ogawa N, Dang H, Talal N. Apoptosis and autoimmunity. *J Autoimmun* 1995;8:1-19.
228. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 2000;275:39754-39761.
229. Osborne DL, Aw TY, Cepinskas G, Kvietys PR. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium-independent event. *J Clin Invest* 1994;94:1910-1918.
230. Palacios R, Steinmetz M. IL-3 dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B-lymphocytes in vivo. *Cell* 1985;41:727-734.
231. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:20655-20662.
232. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of the erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999-1007.
233. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *Faseb J* 1996;10:587-597.
234. Peng H, Huard J. Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:329-333.

235. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalglish AG, Gibson FM. The use of 7- amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996;87:2244-2251.
236. Pognan F, Masson MT, Lagelle F, Charuel C. Establishment of a rat sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:453-463.
237. Potter RF, Dietrich HH, Tyml K, Ellis CG, Cronkwright J, Groom AC. Ischemia-reperfusion induced microvascular dysfunction in skeletal muscle: application of intravital video microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993;13:173-186.
238. Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP. An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983;110:148-160.
239. Pries AR. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988;7:327-345.
240. Pudupakkam S, Harris KA, Jamieson WG, DeRose G, Scott JA, Carson MW, Schlag MG, Kviety PR, Potter RF. Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;275:94-99.
241. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-864.
242. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 2005;100:187-197.
243. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995;72:341-347.
244. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal muscle myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 1999;27:54-59.
245. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*. 1999;19:350-364.
246. Reed RK. Transcapillary albumin extravasation in rat skin and skeletal muscle: effect of increased venous pressure. *Acta Physiol Scand* 1988;134:375-382.
247. Remy I, Wilson IA, Michnik SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999;283:990-993.
248. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson JM. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005;105:1424-1430.
249. Robertson TA, Maley MA, Grounds MD, Papadimitriou JM. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res* 1993;207:321-331.
250. Rosenblum WI, El-Sabban F. Enhancement of platelet aggregation by tranilcypromine in mouse cerebral microvessels. *Circ Res* 1978;43:238-241.
251. Rucker M, Roesken F, Vollmar B, Menger MD. A novel approach for comparative study of periosteum, muscle, subcutis, and skin microcirculation by intravital fluorescence microscopy. *Microvasc Res* 1998;56:30-42.
252. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. In-travital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997;45:505-513.
253. Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke* 2005;36:2731-2737.
254. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-17793.
255. Sato K, Li Y, Foster W, et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 2003;28:365-372.
256. Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G. Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 1986;5:73-83.

257. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, Bigini P, Barbera S, Fumagalli E, Mennini T, Vezzani A, Rizzi M, Coleman T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Bianchi R. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006;172:27-37.
258. 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.
259. 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.
260. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ. Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388:323-330.
261. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987;70:316-318.
262. Schwartz LM, Osborne BA. Cell death. *Methods of Cell Biol* 1995;46:15-18.
263. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Lab Clin Med* 1998;131:207-214.
264. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C, Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 2006;19:919-926.
265. Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:327-332.
266. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2115-2124.
267. Sheehan SM, Allen RE. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol* 1999;181:499-506.
268. Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 2000;23:239-45.
269. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci* 2004;117:5393-5404.
270. Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 1996;11:1139-1146.
271. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-xl and Bcl-2. *Blood* 1996;88:1576-1582.
272. Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, Dosen G, Smeland EB, Blomhoff HK, Myklebust JH. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 2006;135:117-128.
273. Slack JK, Higgins PJ. Cytoarchitecture and cell growth control. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996;33:83-87.
274. Smedegard G, Bjork J, Arfors KE. An intravital microscopy model for studies of immune complex induced inflammation at the microvascular level. *Int J Tissue React* 1985;7:55-60.
275. Smyth Y, Berman SA, Bursztajn S. Markers of apoptosis: Methods for elucidating their mechanism of apoptotic cell death from the nervous system. *Biotechniques* 2002;32:648-665.
276. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998;2:549-558.
277. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
278. Stein LS, Boyer MJ, Agadir A, Le H, Radman D, Castellanos A, George D. Modern tools for detecting and analyzing apoptosis. *Hotlines* 2001;6:35-38.
279. Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, Abels C, Messmer K. Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 1998;9:345-351.

280. Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *J Physiol* 1997;272:1710-1716.
281. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
282. Sterin-Borda L, Barcelo AC, Bozzini CE. Erythropoietin improves cardiac contractility in posthypoxic mice. *J Haematol* 2003;121:180-186.
283. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975;254:56-58.
284. St Pierre BA, Tidball JG. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 1994;77:290-297.
285. Sullivan SM, Johnson PC. Effect of oxygen on arteriolar dimensions and blood flow in cat sartorius muscle. *Am J Physiol* 1981;241:547-556.
286. Sumen C, Mempel TR, Mazo IB, von Andrian UH. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity* 2004;21:315-329.
287. Swain DP, Pittman RN. Oxygen exchange in the microcirculation of hamster retractor muscle. *Am J Physiol* 1989;256:247-255.
288. Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:321-325.
289. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 1998;194:114-128.
290. Taylor AE, Moore T, Paisley P. The time has finally arrived: use of intravital microscopy in the airway circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:957-958.
291. Thomas JK, Robert DS. Vasculoprotective effects of erythropoietin: new developments and new alternatives. *Circ* 2006;98:1341-1343.
292. Thomason PR, Matzke HA. Effects of ischemia on the hind limb of the rat. *Am J Phys Med* 1975;54:113-131.
293. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
294. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
295. Tidball JG, Daniel TL. Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res* 1986;245:315-322.
296. Tidball JG. Force transmission across muscle membrane. *J Biomech* 1991;24:43-52.
297. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol* 1992;6:1942-1950.
298. Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury. *Br J Sport Med* 37;284-286.
299. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhirst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res* 2001;61:6413-6422.
300. Tredget EE, Wang R, Shen Q, Scott PG, Ghahary A. Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:143-151.
301. Tscherne H, Oestern HJ. A new classification of soft-tissue damage in open and closed fractures. *Unfallheilkunde* 1982;85:111-115.
302. Tyml K, Budreau CH. A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991;10:335-343.
303. Tyml K, Groom AC. Regulation of blood flow in individual capillaries of resting skeletal muscle in frogs. *Microvasc Res* 1980;20:346-357.
304. Tyml K, Mathieu-Costello O, Cheng L, Noble EG. Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles. *J Appl Physiol* 1999;87:1496-1505.
305. van der Meer P, Lipsic E. Erythropoietin: repair of the failing heart. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:185-186.

306. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, and Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;33:1-9.
307. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996;24:131-139.
308. Vanden Hoek TL, Qin Y, Wojcik K, Li ZH, Shao T, Anderson L, Becker LB, and Hamann KJ. Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:141-150.
309. Vaux DL, and Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244.
310. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
311. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:348-355.
312. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 2003;198:971-975.
313. Vollmar B, Jananta J, Yamauchi JI, Menger MD. Attenuation of microvascular reperfusion injury in rat pancreas transplantation by L-arginine. *Transplantation* 1999;67:950-955.
314. Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution micro-scopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res* 1997;54:164-173.
315. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 1992;75:421-430.
316. Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L. Mitogenic effects of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways. *J Cell Physiol* 1996;167:461-468.
317. Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 1999;33:894-9.
318. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-2933.
319. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, et al. Physiological role of tumor necrosis factor in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 2002;16:1630-1632.
320. Watowich S, Hilton D, Lodish HF. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerisation. *Mol Cell Biol* 1994;14:3535-3549.
321. Watowich S, Yoshimura A, Longmore G, Hilton D, Yoshimura Y, Lodish HF. Homodimerisation and consecutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2140-2144.
322. Watzka M, Waha A, Koch A, Schmutzler RK, Bidlingmaier F, von Deimling A, Klingmüller D, Stoffel-Wagner B. An optimized protocol for mRNA quantification using nested competitive RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231(3):813-817.
323. Weatherford TW. Staining of collagenous and non-collagenous structures with picosirius red F3BA. *Ala J Med Sci* 1972;9:383-388.
324. Webster Mh, Patterson J. The photo-electric plethysmograph as a monitor of mikrovascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976;29:182-185.
325. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
326. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem.* 1994;269:22839-22846.
327. Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD. Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999;126:881-889.
328. Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Hausteiner UF, Anderegg U, Saalbach A. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counter-receptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 2004;172:3850-3859.

329. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DP, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 1994;89: 397-410.
330. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004;25:73-77.
331. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosin phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227-236.
332. Wlodawer A, Pavlovsky A, Gustchina A. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci* 1993;2:1373-1382.
333. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999;253:143-156.
334. Worthylake RA, Burrige K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:569-577.
335. Yan Z, Choi S, Liu X, et al. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 2003;278:8826-8836.
336. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003;17:54-1755.
337. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsentler J, Shohami E. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 2005;19:1701-1703.
338. Yoshiko Y, Hirao K, Sakabe K, Seiki K, Takezawa J, Maeda N. Autonomous control of expression of genes for insulin-like growth factors during the proliferation and differentiation of C2C12 mouse myoblasts in serum free culture. *Life Sci* 1996;59:1961-1968.
339. Yoshimura A, Lodish HF. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein pp130. *Mol Cell Biol* 1992;12:706-715.
340. Yoshimura A, D'Andrea AD, Lodish HF. Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and effects receptor metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4139-4143.
341. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 1993;81:2223-2236.
342. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 2002;129:505-516.
343. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *J Biochem* 1993;294:1-14.
344. 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;166:347-357.
345. Zhang L, Bail H, Mittlmeier T, Haas Np, Schaser KD. Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture. *J Trauma* 2003;54:979-985.
346. Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN-gamma gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17.
347. Zhuang H, Patel SV, He TC, Sonstebly SK, Niu Z, Wojchowski DM. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of JAK2. *J Biol Chem* 1994;269:21411-21414.
348. Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K. Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med* 1991;191:47-63.

9 LEBENS LAUF

Name: Mariya Menshykova
Geburtsdatum: 20.09.1980
Geburtsort: Micha Zchakaja, Georgien
Familienstand: ledig
Anschrift: K.-Schumacher-Ring 105
18046 Rostock

Schul Ausbildung:

08/1998-07/2002 Ernst-Barlach-Gymnasium, Rostock
Abschluss: Abitur

Medizinische Ausbildung:

10/2002-06/2009 Universität Rostock Humanmedizin

02/2008-05/2008 1.Tertial des Praktischen Jahres, **Klinik für Innere Medizin**, J.-W.-Goethe-Universität, Frankfurt am Main

05/2008-09/2008 2.Tertial des Praktischen Jahres, **Frauenklinik** Klinikum Süd, Universität Rostock

09/2008-01/2009 3.Tertial des Praktischen Jahres, **Chirurgie**, Klinikum Süd, Rostock

Rostock, Dezember 2008

Mariya Menshykova

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Überlassung des Themas, für Ihre unermüdliche und intensive Betreuung und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei der Versuchsplanung, bei der Durchführung der Experimente, sowie bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse. Frau Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar hat mich wissenschaftliches Arbeiten gelehrt, durch positive Kritik und Ermutigung zur Eigeninitiative meine Motivation sowie mein wissenschaftliches Interesse gestärkt und gefördert.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Chirurgie, insbesondere den Medizinisch Technischen Assistentinnen Berit Blendow, Doris Butzlaff und Dorothea Frenz für die stetige Unterstützung in allen Fragen rund um die vorliegende Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Robert Rotter für seine Unterstützung bedanken, der mich mit viel Geduld und fachlicher Kompetenz die chirurgische Präparation der Versuchstiere, die Durchführung der Intravitalmikroskopie, sowie die Durchführung der Auswertungen gelehrt hat.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Thomas Bittdorf für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen. Durch seine stetige Hilfsbereitschaft bezüglich der Interpretation von Ergebnissen, Vorbereitung von Reagenzien, sowie tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente hat mir Herr Bittdorf bedeutsam bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen.

Zuletzt danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir immer wieder zuteil wurden. Sie haben einen großen Anteil an der entspannten Atmosphäre in dieser Abteilung geleistet, die ich während der gesamten Zeit dort genießen durfte.

THESEN ZUR DISSERTATION

Thema:

Evaluation der Wirkung von Erythropoetin auf die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur

1. Traumatische Verletzungen der peripheren Skelettmuskulatur gehören zu den häufigsten Zuständen im Sport- und Freizeitbereich.
2. Die Prognose komplexer offener Verletzungen wird maßgeblich durch die Schädigung der peripheren Skelettmuskulatur bestimmt.
3. Trotz eines den Leitlinien entsprechenden Weichteilmanagements sind Skelettmuskelverletzungen oft von Komplikationen begleitet.
4. Die Regeneration der Skelettmuskulatur beinhaltet zwei kompetitive Vorgänge: Formation neuer Myofibrillen und Ausbidung des Narbengewebes.
5. Überwiegt die Fibrosierung in seinem Ausmaß die Formation der Myofibrillen, so kommt es zu Muskelverkürzungen und Funktionseinbußen der betroffenen Extremität.
6. Das Ziel der Therapieoptimierung ist es, die Regeneration des Muskelgewebes zu fördern und die Fibrosierung zu reduzieren.
7. EPO und sein Rezeptor sind Gegenstand intensiver Forschung.
8. EPO ist ein bekanntes Zytokin mit pleiotropen Eigenschaften, das die Proliferation, Apoptose und Differenzierung erythroid determinierter Progenitorzellen steuert.
9. In verschiedenen Gewebe und Organen (Herz, Hirn, Niere) konnten zytoprotektive, mitogene und anti-apoptotische Wirkungen von EPO nachgewiesen werden.
10. Die Bindung von EPO an EPOR ist die Voraussetzung für die Entfaltung seiner pleiotropen Eigenschaften.
11. *In vitro* Untersuchungen sind für die Experimente, welche das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose der Zellen analysieren, gut geeignet.
12. Die L8-Myoblastenkultur ist eine myogene Zelllinie, die typische Eigenschaften myogener Progenitorzellen aufweist.
13. Die L8-Myoblasten exprimieren EPOR.
14. Serumentzug löst die Apoptose in der L8-Myoblastenkultur aus.

15. EPO führte in der EPO-Gruppe ohne Serum zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate.
16. Tierexperimentelle *in vivo* Untersuchungen erlauben Analyse komplexer funktioneller Fragestellungen.
17. Mittels der biomechanischen *in vivo* Untersuchung wurden in der hier vorliegenden Studie erstmals die Auswirkungen der einmaligen i.m. EPO-Gabe auf die kontraktillen Funktionen des Skelettmuskels analysiert.
18. Das *in vivo* Modell der Traumainduktion mittels instrumentierter Klemme ist zur Untersuchung kontraktiler Funktionen peripherer Skelettmuskulatur gut geeignet.
19. Biomechanische *in vivo* Untersuchung demonstrierte eine effektive Steigerung der Regeneration der Kontraktionskräfte im Skelettmuskelgewebe über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen unter EPO-Einfluss.
20. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte Methode zur Untersuchung mikrovaskulärer, zellulärer und molekularer Phänomene unter diversen pathologischen und physiologischen Aspekten.
21. Intravitalmikroskopische Untersuchungen demonstrierten lokale anti-inflammatorische, anti-apoptotische und regenerationsfördernde Wirkungen von EPO im peripheren Skelettmuskel.
22. EPO reduziert die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion signifikant.
23. EPO führt zur Erhöhung der nutritiven Blutversorgung im M. soleus nach dem Trauma.
24. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten eine signifikante Reduktion der Apoptoserate im M. soleus nach dem Trauma unter EPO-Einfluss.
25. Histomorphologische Untersuchungen demonstrierten einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate und eine Reduktion der Apoptose der Satellitenzellen sowie eine Reduktion der Fibrose im Skelettmuskelgewebe unter Einfluss von EPO.
26. EPO übernimmt eine regulierende Rolle im Rahmen der Muskelregeneration: die Einhaltung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen der Fibrosierung und Regeneration.
27. Mechanismen der gewebeprotectiven Wirkung von EPO bedürfen weiterer Klärung.

28. Langzeitversuche im Tiermodell sollen ein mögliches onkogenes Potential der Langzeittherapie mit EPO untersuchen und falls notwendig die präventiven Maßnahmen entwickeln.
29. EPO ist ein etabliertes und gut erforschtes Medikament, welches eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Optimierung der posttraumatischen Skelettmuskelheilung repräsentieren kann.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Mariya Menshykova, geboren am 20.09.1980 in Georgien, an Eides Statt, dass die Dissertation:

„Evaluation der Wirkung von Erythropoeitin auf die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur“

ausschließlich von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe dritter Personen verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass alle Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur vollständig angegeben sind.

Rostock, Dezember 2008

Mariya Menshykova

