

Universitätsmedizin Rostock

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Th. Mittlmeier

Wirkung des nicht-secosteroidalen Vitamin-D-Rezeptor-Modulator 2 (VDRM2) und Calcitriol auf die Regeneration der traumatisierten Skelettmuskulatur



Inauguraldissertation

zur Erlangung des
akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Svenja Schleese, geb. Dempki

geboren am 29.12.1991 in Offenburg

Rostock, Dezember 2018

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier
2. Prof. Dr. med. Markus Tiedge
3. PD Dr. med. Heiko Sorg

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	I
Zusammenfassung	II
1. Einleitung	1
1.1 Die periphere Skelettmuskulatur	1
1.1.1 Anatomie und Physiologie	1
1.1.2 Die Regenerationsfähigkeit des Muskels	4
1.1.3 Die Pathophysiologie des stumpfen Muskeltraumas	5
1.1.4 Wachstumsfaktoren und Hormone bei der Muskelregeneration	7
1.2 Calcitriol	9
1.2.1 Synthese, Regulation und Funktion	9
1.2.2 Klinische Verwendung von Calcitriol	12
1.2.3 Calcitriol und Muskelzellen	13
1.3 Vitamin-D-Rezeptor-Modulator-2 (VDRM2)	16
1.3.1 Struktur und Eigenschaften	16
1.3.2 Klinische Anwendung	17
2. Ziel der Studie	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Experimentelles Modell	20
3.1.1 Operationsverlauf zur Traumainduktion	20
3.2 Untersuchungsmethoden	22
3.2.1 Muskelkraft	22
3.2.1.1 Erfassung der Muskelkraft	22
3.2.1.2 Berechnung der Muskelkraft	24
3.2.2 Immunhistochemische und histologische Untersuchungen	24
3.2.2.1 BrdU Immunhistochemie	24
3.2.2.2 CAE Histologie	25
3.2.2.3 TUNEL Histologie	25
3.2.2.4 Histologische Auswertung	26
3.2.2.5 Muskelfaserdiameter	27
3.2.2.6 Muskelgewebefraktion	27
3.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf	28
3.4 Statistische Analyse	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Allgemeine Beobachtungen	31
4.2 Muskelkraft	31
4.3 Kurzkontraktion	31

4.4 Tetanie.....	32
4.5 Proliferation	33
4.6 Apoptose	34
4.7 Leukozyteninfiltration.....	35
4.8 Muskelfaserdiameter	37
4.9 Muskelgewebefraktion.....	38
4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40
5. Diskussion	42
5.1 Diskussion von Material und Methoden.....	42
5.1.1 Etablierte Modelle zur Untersuchung der Muskelregeneration	42
5.1.2 Calcitriol und VDRM2: Dosis und Applikation	43
5.1.3 Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung	44
5.1.4 Diskussion der Untersuchungstechniken	44
5.1.4.1 Muskelkraft.....	44
5.1.4.2 Muskelzellproliferation.....	45
5.1.4.3 Muskelzellapoptose.....	47
5.1.4.4 Lokale Leukozyteninfiltration.....	48
5.2 Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1 Muskelkraft nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2-Applikation	49
5.2.2 Muskelzellproliferation nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2- Applikation.....	50
5.2.3 Muskelzellapoptose nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2- Applikation	52
5.2.4 Lokale Leukozyteninfiltration nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2- Applikation.....	53
5.2.5 Muskelfaserdiameter und -gewebefraktion nach Calcitriol oder VDRM2- Applikation.....	53
6. Limitation und Ausblick	55
7. Thesen	56
8. Literaturverzeichnis	58
9. Danksagung	72
10. Curriculum Vitae	73

Verzeichnis der Abkürzungen

-OH	Hydroxylgruppe
%	Prozent
A	Ampere
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
Cm	Zentimeter
DBP	Vitamin-D-Bindeprotein
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRIP	Vitamin-D-Interaktionsprotein
et al.	und andere
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M.	Musculus
m	Meter
min	Minute
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
N	Newton
N.	Nervus
n	Anzahl
NaCl	Kochsalz
ng	Nanogramm

nmol	Nanomol
p	Wahrscheinlichkeit
PTH	Parathormon
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S	Sekunde
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

Zusammenfassung

Die Verletzung der Muskulatur nach einem Trauma verlängert den Heilungsprozess und schränkt die Funktionalität erheblich ein. Auch langfristige Einschränkungen durch unzureichende Bindegewebsformationen werden beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wieweit das Steroidhormon Calcitriol und der Vitamin-D-Rezeptor-Modulator 2 (VDRM2) die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur nach Trauma bei männlichen Wistar Ratten beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde der linke M. soleus der Tiere kontusioniert und anschließend täglich Calcitriol (n=21; 1µg/kg KG), VDRM2 (n=21; 1µg/kg KG) injiziert. Die Kontrollgruppe (n=21) erhielt eine 10%ige Ethanol-Lösung (2ml/kg KG). Die rechte, nicht operierte Seite der Ratten diente als Referenz für die maximal zu erreichende Kraft. Die Kontraktionskapazität des M. soleus wurde in-vivo durch die Tetanie und die Kurzkontraktion an den Tagen 1, 4 und 14 nach Trauma ermittelt. Das traumatisierte Skelettmuskelgewebe wurde auf Satellitenzellproliferation [Bromdesoxyuridin], apoptotische Zellen [TUNEL-Analyse], Leukozyteninfiltration [CAE-Histologie], den Muskelfaserdiameter und die Muskelgewebefraktion untersucht. In der 14-tägigen Untersuchungszeit nahm die Muskelkraft sowohl bei der Tetanie als auch der Kurzkontraktion in allen drei Gruppen zu. Am 14. Untersuchungstag zeigte sich bei der Kurzkontraktion eine signifikante Verbesserung bei der Calcitriolgruppe (Kontrolle: 47±6%, VDRM2: 62±5%, Calcitriol: 64±4%), bei der Tetanie eine ähnliche Tendenz für Calcitriol und VDRM2 (Kontrolle: 48±9%, VDRM2: 57±6%, Calcitriol: 55±6%). Histologisch konnte am 4. postoperativen Tag ein signifikant verstärktes zelluläres turn-over betrachtet werden für die Tiere der Calcitriolgruppe und teilweise auch für die der VDRM2-Gruppe (BrdU [Zellen/Gesichtsfeld]: Kontrolle: 24±2, VDRM2: 45±4, Calcitriol: 53±6; TUNEL [Zellen/Gesichtsfeld]: Kontrolle: 22±0, VDRM2: 20±2, Calcitriol: 16±1).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit in-vivo Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Calcitriol und VDRM2 auf die Muskelregeneration nach Trauma aufzeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide verwendeten Substanzen einen positiven Effekt auf die Muskelregeneration haben, jedoch zeigt sich Calcitriol als potentere Substanz gegenüber VDRM2. Somit könnten beide Substanzen als adjuvante Therapieansätze bei Weichteiltraumata in Betracht gezogen werden.

1. Einleitung

1.1 Die periphere Skelettmuskulatur

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Die Skelettmuskulatur bildet im menschlichen Körper den aktiven Bewegungsapparat (Anderhuber et al. 2012). Die Fähigkeit zur Verkürzung, die Kontraktilität, basiert auf dem speziellen Aufbau der Muskelzelle (=Muskelfaser) (Aumüller et al. 2017). Die Kontraktion des Muskels über ein Gelenk hinweg führt zu einer entsprechenden Bewegung. Ein Muskel umfasst elastische und kontraktile Elemente, aus deren Zusammenspiel sich die Funktion ergibt (Anderhuber et al. 2012).

Skelettmuskelfasern können bis zu 20cm lang werden und haben einen Durchmesser von 10-100µm. Eine Muskelfaser ist ein Synzytium, eine vielkernige Riesenzelle, deren Kerne durch die Myofilamente an den Rand gedrängt sind (Aumüller et al. 2017). Bei der Fusion mehrerer hundert mesodermaler Myoblasten zu einer Muskelfaser geht die Teilungsfähigkeit verloren. Nur bei den Satellitenzellen ist diese noch erhalten. Ihre Fähigkeit zur Fusion ermöglicht eine beschränkte echte Regeneration (Anderhuber et al. 2012; Grounds & McGeachie 1989).

Unter dem Lichtmikroskop lässt sich die typische Querstreifung der Skelettmuskulatur erkennen. Der anisotrope A-Streifen besteht aus dicken Myosinfilamenten, die an den äußeren Dritteln Myosin-Köpfchen besitzen. In diesen Bereichen ragen dünne Aktinfilamente zwischen die Myosinfilamente hinein. Im mittleren helleren Bereich, dem H-Streifen, gibt es keine Überlagerung, aber eine Quervernetzung der Filamente, den M-Streifen. Der isotrope I-Streifen zeichnet sich durch parallel angeordnete Aktinfilamente aus. Diese sind am Z-Streifen durch Verknüpfungsproteine verankert. Der Abschnitt zwischen zwei Z-Streifen nennt sich Sarkomer und ist 2,5-3µm lang. Die hexagonal angeordneten Filamente werden durch Intermediärfilamente wie Desmin an der Zellmembran befestigt und stabilisiert. Das sarkoplasmatische Retikulum der Muskelfaser dient als Kalziumspeicher und damit der Weiterleitung von Erregung. Denn durch die Freisetzung der Kalziumionen werden physiologische und biochemische Reaktionen ausgelöst, die zu einem Gleiten der Aktinfilamente zwischen die Myosinfilamente führt und damit in der Kontraktion der Skelettmuskelfaser resultiert.

Die willkürliche Innervation erfolgt über efferente Nerven des somatischen Nervensystems. Dabei gliedert sich das Axon einer motorischen Nervenzelle

terminal baumartig auf und versorgt mehrere motorische Endplatten. Dies entspricht einer motorischen Einheit und kann in der Anzahl der innervierten Fasern variieren, um feine und grobe Motorik zu ermöglichen (Aumüller et al. 2017).

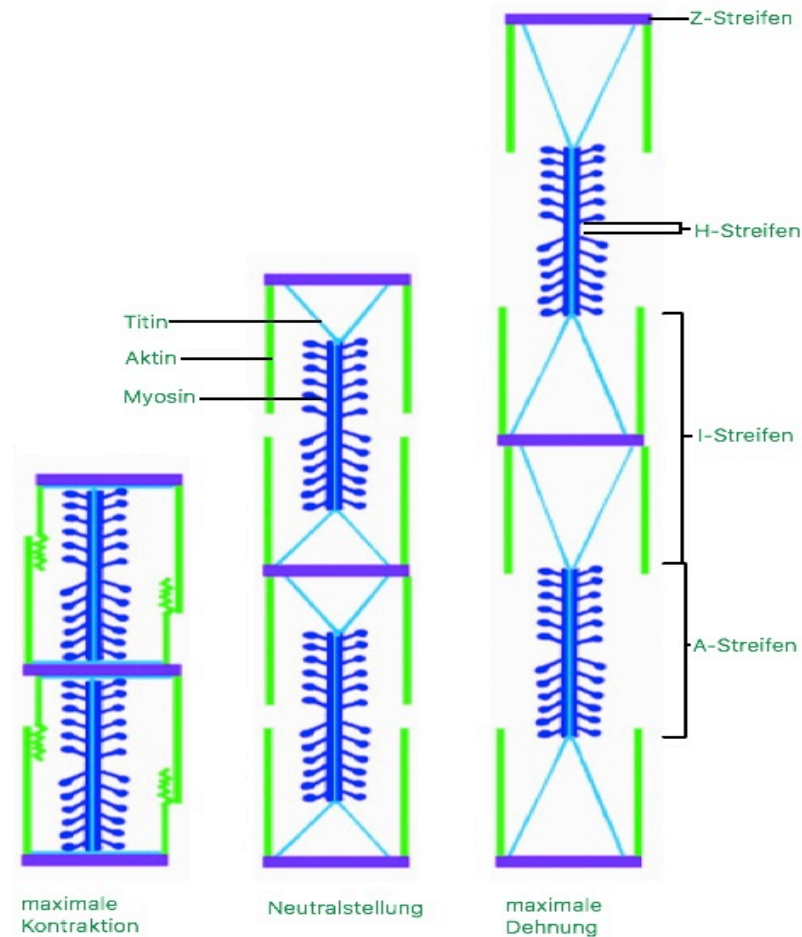


Abb. 1. Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines Sarkomers. Die Myosinfilamente des A-Streifens werden in der Neutralstellung des Sarkomers teilweise von Aktinfilamenten überlagert bei einer Sarkomerlänge von 2,5-3µm. Bei maximaler Kontraktion gleiten die Aktinfilamente entlang den Myosinköpfchen, sodass es zu vermehrter Überlagerung der Filamente kommt, der I-Streifen maximal verkleinert wird und sich die Sarkomerlängen zwischen den Z-Scheiben verkürzt. Bei maximaler Dehnung gibt es kaum noch eine Überlappung zwischen den Filamenten, der I-Streifen ist maximal gedehnt und die Sarkomerlänge maximal erweitert.

Eine Muskelfaser wird von bindegewebigem Endomysium umgeben und mehrere Muskelfasern zusammen bilden ein Primärbündel, umfasst von Perimysium internum. Das Perimysium externum vereinigt mehrere Primärbündel zu einem

Sekundärbündel. Das Epimysium verbindet mehrere Sekundärbündel zum Tertiärbündel, welches Teil der Muskelfaszie ist. In den Bindegewebsstrukturen verlaufen die versorgenden Gefäßnervenbündel (Aumüller et al. 2017).

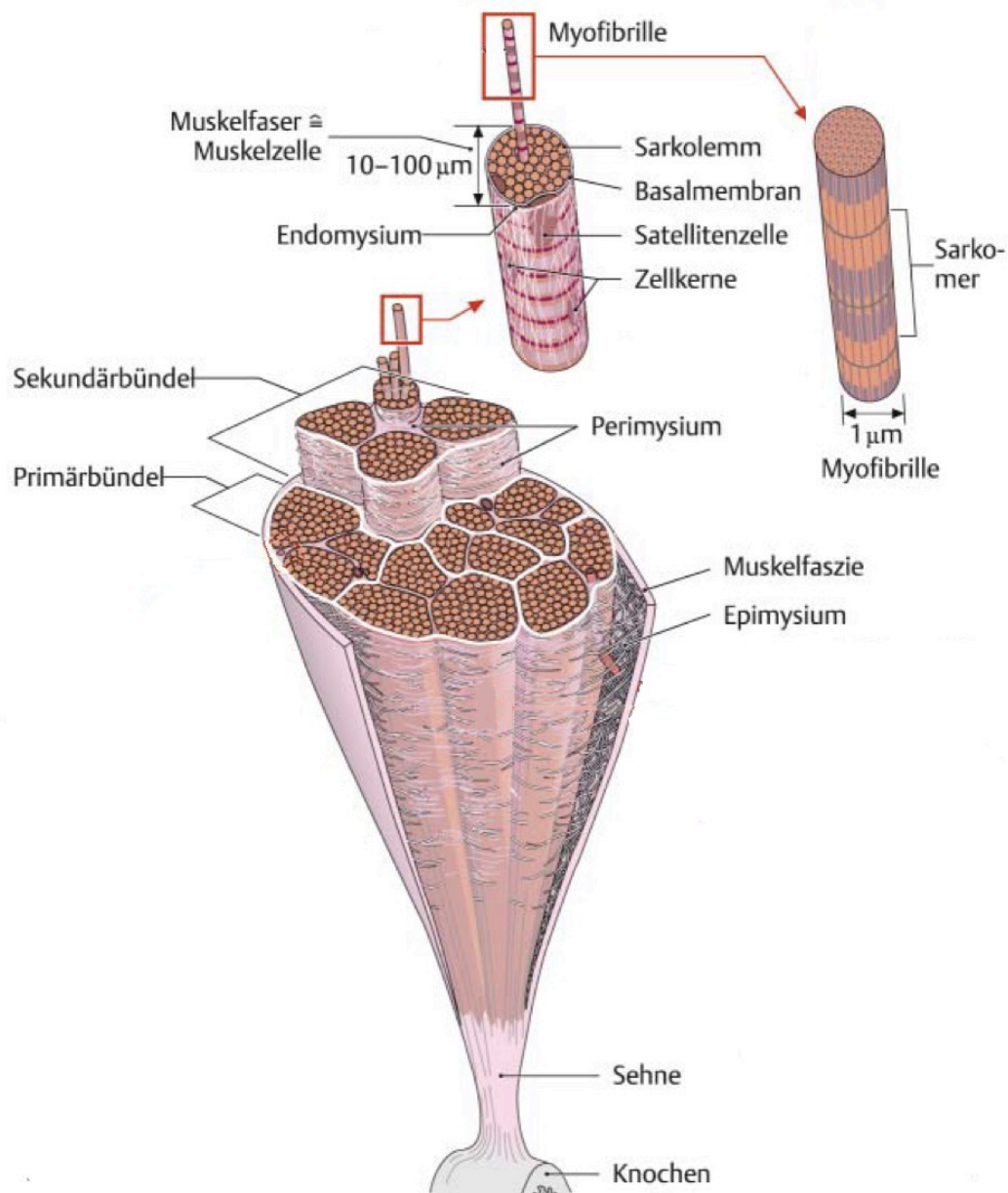


Abb. 2. Aufbau der Skelettmuskulatur, quer angeschnitten. Der Muskelansatz wird durch die Sehne am Knochen verankert. Die Muskelfaszie umfasst den gesamten Muskel und die versorgenden Gefäß-Nerven-Bündel. Das Epimysium und das Perimysium externum und internum fassen Einheiten von Muskelfasern zu Einheiten, den Bündeln, zusammen. Die Muskelfaser bzw. Muskelzelle besteht aus mehreren Myofibrillen, die von einer Basalmembran umhüllt werden. (modifiziert nach Aumüller 2010, S. 57)

Ein Skelettmuskel besteht je nach Funktion aus variierenden Anteilen der zwei Fasertypen. Faser-Typ 1, Slow-Faser, ist gekennzeichnet durch langsame Kontraktion, Ausdauer, viele Mitochondrien und oxidativen Stoffwechsel, viel Myoglobin und dunkler Farbe. Faser-Typ 2, Fast-Faser, wird als schnell kontrahierend, schnell ermüdend und hauptsächlich glykolytisch verstoffwechselnd beschrieben (Aumüller et al. 2017). Der Stoffwechsel der Zelle wird auf das Impulsmuster der innervierenden Nervenzelle angepasst und somit kann sich bei verändertem Impuls auch die Muskelzelle begrenzt umwandeln (Anderhuber et al. 2012).

1.1.2 Die Regenerationsfähigkeit des Muskels

Damit sich Muskelzellen optimal regenerieren können, sollten ihr Plasmalemm und ihre Basallamina nicht verletzt sein, denn sie dienen als Gerüst für die spätere Myotubenformation (Altmeppen et al. 2003). Jedoch ist dies bei fast allen unfallbedingten Zerstörungen der Fall und die Regeneration daher eingeschränkt (Anderhuber et al. 2012). Aus der embryonalen Entwicklung bleiben einige Myoblasten in Form von Satellitenzellen bis ins Erwachsenenalter zurück (Church et al. 1966; Mauro 1961). Sie besitzen die Fähigkeit zu proliferieren, zu Myoblasten zu differenzieren, ein Synzitium zu bilden und ermöglichen damit eine beschränkte echte Regeneration (Anderhuber et al. 2012; Chargé & Rudnicki 2004). Die klassische Gruppe der Satellitenzellen beginnt direkt nach Traumainduktion den Zyklus der Differenzierung zu Myoblasten und Muskelsynzitien. Die aktivierte Gruppe dagegen dient dem Erhalt einer Restkapazität an Satellitenzellen und proliferiert erst, bevor die Differenzierung einsetzt (Zammit et al. 2004; Ehrhardt & Morgan 2005).

Untersuchungen belegen, dass neben den Satellitenzellen auch im Muskel ansässige Stammzellen zur Regeneration des Muskels beitragen. Auch Stammzellen, die im Blut zirkulieren, Stammzellen des Knochenmarks und des mesenchymalen Gewebes unterstützen die Regeneration. Teilweise indem sie sich selbst zu Satellitenzellen oder Myoblasten differenzieren (Chargé & Rudnicki 2004; LaBarge & Blau 2002). Das Ausmaß an Einfluss dieser Zellen auf die Regeneration wird bisher jedoch als deutlich geringer eingeschätzt, als das der Satellitenzellen (Grounds et al. 2002).

1.1.3 Die Pathophysiologie des stumpfen Muskeltraumas

Eine Kontusion entsteht meist durch stumpfe umschriebene Gewalteinwirkung und führt zu einem Hämatom, flächenhafter Blutung (Sugillatio) oder abhängig von der Lokalisation zur Schädigung innerer Organe. Die Kontusionsverletzung ist häufig anzutreffen (Aumüller et al. 2010; Dirix & Tittel 1989).

Bei einer Kontusion der Muskulatur entsteht ein Ödem, teilweise mit Hämatom. Mikroskopisch ist bereits nach einer Stunde eine Desorganisation der Myofilamente nachweisbar. An den Durchtrennungsstellen der Muskelfasern sind nur noch die Z-Linien zu erkennen, die I- und A-Bänder, sowie die H-Zone sind homogenisiert. In den Randzonen kommt es zur Desintegration der Sarkomere und zu starker Kontraktion. Der Höhepunkt der Muskelfaserschädigung ist zwei Stunden nach der Verletzung erreicht. Die Schädigung des Sarkoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien ist erst nach 2 Stunden nachweisbar und verschlechtert sich dann weiter. In den makroskopisch unauffälligen Randbereichen finden sich einzelne kernlose Muskelfasern inmitten normaler Muskelfasern, mittig finden sich breite nekrotische Bereiche mit zerfallenen Muskelfragmenten und in den Gefäßen kommt es zu einer Stase des Blutes und einer randständigen Ansammlung von Leukozyten. 3 bis 6 Stunden nach der Gewalteinwirkung setzt die Nekrose ein. Es kommt zur Schwellung der Muskulatur und einer herdförmigen deutlich begrenzten Nekrose. Die betroffenen Muskelbereiche sind brüchig und es tritt Myoglobin aus dem geschädigten Areal aus. (Fridén & Lieber 1992; Tiidus 2008)

Järvinen et al. beschreibt drei Phasen in der Regeneration des Skelettmuskels. Die erste Phase bezeichnet er als Destruktionsphase, welche durch die Verletzung und Nekrose der Skelettmuskelfaser, Hämatombildung und Einwanderung der inflammatorischen Zellen gekennzeichnet ist (Järvinen et al. 2005). Um den Bereich der Nekrose möglichst gering zu halten bilden sich an den gerissenen Muskelstümpfen sogenannte „Kontraktionskappen“, die aus Fragmenten des zerstörten Plasmalemmes bestehen (Grounds 1991; Hurme et al. 1991). Die Bestandteile der „Kontraktionskappe“, wie z.B. anliegende Mitochondrien haben die Funktion das Komplementsystem zu aktivieren, Makrophagen anzulocken und Mediatoren frei zu setzen (Grounds 1991; Mellerowicz 1996). In dieser Phase wandern überwiegend polymorphnukleäre Leukozyten in das Gewebe ein (Järvinen et al. 2005; Lamb 2005).

In der folgenden Wiederherstellungsphase werden zerstörte Faserelemente phagozytiert und es kommt zu einer Revaskularisation der verletzten Muskelanteile. Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und dienen dem oben genannten Abbau der nekrotischen Zellen (Järvinen et al. 2005; Lamb

2005). Es erfolgt eine Aktivierung der Satellitenzellen und diese interagieren mit Komponenten der Extrazellulärmatrix (Mellerowicz 1996). Die Fibroblasten bilden mit ihrer Produktion von Kollagenfasern ein empfindliches Gleichgewicht, das wichtig für die Struktur und Kontraktilität der Muskelfaser ist. Eine zu starke Proliferation des Bindegewebes führt in Form von Narben zu Funktionseinschränkungen der Muskulatur (Järvinen et al. 2005; Lamb 2005). Eine andauernde Ischämie und niedrige Sauerstoffversorgung fördert die Fibroblastenaktivität (Storch & Talley 1988). Daher ist das Aussprossen neuer Kapillare in das verletzte Areal eine wichtige Grundlage für die Muskelregeneration. Viele Faktoren, auf die zu späterem Zeitpunkt eingegangen wird, beeinflussen diese Revaskularisation. Ein neues Axon distal des geschädigten Bereichs ermöglicht die Reinnervation der zerstörten Muskelzellen (Hurme et al. 1991; Järvinen et al. 2005; Lamb 2005).

Die Umbauphase bezeichnet die dritte und letzte Phase. Die Differenzierung und Fusion von Myoblasten über Myotuben zu Muskelfasern stellt die Grundlage für die Muskelkontraktion dar (Mellerowicz 1996). Die neu entstandenen Muskelfasern strukturieren die vorläufigen Bindegewebsbereiche um und haften sich seitlich an die Extrazellulärmatrix an (Kääriäinen et al. 2000). So ist es im Verlauf der Regeneration möglich, dass das Narbengewebe wieder fast vollständig durch Muskelgewebe ersetzt wird (Järvinen et al. 2005). Eine komplette Wiederangliederung der zerstörten Muskelfaserenden ist jedoch nicht möglich (Vaittinen et al. 2002). Die Funktionalität des Muskels kann jedoch in den meisten Fällen wiederhergestellt werden.

Die Diagnose einer stumpfen Muskelverletzung lässt sich durch eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung des Patienten stellen. Der Patient berichtet über einen plötzlich auftretenden Schmerz nach einem Stoß oder ähnlichem Trauma und über sofortige Funktionseinbuße. Klinisch können eine Schwellung oder ein Hämatom palpabel oder oberflächliche Hautabschürfungen im verletzten Bereich sichtbar werden. Die Prüfung des Bewegungsumfanges und Palpation der betroffenen Extremität kann der Patient als sehr schmerzhaft empfinden. Eine Überprüfung der peripheren Sensibilität und Motorik ist obligatorisch, um das Ausmaß der Kontusion zu bestimmen. Desweiteren kann eine sonografische Bildgebung hilfreich sein, aber auch die Magnetresonanztomografie findet vor allem im Leistungssportbereich vermehrt Anwendung (Müller-Wohlfahrt et al. 2014).

Die Therapie der stumpfen Muskelverletzung erfolgt symptomatisch durch lokale und systemische Gabe von Antiphlogistika (Thorsson et al. 1998), lokaler Kryo-therapie, Aufbringen resorptionsfördernder Salbenverbände und

Ruhigstellung mit anschließender frühfunktioneller Beübung. Eine sonografisch geführte Punktion des Hämatoms kann notwendig werden (Aumüller et al. 2017). Eine operative Therapie wird erst bei Auftreten eines akuten Kompartmentsyndroms als mögliche Hauptkomplikation durchgeführt. Dieses entsteht infolge eines Hämatoms oder posttraumatischen Ödems in einer geschlossenen Muskelloge, wodurch der steigende intrafasziale Druck zu Durchblutungsstörungen und Nervenschädigung führt. Eine operative Fasziotomie zur Druckentlastung ist die Therapie der Wahl.

Weitere Komplikationen können die Infektion des Hämatoms, eine narbige Fibrose oder eine pathologische Verknöcherung (Myositis ossificans) sein (Berchtold & Keller 2007).

1.1.4 Wachstumsfaktoren und Hormone bei der Muskelregeneration

Die oben beschriebenen Vorgänge der Muskelregeneration bieten einige Ansätze zur Intervention verschiedener Wachstumsfaktoren und Hormone.

Bereits das Ausmaß an Schaden des Sarkolemmes nimmt Einfluss auf die folgende Nekrose. Es aktiviert das Komplementsystem und Makrophagen und Leukozyten werden chemotaktisch angezogen. Auch Mediatoren werden so freigesetzt, die zum einen die Phagozytose weiter verstärken, aber auch Satellitenzellen aktivieren und die Revaskularisation fördern. Diverse Faktoren wirken sich auch auf die Aktivität der Fibroblasten aus (Järvinen et al. 2005).

Angiogene Faktoren, die von Makrophagen und Leukozyten sezerniert werden, z.B. „fibroblast growth factor“, Prostaglandin E1 und der Satellitenzellproliferationsfaktor steigern die wichtige frühe Wiederherstellung der Vaskularisation und hemmen damit auch die Fibroblastenproliferation (Mellerowicz 1996; Altmeyen et al. 2003).

Verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone stimulieren die Satellitenzellen zu Proliferation, Differenzierung und Motilität. Ein positiver Einfluss auf die Muskelregeneration ist nachgewiesen für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF), den Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) und das Interleukin-6 (IL-6). Hawke und Garry et al. stellen in Ihrem Review zur Physiologie und Molekularbiologie der Satellitenzellen eine Übersicht über entsprechende Wachstumsfaktoren und Hormone auf (Hawke & Garry 2001).

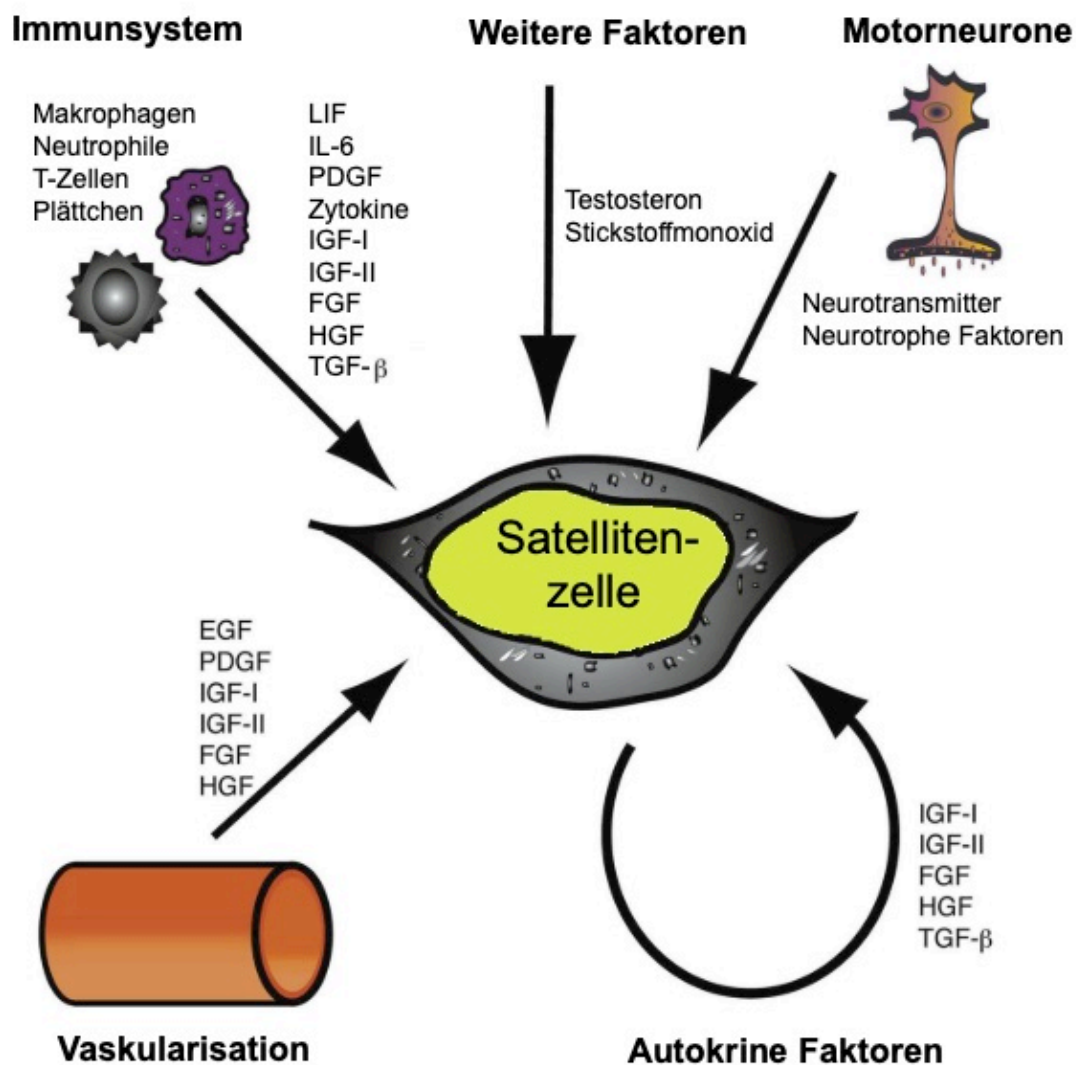


Abb. 3. Faktoren mit Einfluss auf die Aktivierung von myogenen Satellitenzellen. LIF=Leukämiehemmender Faktor, PDGF: Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor; IGF-I: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I; IGF-2: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor II; FGF: Fibroblasten Wachstumsfaktor; HGF: Hepatozyten Wachstumsfaktor; TGF- β : Transformierender Wachstumsfaktor- β ; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor (modifiziert nach Hawke und Garry 2001, Abb. 3).

Stratos et al. konnten im Tierversuch eine verbesserte Muskelregeneration unter der Applikation von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), Erythropoetin, Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF-2), Z-valinyl-alanyl-DL-aspartyl-fluoromethylketone (z-VAD.fmk), Melatonin und Calcitriol feststellen (Stratos et al. 2007; Rotter et al. 2008; Stratos, Richter, et al. 2012; Stratos, Li, et al. 2012; Stratos et al. 2013).

Obwohl dies bereits einige Therapieansätze zur Behandlung des Muskeltraumas mit Wachstumsfaktoren und Hormonen sein könnten, gibt es zu beachten, dass

diese Wachstumsfaktoren auch Einfluss auf die Fibroblasten haben und zu anderen unerwünschten Nebenwirkungen im menschlichen Organismus führen können (Huard et al. 2002).

Daher sollte der hier vorgestellte vielversprechende Ansatz weiterverfolgt werden, mit dem Ziel eine geeignete Substanz zur Wiederherstellung des Muskels nach einem stumpfen Trauma zu finden, mit möglichst wenigen Nebenwirkungen.

1.2 Calcitriol

1.2.1 Synthese, Regulation und Funktion

Calcitriol ist die biologisch aktive Form der Calciferole und wird synonym als Vitamin-D bezeichnet. Im Rahmen der Cholesterinbiosynthese wird das 7-Dehydrocholesterin gebildet, welches durch UV-Licht und Isomerisierung in die Speicherform des Vitamin-D, dem Cholecalciferol, umgewandelt wird (Huppelsberg & Walter 2013). Transportiert wird diese Form im Blut mithilfe des Vitamin-D-Bindeproteins (DBP) zur Leber und dort am C-25 Kohlenstoffatom hydroxyliert, sodass 25-Hydroxycholecalciferol (25-(OH)-D₃) entsteht. Wiederum mit dem DBP gelangt Letzteres in die Niere, in der durch die 1 α -Hydroxylase das aktive 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)₂-D₃) synonym zu Calcitriol gebildet wird (Deutzmann et al. 2016).

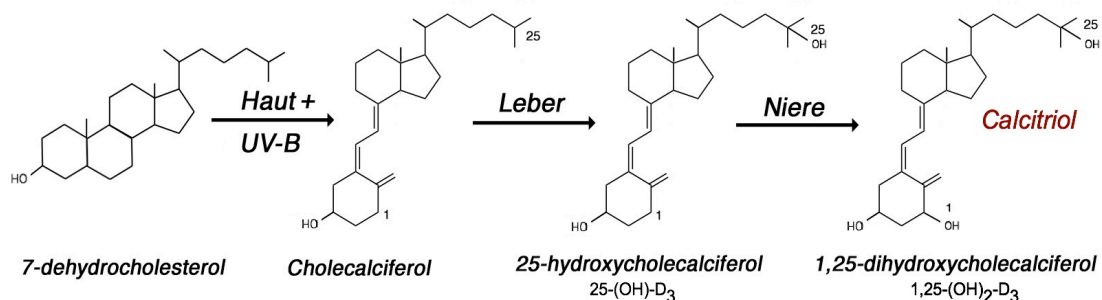


Abb. 4. Synthese von Calcitriol mit Strukturformeln. Von 7-dehydrocholesterin ausgehend wird in verschiedenen Geweben, wie der Haut, der Leber und den Nieren, die aktive Form des Vitamin-D - das Calcitriol - gebildet.

Calcitriol kann auch in geringen Mengen über die Nahrung zugeführt werden, allerdings reicht dies nicht aus, um den täglichen Bedarf zu decken. Besonders Lebensmittel wie fettreicher Fisch, Leber, Ei und einige Pilzsarten enthalten viel Vitamin-D. Empfohlen ist eine tägliche Aufnahme von 5 μ g für Kinder und

Erwachsene und 10µg für Säuglinge und Ältere (>65 Jahre). Von einer unzureichenden Vitamin-D Versorgung wird ab Werten unter 25nmol/l im Blutserum gesprochen (Linseisen et al. 2011). Jedoch gibt es unterschiedliche Auffassungen, die den optimalen Bereich des Serumspiegels betreffen (Holick et al. 2011).

Da der Knochenstoffwechsel eine Hauptaufgabe des Calcitriols ist, spielen das Parathormon, Calcium und Phosphat auch eine entscheidende Rolle in der Regulation dessen Synthese. Parathormon stimuliert durch eine erhöhte Transkription der 1α -Hydroxylase die Biosynthese und auch ein Calcium- sowie Phosphat-Mangel wirken anregend. Prolactin, ein Hypophysenhormon, steigert ebenfalls die Bildung von Calcitriol. Im Zuge der negativen Rückkopplung hemmt Calcitriol selbst die 1α -Hydroxylase (Deutzmann et al. 2016). Weiterhin sind auch Zytokine in Immunzellen bekannt, die einen Einfluss auf den Vitamin-D-Stoffwechsel der Immunzellen haben. So fördern Interferon-(INF)- γ und Tumornekrosefaktor-(TNF)- α die 1α -Hydroxylierung und Entstehung von Calcitriol (Barker et al. 2013; Holick 2007; Linseisen et al. 2011). Interleukin-(IL)-4 setzt dagegen an $25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ an und stimuliert dessen Abbau zu $24,25\text{-Dihydroxycholecalciferol}$ (Barker et al. 2013).

Calcitriol bindet an dem $1,25\text{-Dihydrocholecalciferol}$ -Rezeptor (Vitamin-D-Rezeptor, VDR). Seine Wirkung erzielt Calcitriol auf verschiedene Weisen. Zum einen schnell wirksam über die Modulation von Signaltransduktionsprozessen, die bisher weitestgehend unbekannt sind, jedoch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentrationen erklären, sowie Transportprozesse im Dünndarm. Zum anderen über eine verzögerte Reaktion durch Transkription und Translation (Girgis et al. 2013; Deutzmann et al. 2016). Der VDR gehört zur Familie der Steroid- bzw. Thyroidhormonrezeptoren (Mangelsdorf et al. 1995). Nach der Bindung eines Liganden an den VDR vollzieht dieser eine Konformationsänderung, die eine Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ermöglicht (Bettoun et al. 2003; Lemon & Freedman 1996). Der VDR-RXR-Komplex wandert zum Nucleus, um dort an die Promoter Region der zu transkribierenden Gene zu binden. In der Promoterregion befinden sich weitere Co-Aktivatoren und ein VDR-Interaktionsprotein-(DRIP)-Komplex, welche mit dem VDR-RXR-Heterodimer interagieren. Die daraus resultierenden enzymatischen Reaktionen führen zu einer Veränderung des Chromatins und dadurch wird letztendlich die Transkription initiiert (Rachez & Freedman 2000).

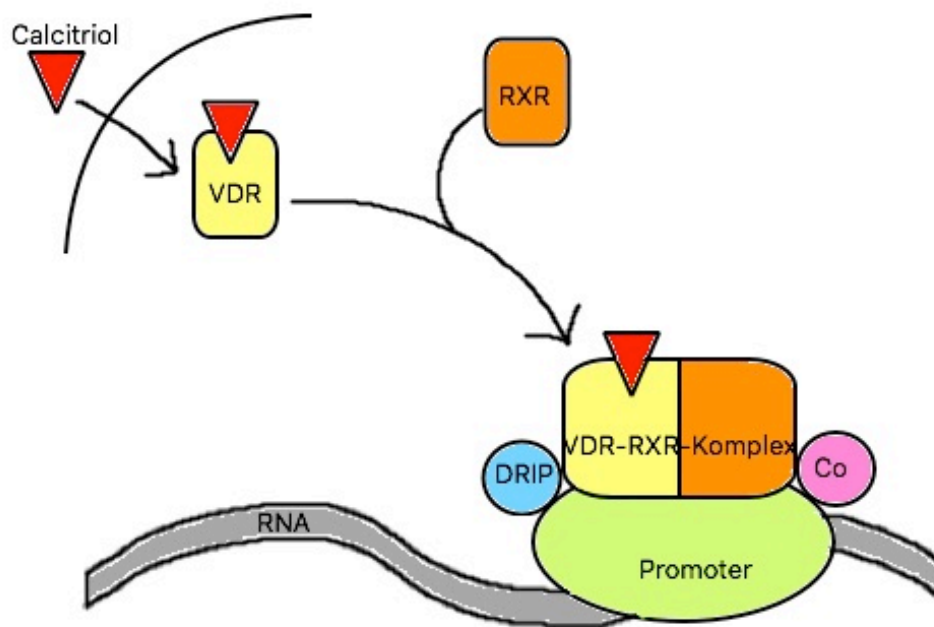


Abb. 5. Vitamin-D-Rezeptor: Calcitriol bindet intrazellulär am Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Es kommt zur Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und Anlagerung des VDR-Interaktionsprotein-Komplex (DRIP), sowie Co-Aktivatoren (Co). Daraufhin beginnt die Transkription.

Die wichtigste Funktion des Calcitriols ist die Erhöhung des Plasmaspiegels an Calcium (Deutzmann et al. 2016). Ziel ist es, dass die Calciumkonzentration im Blut konstant zwischen 2,1-2,6 mmol/l gehalten wird (Huppelsberg & Walter 2013). Dieses Ziel wird durch Interaktionen in der Niere, dem Darm und den Knochen erreicht (Garcia et al. 2011). Die Reabsorption von Calcium und Phosphat wird in der Niere im Zusammenspiel mit Parathormon (PTH) ermöglicht. Calcitriol stimuliert die Synthese wichtiger Transportproteine für diesen Vorgang. Auch im Darm werden Calcium und Phosphat durch die Induktion von Calcium-ATPasen und -kanälen und calciumbindenden Proteinen vermehrt rückresorbiert. Im Knochenstoffwechsel steigert Calcitriol die Synthese der Knochenmatrix und die Knochenmineralisation, diese vor allem indirekt durch Bereitstellung von Calcium. Die Stimulation von am Knochenaufbau und -umbau beteiligten Proteinen, aber auch der Osteoklastendifferenzierung sind maßgeblich für die Knochenhomöostase (Deutzmann et al. 2016).

1.2.2 Klinische Verwendung von Calcitriol

Ein Mangel an Vitamin-D führt bei Kindern zu dem bekannten Krankheitsbild der Rachitis, genauer gesagt zu der Unterform der Vitamin-D-Mangel-Rachitis. Therapeutisch erfolgt die orale Substitution von Vitamin-D in Kombination mit Calcium entsprechend des Alters des erkrankten Kindes. Aber auch eine kurzzeitige intravenöse Gabe mit 10%iger Calcium-Glukonat-Lösung (1-2ml/kg Körpergewicht) ist bei Krämpfen möglich. Prophylaktisch wird eine Vitamin-D Substitution von 500IU im ersten Lebensjahr und in Risikogruppen empfohlen (Schnabel 2015; Moß 2016).

Im Erwachsenenalter - vornehmlich in der Altersgruppe der über 65-jährigen Männer und bei postmenopausalen Frauen - begünstigt ein Mangel an Vitamin-D Osteoporose. Eine 25-Hydroxy-Vitamin-D-Serum-Konzentration kleiner als 20 ng/ml (<50 nmol/l) wird mit einem mäßig erhöhten Risiko für proximale Femurfrakturen und nichtvertebrale Frakturen in Verbindung gebracht. Das Sturzrisiko gilt bei einem Vitamin-D-Mangel ebenfalls als erhöht (H. A. Bischoff et al. 2003; Holick 2006). Da es sich bei diesem Mangel um einen leicht zu behebbenden Risikofaktor der Osteoporose handelt, wird therapeutisch und auch prophylaktisch ein 25-(OH)-D₃-Wert von 75-110nmol/l zur Sturz- und Frakturreduktion empfohlen (Bischoff-Ferrari et al. 2009). Zu erreichen ist dies am besten mit einer täglichen Supplementierung von 800-1000IE Vitamin-D und der Aufnahme von 1000mg Calcium (Bischoff-Ferrari et al. 2009; Cameron et al. 2012; Ross 2011). Für das synthetische Vitamin-D-Derivat Alfacalcidol (1-Alpha-Hydroxy-Vitamin D₃) (0,5µg 2x täglich) und für Calcitriol ist bei älteren Frauen und Männern ebenfalls eine Abnahme der Sturzrate anzunehmen (O'Donnell et al. 2008).

Calcitriol hat weitere Zielgewebe, in denen es seine Wirkung entfaltet. Es ist nachgewiesen, dass die 1 α -Hydroxylase auch in Gewebezellen wie Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Prostata- und Dickdarmzellen, sowie Keratinozyten vorkommt und den letzten Schritt der Vitamin-D-Synthese dort vollziehen kann (Holick 2007; Lehmann et al. 1999; Bikle et al. 1994; Zehnder et al. 2001). In letzteren Zellen ist auch die 25-Hydroxylase vorhanden und ermöglicht damit, dass dort die Vitamin-D-Synthese, ausgehend vom 7-Dehydrocholesterin, stattfinden kann (Lehmann et al. 1999; Seifert et al. 2009). Das extrarenal gebildete Calcitriol dient zu ortsständigen Prozessen, wie der Regulierung und Differenzierung der Zellen, und wird kaum ins Blut abgegeben, um dort am Calciumstoffwechsel teilzunehmen (Holick 2007; Srikuea et al. 2012).

In der Blutbahn zirkulierendes, renal gebildetes Calcitriol wirkt auch an anderen Geweben. Eine notwendige Grundlage dafür sind VDR am jeweiligen

Zielgewebe. Reichrath et al. wiesen 1996 VDR in der menschlichen Haut und 1998 in menschlichem zervikalem Gewebe und Colston et al. 1994 im menschlichen Duodenum nach (Colston et al. 1994; Reichrath et al. 1997; Reichrath et al. 1998).

Unter der Psoriasis vulgaris, die umgangssprachlich auch als Schuppenflechte bezeichnet wird, leiden in Deutschland ca. 1,6 Millionen Menschen (Nevitt & Hutchinson 1996). Bei der Psoriasis handelt es sich um eine Immunreaktion der Haut, die durch eine ausgeprägte Entzündungsreaktion, eine epidermale Hyperproliferation und gestörte Keratinozytendifferenzierung gekennzeichnet ist (Nestle et al. 2009). In der Therapie der Psoriasis vulgaris kommen auch Vitamin-D-Analoga zum Einsatz (DDG (Deutsche Dermatologische Gesellschaft) 2017). Die hauptsächliche Wirkung von Calcitriol und seinen Derivaten beruht auf einer rezeptorvermittelten Reaktion. Durch Bindung des Liganden wird eine Signaltransduktion in Gang gesetzt, die dazu führt, dass regulatorische DNA-Abschnitte exprimiert werden. So werden beispielsweise die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 verstärkt gebildet und das pro-inflammatorische Zytokin IL-8 unterdrückt (Boonstra et al. 2001). Calcitriol unterdrückt die Proliferation der Keratinozyten und fördert deren Differenzierung (Takeuchi et al. 1998).

1.2.3 Calcitriol und Muskelzellen

Es ist bereits mehrfach nachgewiesen, dass auch in Muskelzellen von Menschen und verschiedenen Tieren VDR exprimiert sind (Simpson et al. 1985; Srikuea et al. 2012; Bischoff et al. 2001; Christian M. Girgis et al. 2014; Garcia et al. 2011). So kann Calcitriol an den Rezeptor binden und löst eine Signalkaskade aus, die dazu führt, dass Gene transkribiert werden (Feldman et al. 2013). Die VDR sind in Myoblasten hauptsächlich im Bereich des Nukleus lokalisiert, in Myotuben, den Vorläuferzellen der Muskelfasern, hingegen im Zytoplasma. Dieser lokale Unterschied steht im Zusammenhang mit der Anzahl von RXR, denn eine vermehrte Anzahl, wie in den Myotuben vorhanden, führt zu einer erhöhten Präsenz im Zytoplasma. Nach Gabe von Calcitriol ändert sich dieses Verhältnis in den Myotuben zugunsten des Nucleus (Srikuea et al. 2012). Auch die Anzahl der VDR steigt nach Calcitriolgabe. Dies konnte Girgis et al. in Muskelzellen von Mäusen nachweisen (Christian M Girgis et al. 2014). Aber auch in klinischen Studien konnte ein Zusammenhang mit Calcitriolsubstitution und erhöhter VDR-Expression hergestellt werden (Pojednic et al. 2015; Ceglia & Harris 2013; Ceglia et al. 2013). Es gibt aber auch Studien, die das Vorhandensein von VDR in Muskelzellen in Frage stellen (Wang & DeLuca 2011; Stumpf et al. 1979). Die

genauen Prozesse und Wirkungsweisen des Calcitriols auf Muskelzellen sind noch nicht bis ins Detail bekannt und bedürfen weiterer Erforschung, allerdings gibt es bereits erste Erkenntnisse. So konnte Girgis in in vitro Untersuchungen von murinen C2C12 Zellen die Expression von VDR, CYP27B1 (1 α -Hydroxylase), CYP24A1 (24-Hydroxylase) und dem Vitamin-D-Bindungsprotein auf Transkriptionsebene nachweisen. Calcitriol hat Einfluss auf die Expression einiger Gene des Zellzykluses, so wird verstärkt ATM und Rb gebildet und c-myc, cyclin D1 dagegen vermindert. In Verbindung mit einer posttranslationalen Hypophosphorylierung an Rb führt dies zu einem Arrest des Zellzykluses am G1-S Restriktionspunkt (Girgis et al. 2013).

Calcitriol wirkt im Muskel nicht nur transkriptionsvermittelt. Es wirkt regulatorisch auf die Proteinkinase A (PKA)/ cAMP, Proteinkinase B (PKB), Proteinkinase C (PKC) /cAMK und verschiedene MAP-Kinase-Signalwege (Girgis et al. 2013; Dirks-Naylor & Lennon-Edwards 2011). Ein vergrößerter Muskelfaserdiameter, vermehrtes Vorhandensein von Follistatin, einem Transkriptionsfaktor, und die Reduktion von Myostatin sind weitere Reaktionen auf Calcitriolgabe (Christian M. Girgis et al. 2014). Die Proteine der Muskelkontraktion, Aktin und Troponin C, sind in Tierversuchen bei Tieren mit regelrechten Vitamin-D-Spiegeln ausgeprägter vorhanden als bei Tieren mit einem Vitamin-D-Mangel (de Boland et al. 1983; Pointon et al. 1979). Der intrazelluläre Calciumspiegel kann durch Calcitriol verändert werden, indem eine schnelle IP3-vermittelte Calciumverschiebung vom Sarkoplasmatischen Retikulum aus in das Zytosol stattfindet, die wiederum über SOCE-(Store operated calcium entry)- und VDCC-(Voltage-dependent calcium channel)-Aktivität zu einem Calciumeinstrom von extrazellulär führt. Diese Mechanismen spielen eine Rolle in der Muskeldifferenzierung und der Muskelkontraktion (Boland 1986; Girgis et al. 2013).

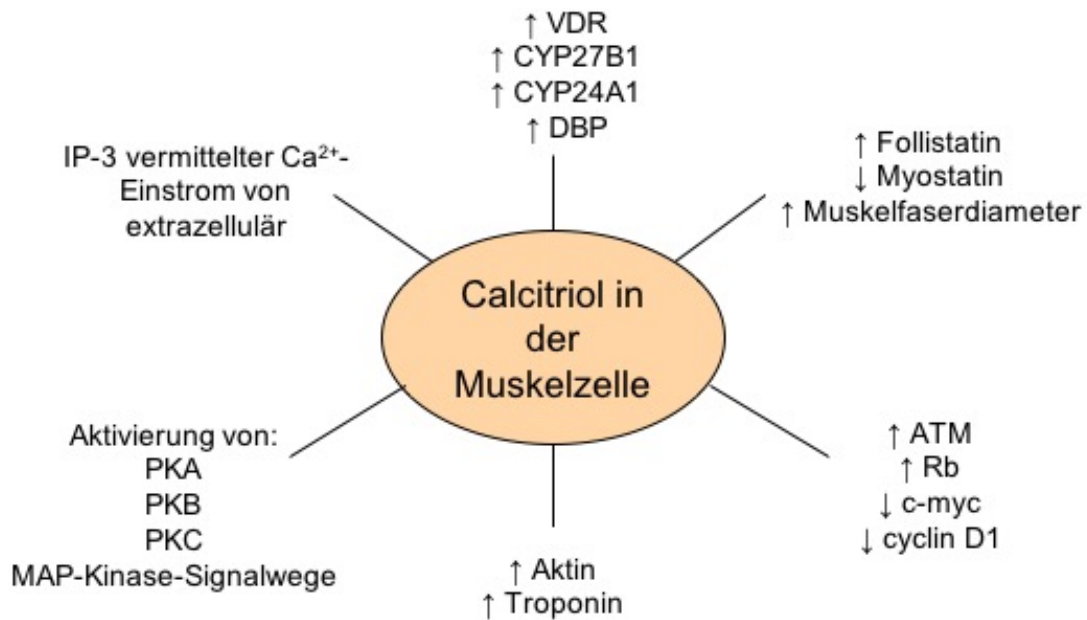


Abb. 6. Wirkung von Calcitriol auf die Muskelzelle. VDR: Vitamin-D-Rezeptor; DBP: Vitamin-D-Bindeprotein; ATM: Ataxia-telangiectasia-mutierte-Kinase; Rb: Retinoblastomprotein; c-myc: Myelocytomatosis Onkogen; PKA: Proteinkinase A; PKB: Proteinkinase B; PKC: Proteinkinase C; IP-3: Inositoltriphosphat.

Das Krankheitsbild der Sarkopenie ist im klinischen und wissenschaftlichen Gebrauch nicht klar definiert, aber es ist gekennzeichnet durch einen generalisierten und langsam fortschreitenden Abbau an Skelettmuskulatur, was sowohl Muskelmasse und -kraft betrifft. Dies kann zu physischen Einschränkungen, reduzierter Lebensqualität oder sogar dem Tod führen (Wagatsuma & Sakuma 2014; Delmonico et al. 2007). Sarkopenie ist ein wichtiges gesundheitsgesellschaftliches Problem, dass sowohl im Alter eine relevante Rolle spielt, als auch bei chronischen Erkrankungen, Krebserkrankungen, bei Dialysepatienten und HIV/Aids (Garcia et al. 2011). Ein Zusammenhang von Sarkopenie und Vitamin-D-Mangel ist bereits mehrfach beschrieben (Wagatsuma & Sakuma 2014; Tanner & Harwell 2015; Hassan-Smith et al. 2017). Im erhöhten Lebensalter ist die Sarkopenie häufig anzutreffen. Sowohl der Vitamin-D-Spiegel, als auch die VDR-Dichte ist im Alter meist erniedrigt (Bischoff-Ferrari et al. 2004). Ein erhöhter Vitamin-D-Spiegel geht im Alter mit einer erhöhten Muskelkraft einher (Bischoff et al. 1999; Beaudart et al. 2014; Stockton et al. 2010; Wagatsuma & Sakuma 2014). In alten Ratten konnten Chanet et al. eine reduzierte Synthese der Muskelproteine bei Vitamin-D-Mangel nachweisen (Chanet et al. 2017). Eine Vitamin-D-Substitution kann daher eine Möglichkeit sein positiv auf die fortschreitende Muskelreduktion einzuwirken (Bruyère et al. 2017).

Im Tierversuch mit Ratten wies Stratos eine gesteigerte Regeneration des Muskels nach stumpfen Muskeltrauma durch Calcitriolapplikation nach. Eine erniedrigte Zahl an apoptotischen Zellen und eine gesteigerte Zahl an proliferierenden Zellen konnten im Heilungsverlauf histologisch nachgewiesen werden. Funktionell konnte eine verbesserte tetanische Muskelkraft verzeichnet werden. Calcitriol könnte daher eine alternative Therapie in der Behandlung von Muskeltraumata darstellen (Stratos et al. 2013).

1.3 Vitamin-D-Rezeptor-Modulator-2 (VDRM2)

1.3.1 Struktur und Eigenschaften

Es wurden bisher etwas über 100 Vitamin-D-Rezeptor-Modulatoren entwickelt, die durch das Fehlen der 9,10-Steroidstruktur des Calcitriols charakterisiert sind. Bi- und tri-aromatische Triole, Podocarbonsäurederivate, Lumisterolderivate und Diarylmethane sind synthetische Pendanten zu Calcitriol. Letzterer Gruppe gehört VDRM2 (LSN2148936) an (Makishima & Yamada 2011; Stayrook et al. 2011). Die Vitamin-D-Rezeptor Modulatoren (VDRMs) werden vom VDR als Liganden erkannt und binden auf ähnliche Weise wie der eigentliche Ligand Calcitriol (Boehm et al. 1999; Yamada & Makishima 2014). Dadurch können die VDRMs ähnliche Transkriptions- und Signalprozesse in Gang setzen. Jedoch variiert die Potenz der VDRMs untereinander und auch im Vergleich zu Calcitriol (Makishima 2015). Das ist begründet in ihren chemischen Eigenschaften, denn diese entscheiden z.B. darüber wie, wo und mit welcher Bindungsart an den Rezeptor gebunden wird. Hydrophobe/-phile Eigenschaften beeinflussen die Bindungsfähigkeit an den Vitamin-D-Bindeproteinen (DBP). Die strukturellen Modifikationen am VDRM-Grundgerüst beeinflussen die Transkriptionsstärke (Yamada & Makishima 2014; Makishima 2015). Ein Vorteil der abweichenden chemischen Struktur von VDRM2 ist, dass es nicht mehr als Substrat des Enzyms CYP24A1 erkannt wird, welches Calcitriol abbaut und somit dessen Wirkung reduziert (Roberts et al. 2017). VDRM2 als Diarylmethan weist einige Strukturähnlichkeiten zu Calcitriol auf (Yamada & Makishima 2014).

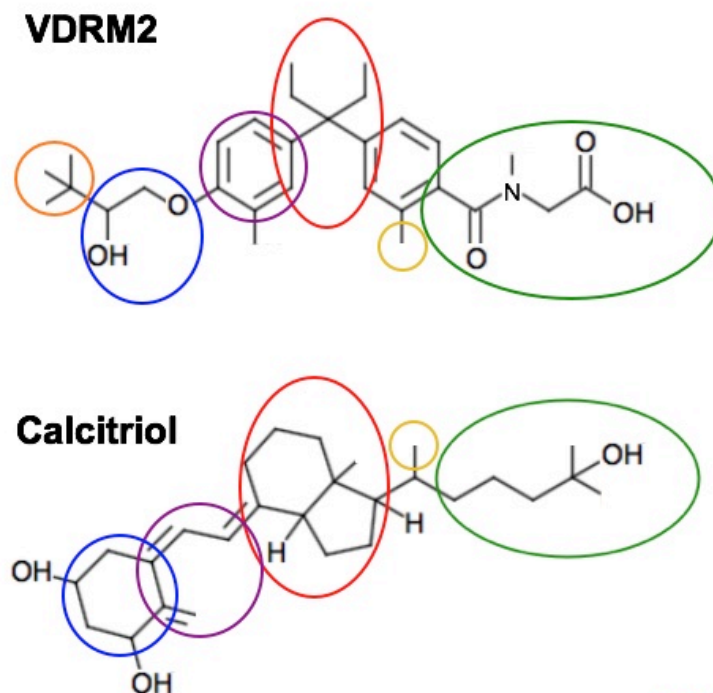


Abb. 7. Vergleich der Strukturformeln von VDRM2 und Calcitriol. Analoge Strukturbestandteile: grüner Kreis: Seitenkette; gelber Kreis: 21-Methyl-Gruppe (variiert bei anderen Analoga); roter Kreis: CD-Ring; magenta Kreis: konjugiertes Trien; blauer Kreis: A-Ring. Der orangene Kreis besitzt kein entsprechendes Element bei Calcitriol und ist zum Wasserkanal ausgerichtet.

Für VDRM2 wurde bereits mehrfach seine Funktion als VDR-Agonist nachgewiesen. Allerdings differiert die Potenz des Analogons in den verschiedenen Zielgeweben (Sato et al. 2010; Roberts et al. 2017). Roberts et al. konnte mithilfe spezieller RNA Auswertungen nachweisen, dass sich über 80% der induzierten bzw. supprimierten Gene von Calcitriol und VDRM2 überschneiden (Roberts et al. 2017). Im Vergleich zu Calcitriol wurden bei VDRM2-Gaben bisher keine pathologischen hyperkalzämischen Nebenwirkungen nachgewiesen (Sato et al. 2010; Roberts et al. 2017). Für VDRM2 liegt der Schwellenwert für die Induktion einer Hyperkalzämie in Ratten bei ca. 4,6µg/kg KG und bietet damit einen hohen Sicherheitsbereich bei der Anwendung (Sato et al. 2010).

1.3.2 Klinische Anwendung

Herausforderungen in der klinischen Nutzung der Interaktion am VDR sind die dabei entstehenden Nebeneffekte. Diese können gewebespezifisch sein oder aber den gesamten Organismus betreffen (Roberts et al. 2017; Sato et al. 2010; Ma et al. 2006; Boehm et al. 1999). Dadurch ist der Einsatz von Vitamin-D und

seinen steroidal Analoga begrenzt. Genau dieses Problem können die synthetisch hergestellten VDRMs lösen (Boehm et al. 1999; Makishima 2015; Sato et al. 2010; Ma et al. 2006). Denn sie binden spezifischer als Vitamin-D und seine steroidal Analoga und lösen nachweislich seltener eine Hyperkalzämie aus (Ma et al. 2006; Stayrook et al. 2011; Sato et al. 2010; Roberts et al. 2017; Na et al. 2011).

So gibt es bereits präklinische Studien zur Anwendung von VDRMs mit durchaus vielversprechenden Ergebnissen:

Ma et al. untersuchten die topische Anwendung von VDRMs bei Mäusen mit Psoriasis und konnten eine reduzierte Hyperproliferation und verstärkte Zelldifferenzierung nachweisen und das mit einem bis zu 900-fach besseren therapeutischen Index für Hyperkalzämie als Calcitriol (Ma et al. 2006).

Sato et al. konnte für VDRM2 einen positiven Effekt im Knochenstoffwechsel belegen. Bei osteopenischen, ovariectomierten Ratten wurde eine verbesserte Knochendichte nach der Behandlung mit nur 0.03µg/kg KG VDRM2 festgestellt, ohne dabei eine Hyperkalzämie zu induzieren. Damit hat VDRM2 einen 57-fachen Sicherheitsabstand von der Dosis zum Erreichen des knochenverdichtenden Effekts und der Dosis zur Hyperkalzämieinduktion (Sato et al. 2010).

In Zellreihen und im Tierversuch mit Ratten wiesen Roberts et al. unter Verwendung von VDRM2 eine Reduktion der Tumormasse bei Prostatakarzinomen nach (Roberts et al. 2017).

Zusammenfassend zeigen VDRMs, dass sie eine ähnliche Wirkung wie Calcitriol aufweisen, ohne dessen starke Nebenwirkungen. Bei Krankheitsbildern wie Rachitits, Osteoporose und Psoriasis vulgaris wird Calcitriol, wie bereits beschrieben, zur Therapie verwendet. Daher könnten auch die VDRMs in diesen Bereichen zum Einsatz gelangen. Die beschriebenen Studien sprechen dafür, dass mit den VDRMs eine neue Möglichkeit gegeben ist, die positiven Effekte der VDR-Aktivierung in verschiedenen Geweben auszuschöpfen (Ma et al. 2006; Roberts et al. 2017; Sato et al. 2010; Boehm et al. 1999; Makishima 2015). Da Calcitriol die Muskelregeneration fördert (Stratos et al. 2013), kann angenommen werden, dass für VDRM2 eine ähnliche Wirkung zu erwarten ist.

2. Ziel der Studie

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Wirkung des nicht-secosteroidalen Vitamin-D-Rezeptor-Modulators 2 und von Calcitriol auf die Regeneration der peripheren Skelettmuskulatur nach einem Muskeltrauma zu untersuchen. Insbesondere auf folgende Punkte wurde dabei eingegangen:

- Biomechanische Untersuchung des Kontraktionsvermögens und der Muskelkraft der geschädigten Muskulatur nach Gabe von VDRM2 und Calcitriol
- Histologische Analyse von Apoptose, Proliferation, lokaler Leukozyteninfiltration, Muskelgewebefraktion und Muskelfaserdiameter im Muskel nach Applikation von VDRM2 und Calcitriol
- Vergleich der Wirkung von VDRM2 und Calcitriol bei der Regeneration des M. soleus nach Trauma

3. Material und Methoden

3.1 Experimentelles Modell

Die Versuche erfolgten an männlichen Ratten der Gattung Wistar (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und ihr Gewicht betrug zwischen 300-400g. Entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter PD Dr. rer. nat. D. Zechner) artgerecht bei 12h Tag-Nacht-Rhythmus und unter Bereitstellung von Laborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten. Die Tiere hatten eine Eingewöhnungszeit von einer Woche an die genannten Laborbedingungen bevor Experimente durchgeführt wurden. Für das wissenschaftliche Vorhaben lag eine Genehmigung des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern (Aktenzeichen 7221.3-1.1-048/10-1) vor.

3.1.1 Operationsverlauf zur Traumainduktion

Die Tiere wurden durch Randomisierung den einzelnen Gruppen zugeordnet. Sie erhielten eine i.p. Injektion mit Pentobarbital-Natrium 6% (55mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos Deutschland) zur Narkose. Daraufhin wurde der linke Hinterlauf rasiert, mit Povidon-Iod (Betasisodona®, Mundipharma, Limburg, Deutschland) desinfiziert und das Tier in Bauchlage gelagert. Eine Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizintechnische Geräte, Pfaffing, Deutschland) gewährte jederzeit eine konstante Körperkerntemperatur bei 36-37°C. Für die Versuche wurden mikrochirurgische Instrumente verwendet und unter nicht sterilen Bedingungen gearbeitet.

Das Operationsverfahren richtete sich nach der bereits erprobten Technik von Stratos et al. (Stratos et al. 2007):

Mit einem 2,5cm langen Schnitt wurde der Hinterlauf postero-lateral auf der gedachten Linie zwischen Patella und Sprunggelenk eröffnet. Nach Präparation und Darstellung der Faszie wurde diese in der Länge des Zugangs inzidiert. Daran anschließend erfolgte die Präparation der Beugemuskulatur (M. gastrocnemius / M. soleus). Der laterale Muskelbauch des M. gastrocnemius wurde soweit mobilisiert, dass der M. soleus frei gelegt und mittels einer instrumentierten Klemme kontusioniert werden konnte. Die Klemme war an den Branchen leicht gebogen, um den Muskel in voller Breite erfassen zu können. Die am M. soleus angewandte Kontusionskraft wurde durch die instrumentierte Klemme über das Messgerät DMC plus (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH,

Darmstadt, Deutschland) und einer speziell entwickelten Softwareanwendung in Echtzeit gemessen. Diese Software wurde am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock entwickelt und auch die Kalibrierung der Geräte fand dort statt. Die Kontusion erfolgte über die ganze Länge des M. soleus mit einer Kraft von 25N siebenmal für je 10s.

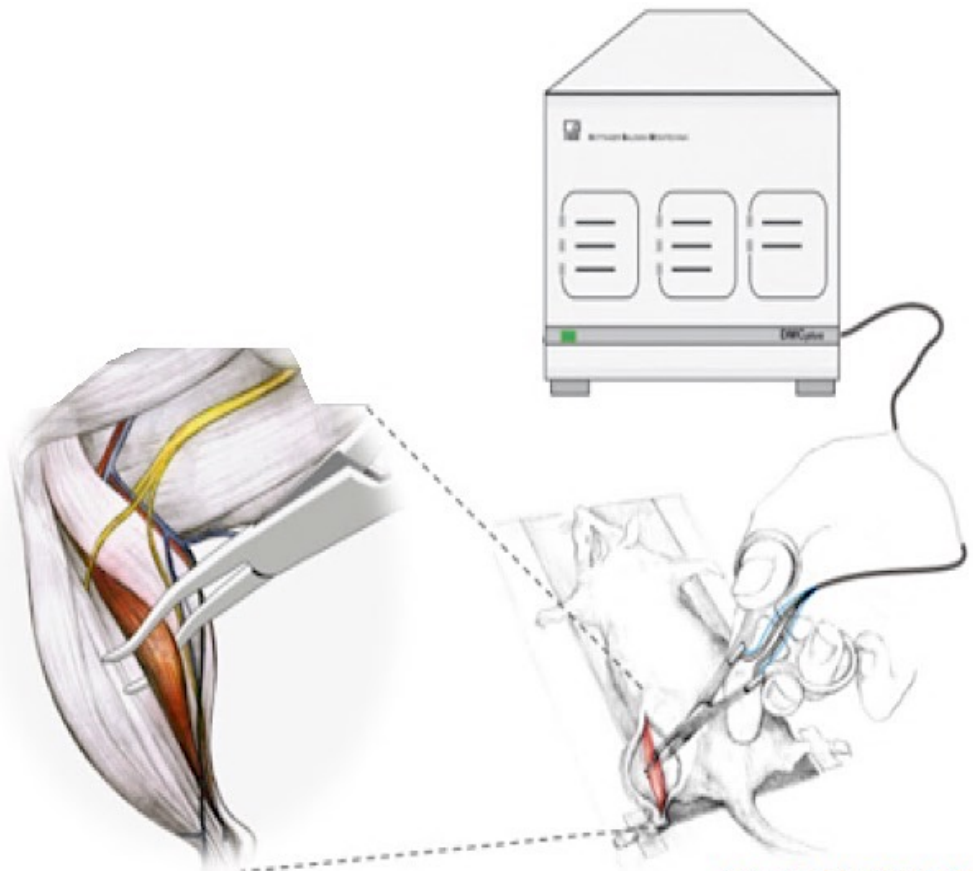


Abb. 8. Versuchsaufbau der Trauma-induktion. Das Versuchstier befindet sich in Bauchlage auf der Heizplatte. Nach der Freilegung des M. soleus am linken Hinterlauf wurde der Muskel sieben Mal für 10s kontusioniert. Das erfolgte mithilfe einer instrumentierten Klemme, die über ein Messgerät mit einer Kraft von 25N arbeitete.

Das Gefäßnervenbündel im Zentrum des Muskels wurde nicht beschädigt, um die regelrechte Innervation und Vaskularisation des M. soleus zu erhalten. Es erfolgte das gründliche Abspülen der Wunde mit steriler Kochsalzlösung. Zum vernähen der oberflächlichen Muskelfaszie sowie der Haut wurde 4-0 Vicryl Naht (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet und mit Povidon-Iod desinfiziert. Den Ratten stand nach dem Erwachen Wasser und Standardlaborfutter in ihrem Käfig zur Verfügung. Dem Trinkwasser der Tiere wurde bis drei Tage postoperativ jeweils 20 Tropfen Novaminsulfon beigelegt.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Muskelkraft

Mittels einer speziellen Versuchsanordnung erfolgte die kontraktile Funktionsmessung des M. soleus: Der Muskel wurde direkt gereizt und die dabei auftretenden Kontraktionskräfte gemessen.

3.2.1.1 Erfassung der Muskelkraft

Die Erfassung der Muskelkraft erfolgte je nach randomisierter Zuordnung am 1., 4. oder 14. postoperativen Tag. Die Kraft wird prozentual - traumatisierte linke zu gesunder rechter Seite - dargestellt, weshalb beide Seiten gemessen werden mussten. Unter Pentobarbital-Natrium 6% Narkose (55mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos Deutschland) wurde den Ratten beide Hinterläufe rasiert und zur Operation auf eine Heizplatte gelagert.

Auch dieser Operationsverlauf erfolgt nach der beschriebenen Methode von Stratos et al. (Stratos et al. 2007):

Durch einen 2,5cm langen Schnitt am Unterschenkel wurden die Haut und die Muskelfaszie inzidiert, der M. soleus – wie bereits zuvor beschrieben – erneut mobilisiert und die Achillessehne dargestellt. Die Sehne wurde vom Ansatz des M. gastrocnemius und proximal der Ferse durchtrennt, so dass der distale Ansatz des M. soleus frei gelegt war. Das Versuchstier wurde dann von der Heizplatte umgelagert und in Bauchlage auf die Muskelkraft-Messvorrichtung (NM-01, Experimentaria, Budapest, Ungarn) plaziert. Das Knie und die Ferse wurden an den entsprechenden Halterungen fixiert und der distale Teil des M. soleus mit einem 4-0 Vicryl Faden am Messwandler (FSG-01, Experimentaria, Budapest, Ungarn) der Muskelkraftmessvorrichtung befestigt.

Für die direkte Muskelkraftmessung wurde der M. soleus an der Elektrode befestigt und bipolar durch den Impulsgeber und die Steuerungseinheit stimuliert (CRS-ST-02-O, Experimentaria, Budapest, Ungarn). Zur Erzeugung einer Kurzkontraktion des M. soleus wurden 9mA / 75Hz verwendet, fünfmal für eine Zeit von jeweils 0,1s und 5s Pausenintervallen zwischen den Pulsen. 9mA/ 75Hz erzeugen die Kurzkontraktionen im M. soleus und wurden fünfmal für jeweils 0,1s appliziert mit 5s Pause zwischen den Intervallen. Um die maximale Muskelkraft zu mobilisieren wurde der M. soleus bei gleicher Amplitude/Frequenz und Pausenintervall für jeweils 3s stimuliert. Auf diese Weise konnte immer eine Tetanie erreicht werden.

Die Kontraktionskraft des M. soleus entspricht in dem Versuchsaufbau einer

Zugkraft und wird über einen Messwandler an das Empfängergerät übermittelt und dort verstärkt (CRS-SG Experimetria, Budapest, Ungarn).

Mittels eines Modems kann das analoge Signal in einen digitalen Datensatz umgewandelt werden, welcher durch die spezielle Visual Basic Anwendung (Visual Basic 6, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) aufgezeichnet und gespeichert werden kann.

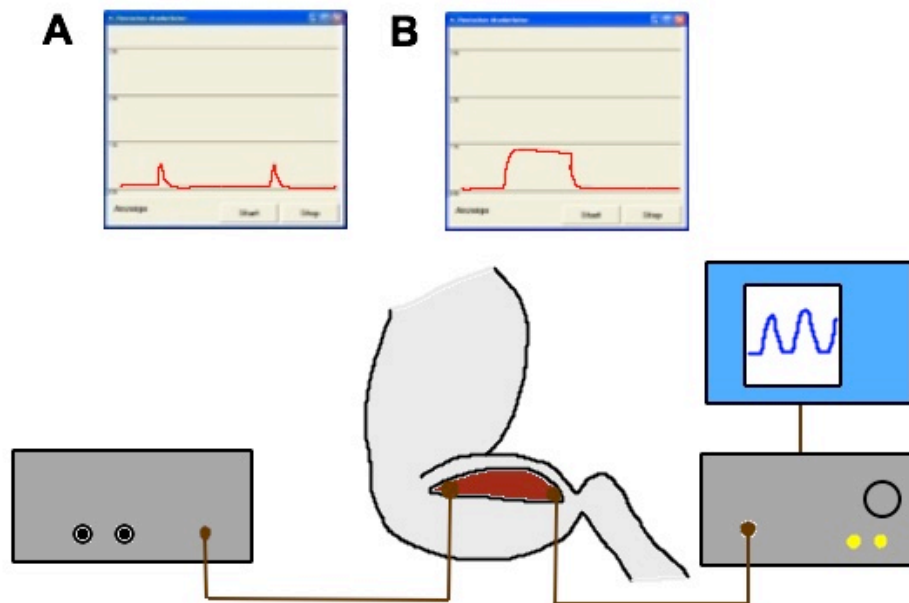


Abb. 9. Muskelkraftmessung am M. soleus. Unteres Bild: Der Impulsgeber (links) stimuliert den M. soleus bipolar direkt über eine Elektrode. Die durch die Kontraktion des Muskels entstandene Zugkraft wurde via Messwandler, Empfänger und Verstärker in ein analoges Signal digitalisiert (rechts). A: Aufzeichnung der Kurzkontraktion; B: Aufzeichnung der Tetanie.

Nach abgeschlossener Messung rechts wurde die Ratte von der Messvorrichtung wieder auf die Heizplatte umgelagert. An der traumatisierten linken Extremität erfolgte das selbe operative Procedere wie auf der gesunden rechten Seite, nur wurden zusätzlich die Fäden vom ersten Eingriff bei der Inzision entfernt. Auch das Vorgehen bei der Muskelkraftmessung links entspricht der Muskelkraftmessung rechts.

Nach abgeschlossener Messung wurden die Tiere tiefer narkotisiert, thorakotomiert und Blut aus dem linken Ventrikel entnommen. Dies erfolgte über eine direkte Punktion des Ventrikels mittels einer EDTA-beschichteten Spritze. Desweiteren wurde der linke M. soleus entnommen und in 4%iger

Formalinlösung konserviert.

3.2.1.2 Berechnung der Muskelkraft

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

3.2.2 Immunhistochemische und histologische Untersuchungen

3.2.2.1 BrdU Immunhistochemie

48 Stunden vor der Gewebeentnahme wurde den entsprechenden Versuchstieren 50mg/kg KG BrdU i.p. appliziert. Der BrdU-Einbau in die DNA der Skelettmuskelzellen dient dem immunhistochemischen Nachweis für die Proliferationsaktivität in der Skelettmuskulatur und wird anhand der Gewebeschnitte untersucht. Dazu wird ein Sekundär-Antikörper, der zusätzlich mit einem Enzym gekoppelt ist, an den Primär-Antikörper gebunden. Durch Zugabe eines Substrates wird eine chromogene Reaktion ausgelöst, welche indirekt das gesuchte Antigen darstellt und damit die quantitative Untersuchung unter dem Lichtmikroskop möglich macht.

Der entnommene M. soleus wurde für 3 Tage in 4% Formalin fixiert und dann in Paraffin gebettet. Daran schloss sich die Herstellung von 4µm dünnen Gewebeschnitten, die in longitudinaler Ebene des Muskels vom proximalen zum distalen Ende erfolgte. Somit konnte der Muskel in seiner vollen Länge auf einen poly-L-lysinbeschichteten Objektträger übertragen werden. Zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurde eine absteigende Alkoholreihe verwendet. Die Antigen-Demaskierung erfolgte in der Mikrowelle bei einem pH von 6,0 (S1699, DAKO Target Retrieval Solution, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bzw.

unspezifischer Peroxidaseaktivität mit spezieller Blocker-Lösung (X0909, DAKO Protein Block, 3% bzw. DAKO Peroxidase Block).

Für die gezielte Markierung des eingebauten BrdUs wurde das Gewebe mit einem monoklonalen anti-BrdU Primär-Antikörper (M0744, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 4°C für 18h in einer Verdünnung von 1:50 mit Antikörperverschüttungsmedium (S3022, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Der Sekundär-Antikörper goat antimouse IgG/HRP (P0447, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde getreu den Anweisungen des Herstellers in einer Verdünnung 1:100 verwendet. In der sich anschließenden Inkubation mit dem DAB Farbstoff (K3467, 3.3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) erfolgte nach ca. 13min eine Reaktion, die zur bräunlichen Färbung der BrdU positiven Zellkerne führte. Die Gewebeschnitte wurden mit Mayer Hämalun Kernfärbung über 5min gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe (41-52-13, X-TRA-Solv, Medite, Burgdorf, Deutschland) entwässert und abschließend mit Deckglasklebstoff eingedeckt (41-5219, X-TRA KITT, Medite, Burgdorf, Deutschland). Wie unter 3.2.2.4 beschrieben, wurde der Muskel in seiner gesamten Länge ausgewertet.

3.2.2.2 CAE Histologie

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops ist der Nachweis infiltrierender Leukozyten in den Muskelgewebeschnitten möglich. Dafür wurden die Präparate zuerst in Paraffin gebettet, unter dem Mikrotom 4µm dünn geschnitten und auf Objektträger fixiert. Nach der Entparaffinierung wurden die Gewebeproben mit Naphtol AS-D Chlorazetat (NO-758-1g, Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Deutschland) behandelt, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und eingedeckt. Die Leukozyten-spezifischen-Esterasen führen zu einer Hydrolysereaktion des Naphtol AS-D Chlorazetats. Die dadurch erfolgte Darstellung des Naphtol-Verbundes visualisiert die infiltrierenden Leukozyten im M. soleus. Wie unter 3.2.2.4 beschrieben, wurde der Muskel in seiner gesamten Länge ausgewertet.

3.2.2.3 TUNEL Histologie

Die TUNEL-Methode (S7101 ApopTag Kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) dient dem histomorphologischen Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen. Mithilfe des Enzyms terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) wird beim TUNEL-Färbungsprozess (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) ein biomarkiertes dUTP an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen angefügt. Das enthaltene Biotin wird daraufhin mit farblich

markierten Antikörpern sichtbar gemacht. Im Detail katalysiert das TdT die spezifische Bindung von Digoxigenin Nukleotiden an die freien 3'-OH Enden der fragmentierten DNA von apoptotischen Zellen und daraufhin die Bildung eines Heteropolymers aus Digoxigenin-11-dUTP und dATP. Nach Zusatz von Anti-Digoxigenin werden Antikörper gebunden, welche durch das enthaltene konjugierte Peroxidaseenzym ein Farbsubstrat umsetzen.

Dazu wurden die Muskelpräparate nach bereits erwähnter Methode geschnitten, mit X-TRA (41-52-13, X-TRA-Solv, Medite, Burgdorf, Deutschland) deparaffiniert und mit PBS gespült. Ein Proteinase K-Verdau (20µg/ml) für 15min bei Raumtemperatur, das Auswaschen mit PBS, eine 3% Peroxidasebehandlung und erneutes Auswaschen mit PBS schlossen sich an. Nach der Behandlung mit „Equilibration-Puffer“ für 10s wurden die Schnitte in einer 37°C warmen, feuchten Kammer für 1h mit TdT-Enzym-Puffer aus dem ApopTag-Kit inkubiert, dann „Stop/Wash-Puffer“ aufgetragen und wieder für 10min inkubiert. Dem Waschen mit PBS folgte die 30minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Antikörper. Nach weiteren vier Waschvorgängen wurden die Präparate für 5min in DAB-Farbstoff inkubiert und nochmals drei Mal mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Kernfärbung über 5min, das Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (41-52-13, X-TRA-Solv, Medite, Burgdorf, Deutschland) und das Eindecken mit Deckglasklebmittel (41-5219, X-TRA KITT, Medite, Burgdorf, Deutschland). Wie unter 3.2.2.4 beschrieben, wurde der Muskel in seiner gesamten Länge ausgewertet.

3.2.2.4 Histologische Auswertung

Das untersuchte Muskelgewebe lässt sich in drei verschiedene Fraktionen gliedern: unbeschädigtes Muskelgewebe, Penumbrazone (Übergangszone) und traumatisiertes Muskelgewebe. Dies lässt sich durch die Anwendung des Traumas mittels der bereits beschriebenen Klemme erklären. Damit das morphologisch heterogene Gewebe objektiv ausgewertet werden konnte, wurde der Muskel in seiner ganzen Länge betrachtet und quantitativ analysiert.

Die BrdU-, CAE- und TUNEL-Färbungen wurden an einem Auflichtmikroskop (Zeiss Axioskop 40; Göttingen, Deutschland) unter 400-facher Vergrößerung untersucht. Die Größe des Gesichtsfeldes wurde mittels eines Mikrometermaßstabes gemessen.

Der M. soleus wurde über seine gesamte Länge vom proximalen zum distalen Ansatz untersucht, wobei im Durchschnitt 30 Gesichtsfelder betrachtet und die dortige Anzahl der positiv gefärbten Zellen ermittelt wurden. Es wurde das

arithmetische Mittel der Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt und in Zellen pro mm² umgerechnet.

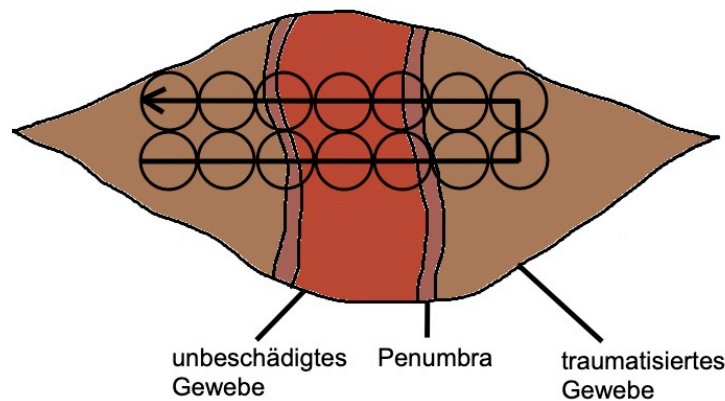


Abb. 10. Exemplarische Darstellung einer histologischen Untersuchung am linken M. soleus. Die Auswertung erfolgte longitudinal über 30 Gesichtsfelder in 400-facher Vergrößerung, wobei 15 Gesichtsfelder von proximal nach distal und 15 Gesichtsfelder von distal nach proximal betrachtet wurden. Penumbra: Übergangszone.

3.2.2.5 Muskelfaserdiameter

Nach Einfärbung der Muskelschnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) wurden diese lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung analysiert. Pro Schnittpräparat wurden 12 Objektfelder meanderförmig vermessen. Der Muskelfaserdiameter wurde, an den im Objektfeld sichtbaren Fasern, an jeweils zwei Messpunkten in μm bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert bestimmt.

3.2.2.6 Muskelgewebefraktion

Die Muskelgewebefraktion ergibt sich aus dem prozentualen Anteil von Muskelgewebe zum Gesamtgewebe eines Schnittes. Dazu wurde ein HE-Muskelschnitt in 400-facher Vergrößerung über seine gesamte Länge digital aufgenommen (cell[^]D, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) und in Photoshop (Photoshop CS4 Version 11.0.2, Adobe Systems Europe; Uxbridge, UK) mit der „magic wand“-Funktion digital bearbeitet. Die Muskelzellen konnten dadurch präzise herausgearbeitet und ihre Pixelzahl berechnet werden. Wie anfangs beschrieben, konnte mithilfe der Pixelzahl des Gesamtgewebes die gewünschte Muskelgewebefraktion errechnet werden.

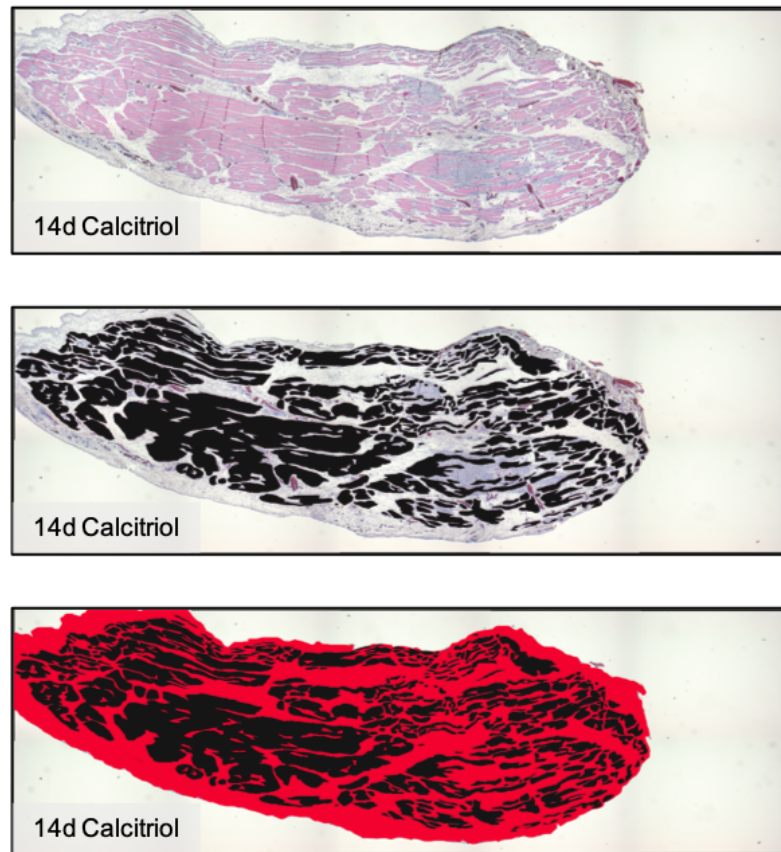


Abb. 11. Muskelgewebefraktion. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme eines Muskelschnittes 14 Tage nach Traumainduktion und nach Gabe von Calcitriol. Oberes Bild: HE-Färbung; Vergrößerung 40-fach. Mittleres Bild: Mittels „magic wind“-Funktion schwarz markiertes Gewebe entspricht dem Anteil an Muskelgewebe im Muskelschnitt. Unteres Bild: Zur Berechnung der Muskelgewebefraktion wurde der Muskelanteil (schwarz) am Gesamtgewebe (rot) ermittelt.

3.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Bei 68 Versuchstieren wurde am Tag 0 ein Trauma am linken M. soleus mittels einer instrumentierten Klemme induziert. Direkt postoperativ erfolgte die erste Injektion von Calcitriol ($1\mu\text{g/kg KG}$; $n=21$), VDRM2 ($1\mu\text{g/kg KG}$; $n=21$) oder 10%ige Ethanollösung (2ml/kg KG ; $n=21$). Für die Versuchstiere, die am 4. und 14. postoperativen Tag untersucht wurden, wurde die jeweilige Injektion im 24h-Rhythmus für weitere 3 Tage durchgeführt.

Die Muskelkraftmessung erfolgte am M. soleus bilateral jeweils am 1., 4. oder 14. postoperativen Tag. Zusätzlich wurde das entsprechende Gewebe asserviert. 48h vor der Gewebeentnahme ist den Versuchstieren 50mg/kg KG BrdU i.p. injiziert worden, um die bestmögliche Darstellung der Proliferation der Muskelzellen zu erreichen.

Es wurden folgende Versuchsgruppen zusammengestellt:

1. Kontrollgruppe (n=21)

Offenes Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. 10% Ethanol Injektion über 4 Tage; Biomechanische Untersuchung an Tag 1, 4 und 14 und Gewebeasservierung; n=7 pro Untersuchungszeitpunkt.

2. Calcitriolgruppe (n=21)

Offenes Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. Calcitriol Injektion über 4 Tage; Biomechanische Untersuchung an Tag 1, 4 und 14 und Gewebeasservierung; n=7 pro Untersuchungszeitpunkt.

3. VDRM2-Gruppe (n=21)

Offenes Muskeltrauma an Tag 0; tägliche i.p. VDRM2 Injektion über 4 Tage; Biomechanische Untersuchung an Tag 1, 4 und 14 und Gewebeasservierung; n=7 pro Untersuchungszeitpunkt.

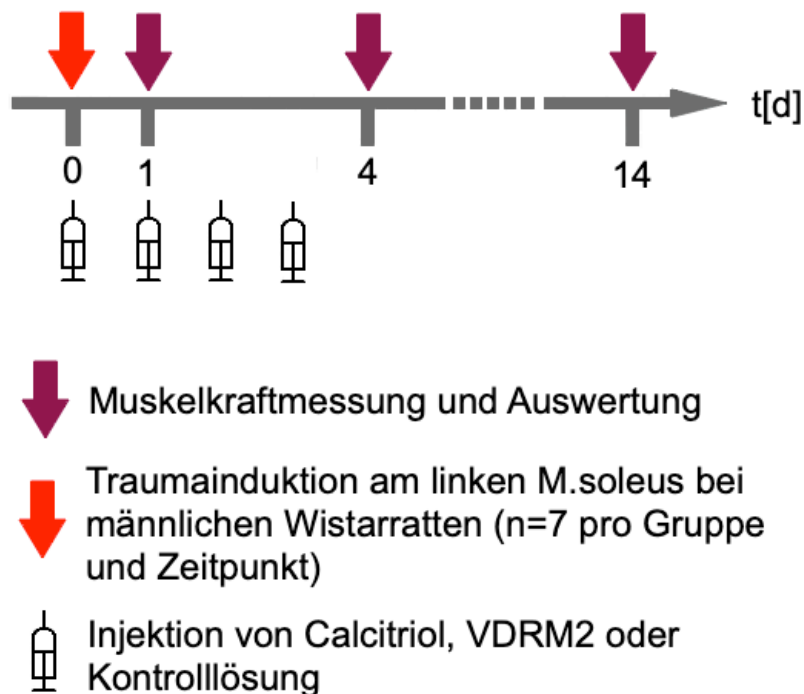


Abb. 12. Versuchsablauf. Am Tag der Traumainduktion und an den folgenden drei Tagen wurde jeweils Calcitriol, VDRM2 oder 10% Ethanolösung (= Kontrollösung) i.p. injiziert. Die Untersuchungen fanden am 1., 4. und 14. postoperativen Tag statt. 48h vor der Muskelkraftmessung erfolgte die i.p. Injektion von 50mg/kg KG BrdU.

3.4 Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Lag eine Normalverteilung der Werte vor, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way-Anova) verwendet, gefolgt von dem Shapiro-Wilk-Test. Die statistische Testung und grafische Darstellung in Diagrammen erfolgte unter Zuhilfenahme der Software SigmaPlot 13.0 (Jandel Corp., San Rafael, USA). Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeine Beobachtungen

Alle Tiere durchliefen den vorgestellten Versuchsablauf komplikationslos. Die Tiere schonten für einige Tage nach der Traumainduktion ihre untere linke Extremität und belasteten diese daher nicht voll. Die Operationswunden wiesen eine zeitgerechte und komplikationslose Wundheilung auf ohne Zeichen einer lokalen Infektion.

4.2 Muskelkraft

Der gesunde, nicht traumatisierte rechte Hinterlauf der untersuchten Tiere zeigte in allen Versuchsgruppen keine Einschränkung in der Kontraktionskraft (in N) und diente als Referenzwert, um das Ausmaß der Funktionseinbuße des traumatisierten linken Hinterlaufes einzuschätzen.

4.3 Kurzkontraktion

Die relative Kontraktionskraft bei der Kurzkontraktion folgte in allen drei Gruppen einer ansteigenden Kinetik und hatte zunehmend verbesserte Werte zum nächsten Kontrollzeitpunkt. An Tag 1 und Tag 4 nach Muskeltrauma zeigte sich zwischen den Untersuchungsgruppen kein signifikanter Unterschied in der relativen Kurzkontraktion des linken M. soleus. 14 Tage nach der Traumainduktion des linken M. soleus zeigte sich bei der Kurzkontraktion ([in % zur Gegenseite] Kontrolle: 47 ± 6 , VDRM2: 62 ± 5 , Calcitriol: 64 ± 4) ein signifikanter Anstieg in der Calcitriol-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe. Unter der Calcitriolsubstitution hatten die Ratten nach 14 Tagen eine nur um 36% reduzierte Kontraktionskraft auf der verletzten linken Seite im Vergleich zur gesunden rechten Seite. VDRM2 konnte nur eine Wiederherstellung der Muskelkraft von 63% erreichen, die Kontrollgruppe von 48%.

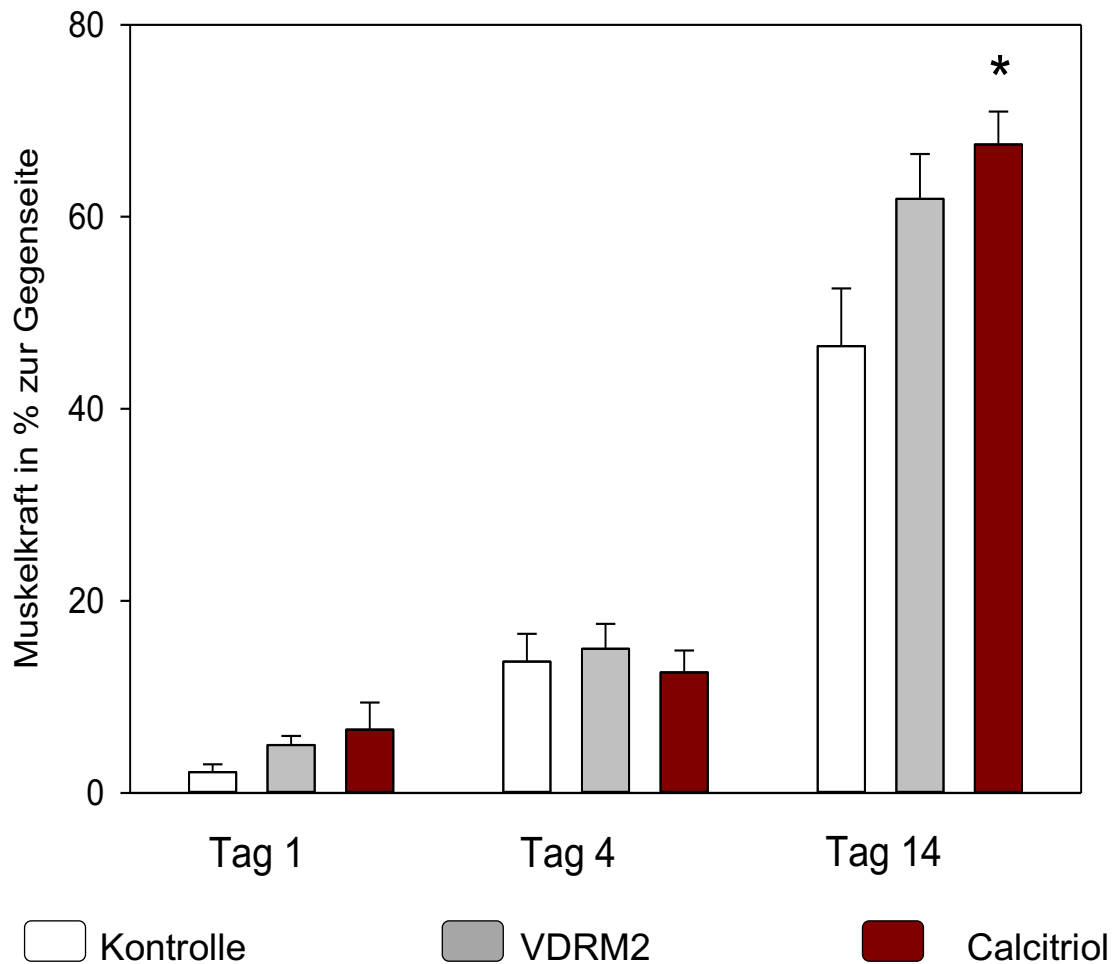


Abb. 13. Kurzkontraktion. Relativer Kraftzuwachs der Kurzkontraktion des traumatisierten M. soleus im Vergleich zur gesunden Gegenseite nach 10%Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Die Calcitriol-Gruppe zeigt 14 Tage nach Trauma-induktion einen signifikanten Kraftzuwachs. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA, * $p < 0,05$ vs Kontrolle.

4.4 Tetanie

Die steigende Kinetik an den aufeinander folgenden Zeitpunkten konnte auch bei der Auslösung der tetanischen Muskelkontraktion festgestellt werden. An Tag 1 und Tag 4 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Calcitriol, VDRM2 und der Kontrolle. Am 14. Tag wiesen sowohl die Calcitriolgruppe als auch die VDRM2-Gruppe eine höhere, aber nicht signifikant erhöhte tetanische Kontraktion des M. soleus auf ([in % zur Gegenseite] Kontrolle: 48 ± 9 , VDRM2: 57 ± 6 , Calcitriol: 55 ± 6).

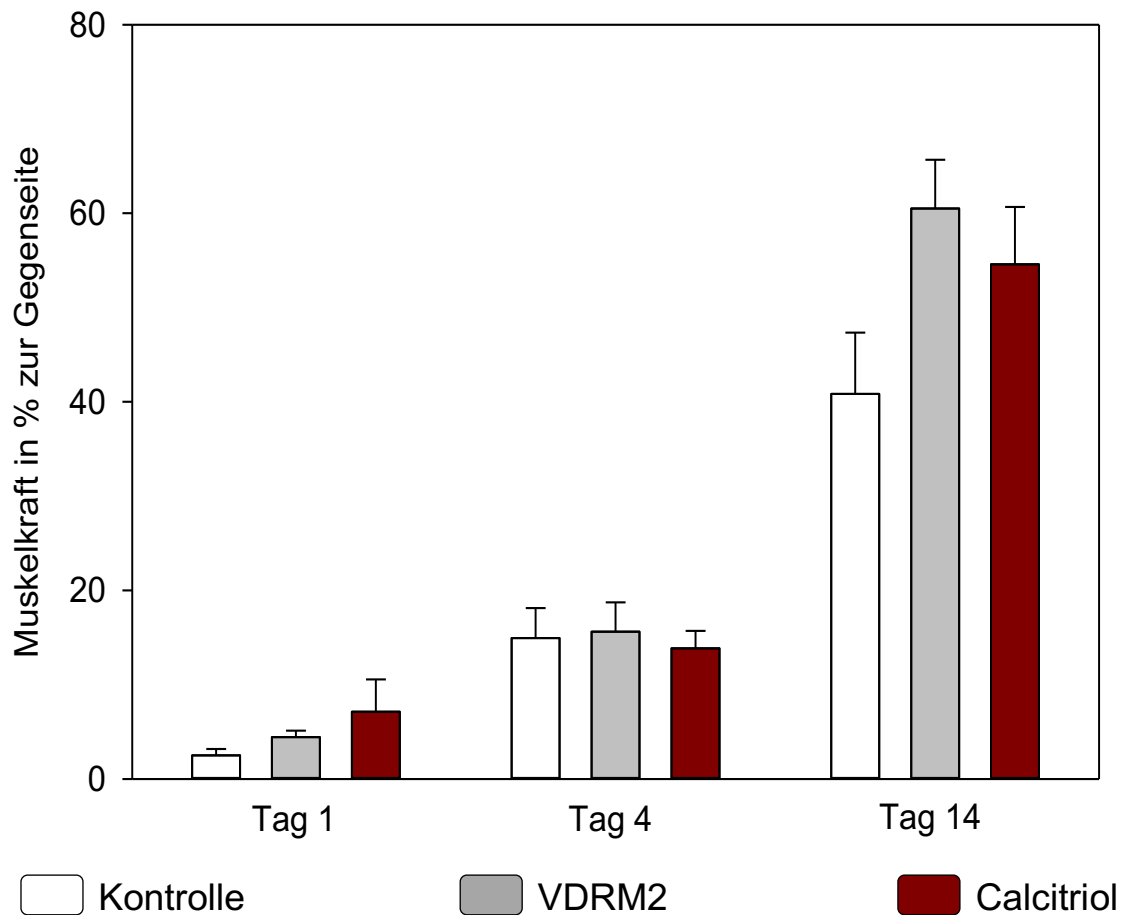


Abb. 14. Tetanie. Relativer Kraftzuwachs der Tetanie des traumatisierten M. soleus im Vergleich zur gesunden Gegenseite nach 10%Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA.

4.5 Proliferation

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität erfolgte über den immunhistochemischen Nachweis der BrdU-Einlagerung in die Zell-DNA. Das BrdU wurde den Tieren 48h vor der Gewebeentnahme i.p. injiziert und als Thymidin-Analogon in die proliferierenden Zellen eingebaut.

Die Regeneration der geschädigten Muskelzellen geht mit einer Steigerung der Muskelproliferation einher. An Tag 1 entwickelte sich die Proliferation in allen drei Gruppen ähnlich. An Tag 4 präsentierten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen beiden Gruppen. Die Kontrollgruppe wies eine niedrigere Zahl an proliferierenden Zellen auf als am ersten Tag und Calcitriol und VDRM2 ihre höchsten Werte zu allen drei Zeitpunkten

([Zellen/Gesichtsfeld] Kontrolle: 24 ± 2 , VDRM2: 45 ± 4 , Calcitriol: 53 ± 6). Am 14. Tag nach Traumainduktion zeigte sich in allen drei Gruppen eine ähnlich niedrige Zellzahl an BrdU-positiven Zellen.

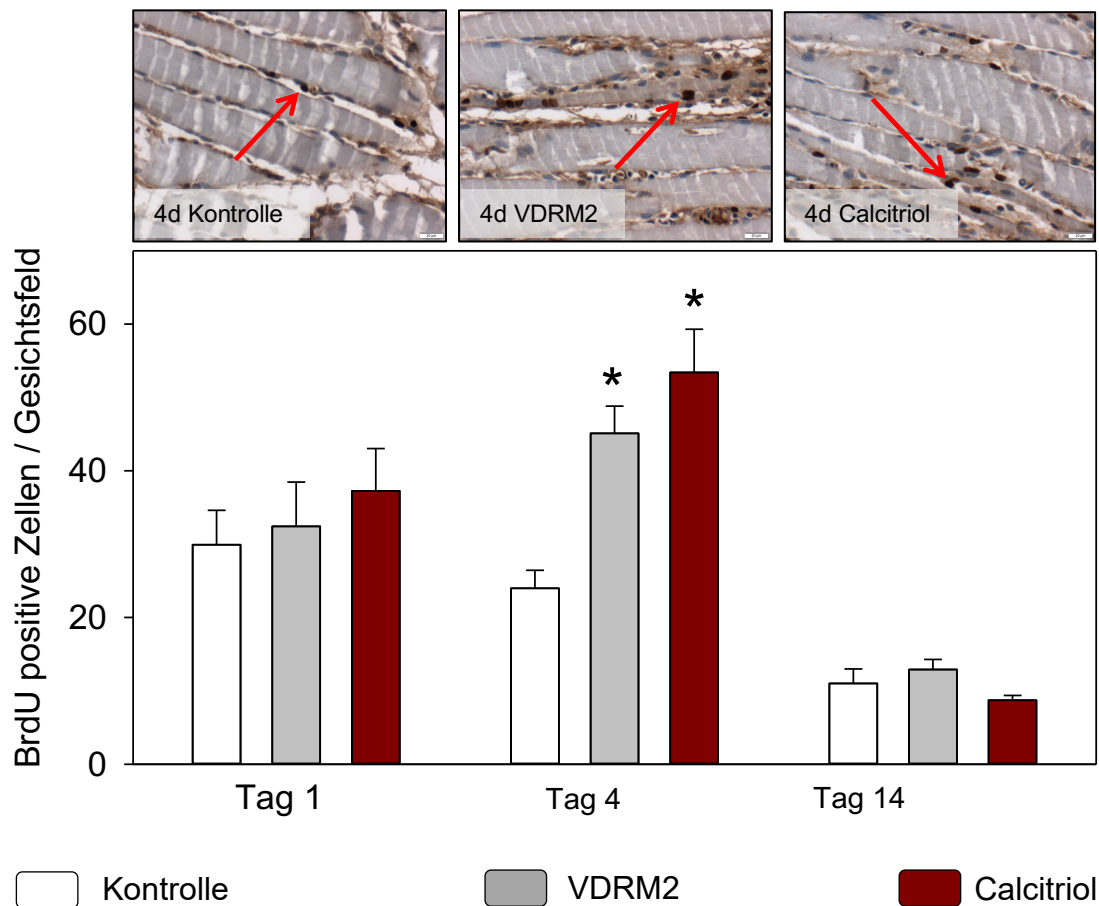


Abb. 15. Muskelzellproliferation. Obere Abbildungen: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur von Tieren nach Trauma am 4. Tag. Die BrdU-Färbung zeigt eine ausgeprägte proliferative Aktivität bei der VDRM2-Gruppe. Roter Pfeil: proliferierende Zelle; Vergrößerung 400-fach. Grafik unten: Anzahl proliferierender Zellen im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma nach 10% Ethanol-Behandlung (Kontrolle, $n=7$ pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, $n=7$ pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, $n=7$ pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA, * $p<0,05$ vs Kontrolle.

4.6 Apoptose

Die Gewebeschädigung kann mithilfe der Anzahl an apoptotischen Zellen eingeschätzt werden. Dazu diente die lichtmikroskopische Untersuchung der TUNEL-gefärbten Muskelgewebestücke.

An Tag 1 und Tag 14 unterschieden sich die Gruppen in der Anzahl der apoptotischen Zellen in dem verletzten linken Muskel kaum. An Tag 4 wiesen Calcitriol, VDRM2 und die Kontrollgruppe von allen Zeitpunkten die höchste Anzahl an apoptotischen Zellen auf. Im Vergleich der drei Gruppen untereinander an Tag 4 hatte die Calcitriol-Gruppe signifikant niedrigere Werte als die Kontroll-Gruppe ([Zellen/Gesichtsfeld] Kontrolle: 22 ± 0 , VDRM2: 20 ± 2 , Calcitriol: 16 ± 1).

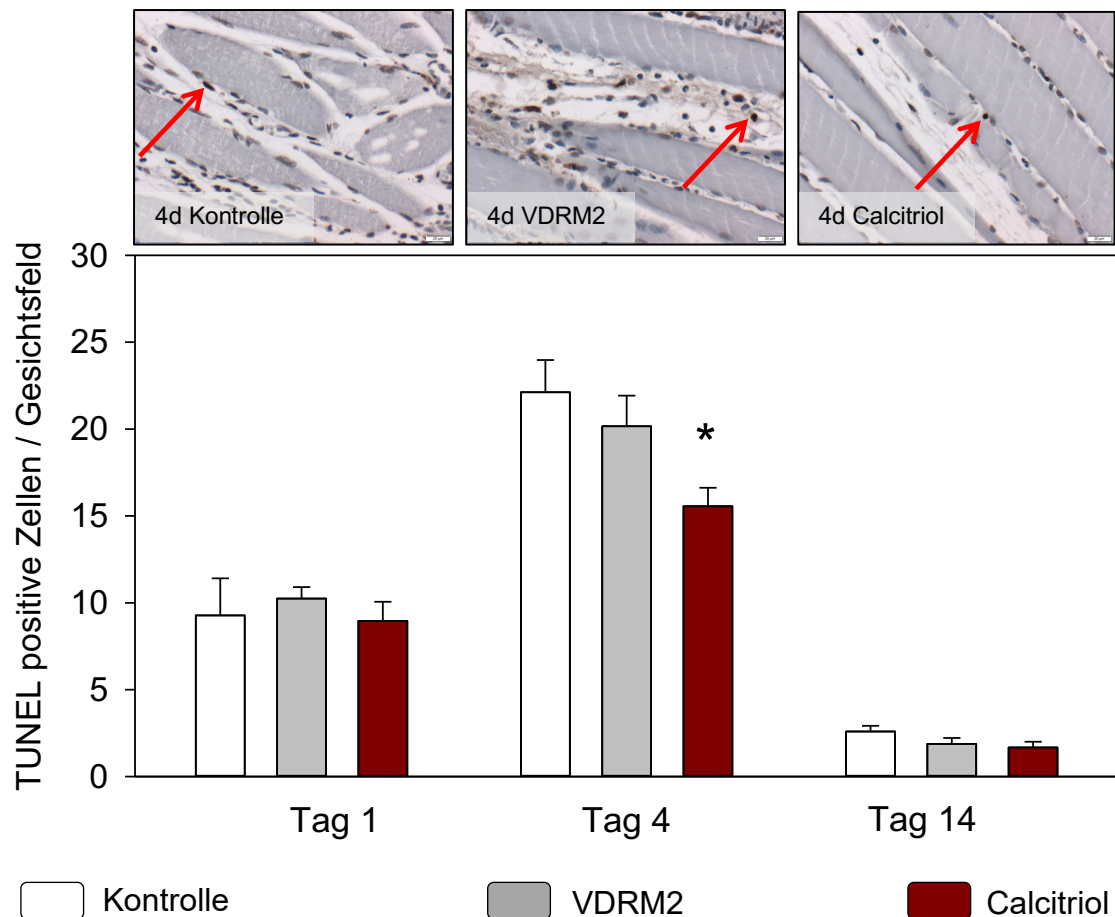


Abb. 16. Muskelzellapoptose. Obere Abbildungen: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Skelettmuskulatur von Tieren nach Trauma am 4. Tag. Die TUNEL Histologie zeigt eine reduzierte Apoptose bei der Calcitriol-Gruppe. Vergrößerung 400-fach. Grafik unten: Anzahl apoptotischer Zellen im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma nach 10% Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA, * p<0,05 vs Kontrolle.

4.7 Leukozyteninfiltration

Die Inflammation, gemessen an CAE-positiven Leukozyten, präsentierte in allen drei Gruppen an Tag 1 die höchsten Werte mit einer fallenden Kinetik an Tag 4

und noch weiter an Tag 14. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die Injektion von Calcitriol und VDRM2 hatte keinen Effekt auf die Anzahl der inflammatorischen Leukozyten.

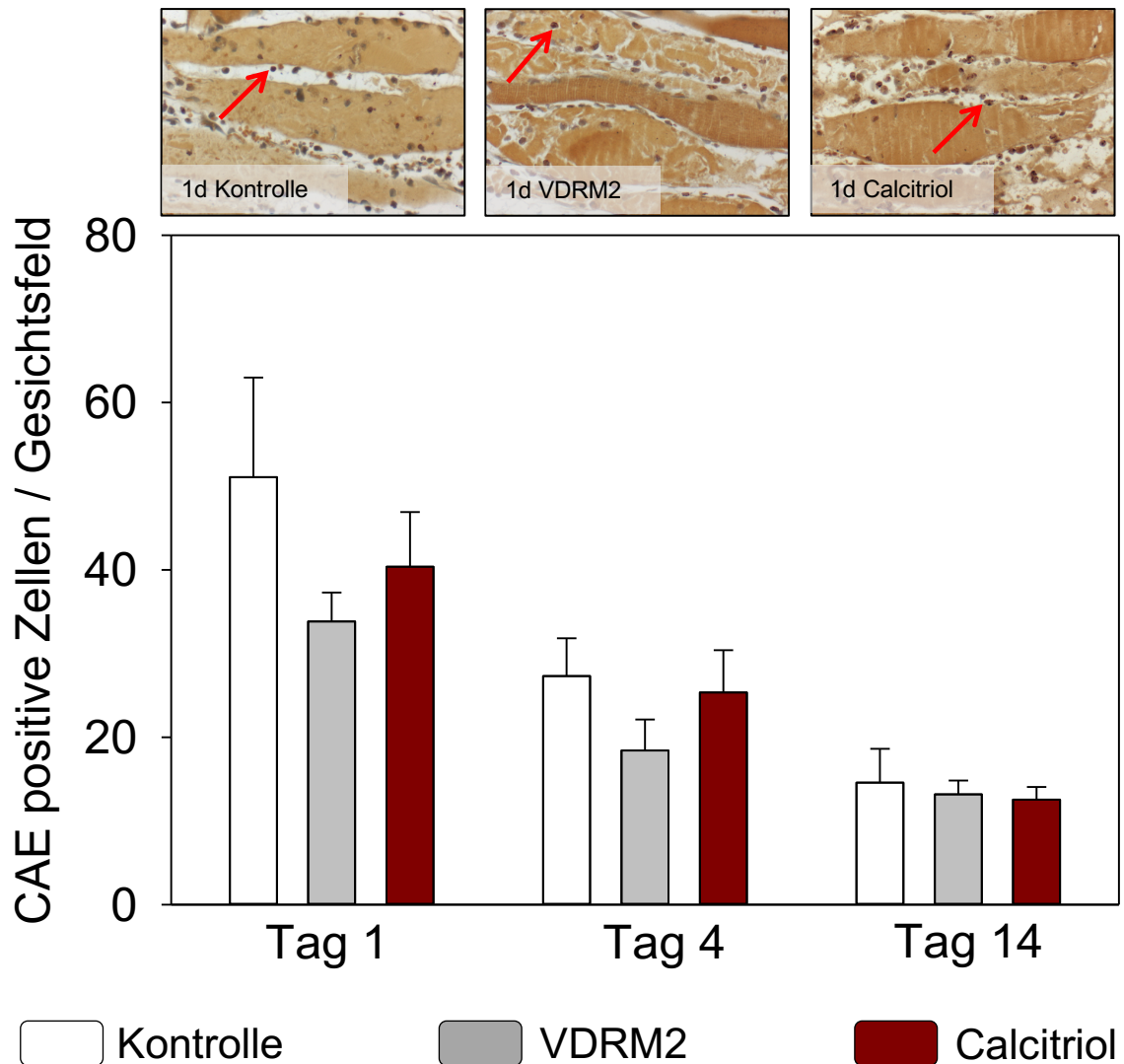


Abb. 17. Leukozyteninfiltration. Obere Abbildungen: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Skelettmuskulatur von Tieren nach Trauma am 1. postoperativen Tag. Die CAE-Färbung zeigt keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Gruppen. Vergrößerung 400-fach. Grafik unten: Anzahl CAE positiver Zellen im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma nach 10% Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA.

4.8 Muskelfaserdiameter

Die Quantifizierung des Muskelfaserdiameter ergab eine signifikante Vergrößerung des Durchmessers an Tag 14 bei den Tieren, die eine Calcitriolinjektion erhalten hatten, im Vergleich zur Kontroll- und VDRM2-Gruppe ([μm] Kontrolle: 61 ± 2 , VDRM2: 63 ± 1 , Calcitriol: 77 ± 2). Am 1. und 4. Tag variierte der Muskelfaserdiameter zwischen den drei Gruppen ohne signifikante Unterschiede.

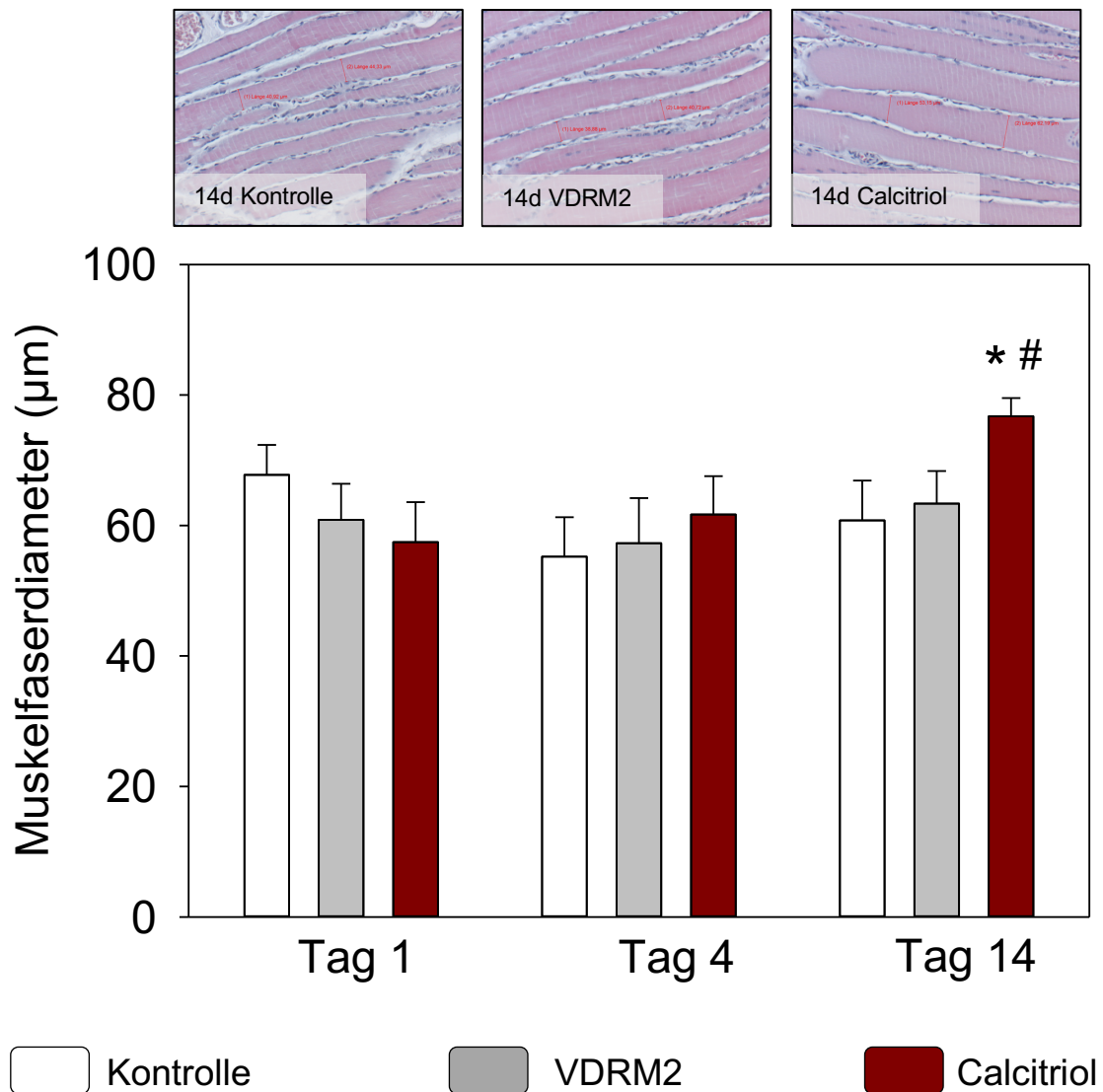


Abb. 18. Muskelfaserdiameter. Obere Abbildungen: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Skelettmuskulatur von Tieren nach Trauma am 14. Tag. Die HE-Färbung zeigt am 14. postoperativen Tag einen größeren Muskelfaserdiameter in der Calcitriol-Gruppe. Die roten Doppelpfeile stellen exemplarisch die Vermessung der Muskelfasern mit den entsprechenden Werten in μm dar. Vergrößerung 400-fach. Grafik unten: Der Muskelfaserdiameter in μm im Skelettmuskel von Tieren mit Muskeltrauma nach 10% Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Angegeben sind Mittelwert±SEM; one-way-ANOVA, * p<0,05 vs Kontrolle, # p<0,05 vs VDRM2.

4.9 Muskelgewebefraktion

Mit Hilfe der Muskelgewebefraktion lassen sich indirekt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Gewebeschädigung ziehen. Die intakte Muskelgewebefläche wurde dazu prozentual zur gesamten Muskelschnittfläche berechnet.

Es konnte kein Unterschied in der Muskelgewebefraktion zwischen den Tieren mit injizierter Kontrolllösung und VDRM2 und Calcitriol festgestellt werden. Allerdings zeigen sich in allen drei Versuchsgruppen steigende Werte der intakten Muskelfläche im zeitlichen Verlauf. An Tag 14 sind ca. 56,2% des Muskelgewebes wieder regeneriert ([in %] Kontrolle: 58 ± 0 , VDRM2: 57 ± 1 , Calcitriol: 54 ± 1).

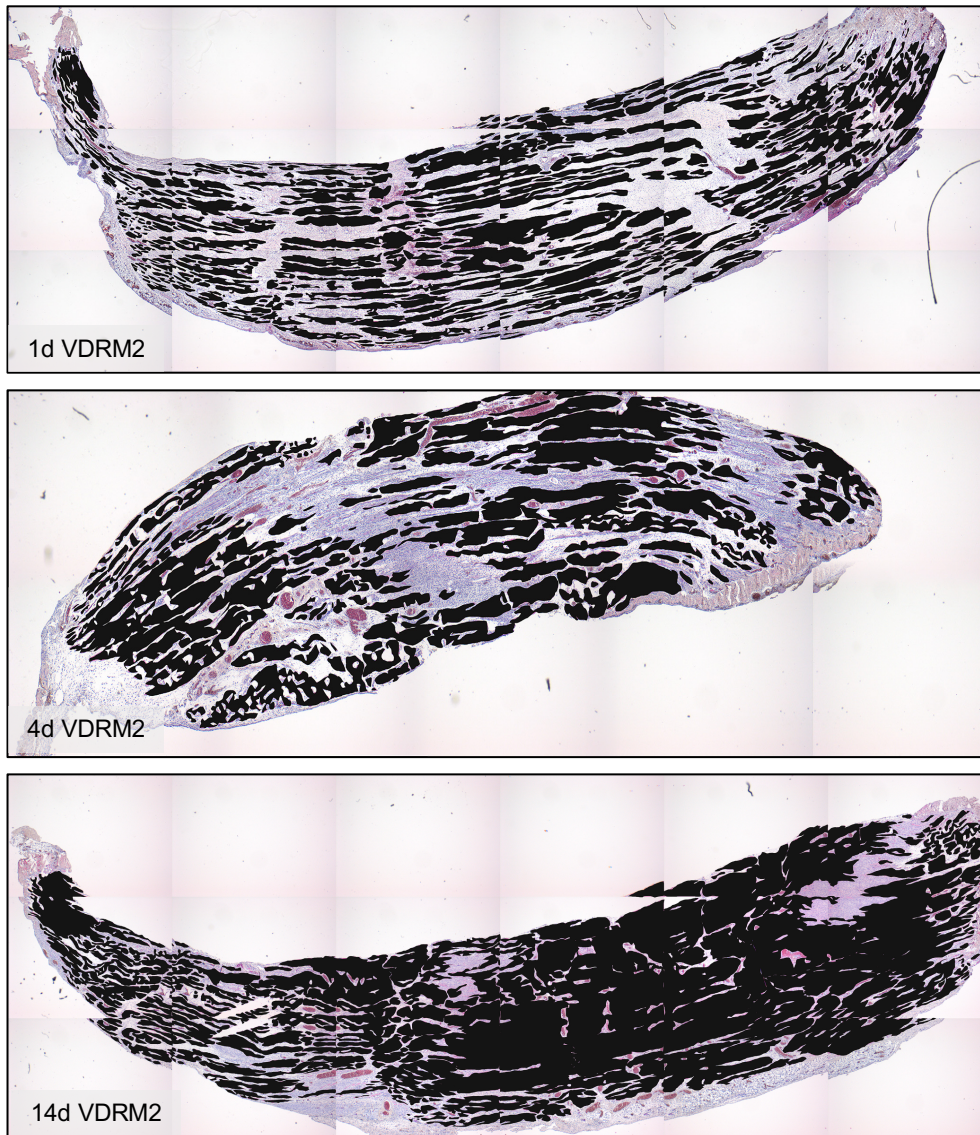


Abb. 19. Muskelgewebefraktion. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von Tieren mit VDRM2-Behandlung zu den drei Untersuchungszeitpunkten. Schwarz markiertes Gewebe entspricht dem Anteil an Muskelgewebe im Muskelschnitt. Sichtbar ist ein Zuwachs des Muskelgewebes im zeitlichen Verlauf. HE-Färbung; Vergrößerung 40-fach.

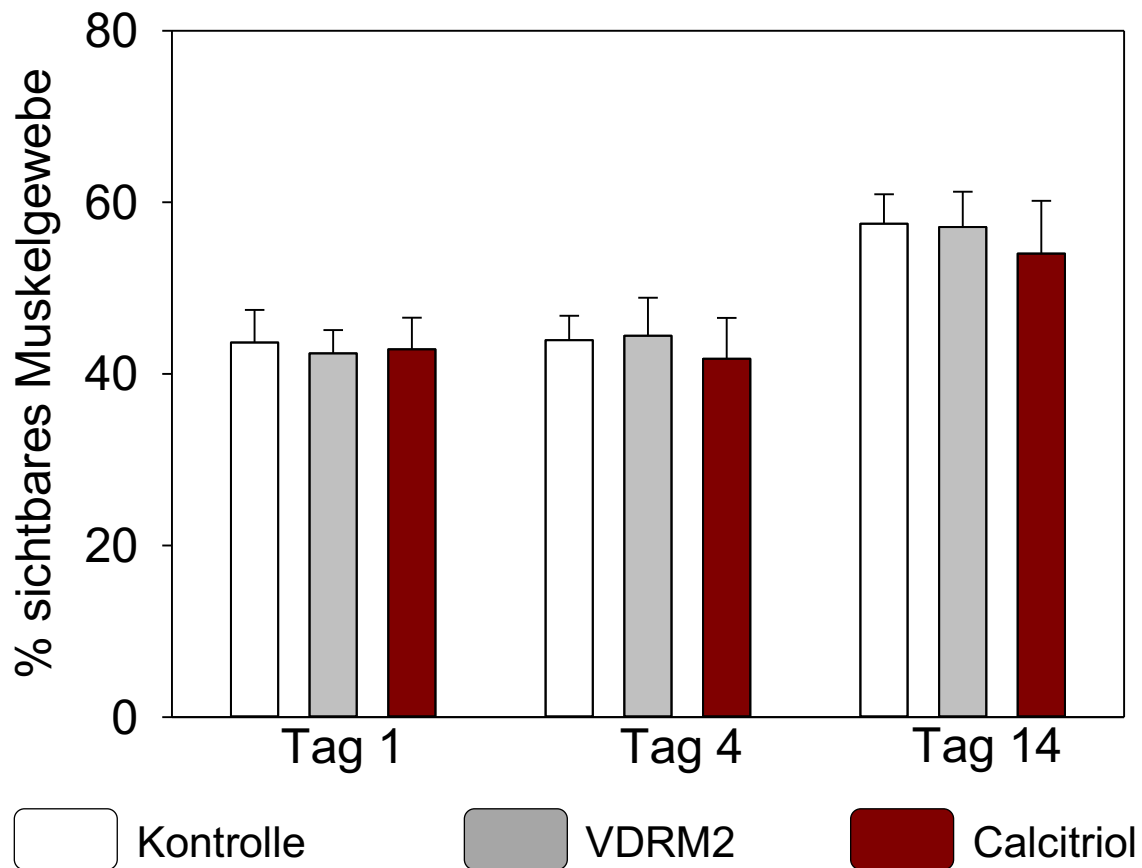


Abb. 20. Muskelgewebefraktion. Prozentualer Anteil an intaktem Muskelgewebe im linken M. soleus von Tieren mit Muskeltrauma nach 10% Ethanol-Behandlung (Kontrolle, n=7 pro Zeitpunkt), VDRM2-Behandlung (VDRM2, n=7 pro Zeitpunkt) und Calcitriol-Behandlung (Calcitriol, n=7 pro Zeitpunkt). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch erreichen alle drei Gruppen am dritten Untersuchungszeitpunkt ihre höchsten Werte. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM; one-way-ANOVA.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die präsentierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Applikation von Calcitriol nach einem stumpfen Muskeltrauma zu einer Verbesserung der Muskelregeneration führt. Die Applikation von VDRM2 deutet auf einen ähnlichen, aber nicht so ausgeprägten Effekt auf die Muskelregeneration hin.

Die Muskelkraft bei ausgelöster Kurzkontraktion und Tetanie war an Tag 1 und Tag 4 stark reduziert und lag für alle drei Gruppen unter 20%. Die Behandlung mit Calcitriol und VDRM2 erhöhte die Muskelkraft am 14. Tag um mindestens

15% mehr als in der Kontrollgruppe und führte zu einer bis zu 70%igen Wiederherstellung der Muskelkraft.

Die Proliferationsaktivität in dem traumatisierten Muskelgewebe war an Tag 4 signifikant höher nach Injektion von Calcitriol und VDRM2, mit einer doppelt so hohen Anzahl an proliferierenden Zellen.

Die Apoptoserate hatte am 4. Tag nach Muskeltrauma ihren Höchstwert erreicht, jedoch bewirkte die VDRM2 Applikation eine leichte und die Calcitriol eine signifikante Reduktion der Apoptosezellen an Tag 4 verglichen zur Kontrollgruppe.

Die Leukozyteninfiltration in das geschädigte Muskelgewebe scheint unabhängig von der Injektion aller drei Substanzen abzulaufen.

Die Vergrößerung des Muskelfaserdiameters an Tag 14 nach Calcitriolgabe und die leichte Tendenz nach VDRM2-Gabe, sowie die ansteigende Kinetik der Muskelgewebefraktion über den gesamten zeitlichen Verlauf können auf eine leichte Zunahme der Muskelmasse hindeuten.

5. Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Etablierte Modelle zur Untersuchung der Muskelregeneration

Ziel der verschiedenen Modelle des Muskeltraumas ist es, möglichst klinisch nah gestaltete Traumasituationen zu simulieren, die auf den Menschen anwendbar sind. Um relevante Ergebnisse aus Untersuchungen zu gewinnen, sollte der Versuchsaufbau eine große Anzahl an Untersuchungsmöglichkeiten ermöglichen. Bisher angewendete Modelle sind in-vitro, humane in-vivo und tierexperimentelle in-vivo Verfahren.

In-vitro Modelle, bei denen Muskelfasern in eine Lösung ähnlich der Extrazellulärflüssigkeit verbracht werden, bieten den Vorteil, dass sich die Vorgänge auf zellulärer Ebene im Muskel und funktionelle Parameter detailliert untersuchen lassen. Wesentliche Nachteile sind dabei die fehlende klinische Vergleichbarkeit und die technisch anspruchsvolle Umsetzung (Lynch et al. 2000; Roche et al. 2015).

Muskeltraumamodelle, die direkte Traumata am Menschen induzieren und dann untersucht werden, bieten dagegen eine hohe klinische Aussagekraft, sind allerdings aus ethischen Gründen schwer ausführbar. Bei solchen Modellen werden Muskelverletzungen durch exzentrische Kontraktionen der Muskulatur, vorwiegend einer isolierten Muskelgruppe, induziert, beispielsweise am Knie- oder dem Ellenbogengelenk (Clarkson & Hubal 2002; Byrne & Eston 2002; Falvo & Bloomer 2006; Lau et al. 2015). Sowohl das Ausmaß der Traumata und folgende Untersuchungsmethoden sind dabei limitierend für weitreichende Schlussfolgerungen.

Eine gute Alternative, die einen Kompromiss der beiden vorher genannten Modelle darstellt sind tierexperimentelle Studien. So ist es möglich Untersuchungen in der Gesamtheit eines lebenden Organismus durchzuführen und die Ergebnisse als solche zu interpretieren, aber auch spezifische Untersuchungen anzuwenden, die ein invasiveres Vorgehen erfordern (Alway et al. 2005).

Tiere, die sich für Untersuchungen zur Muskelregeneration eignen, sind unter anderem Affen, Hühner, Katzen, Hunde, Kaninchen, Mäuse und Ratten (Beiras-Fernandez et al. 2003; Zhang & Dhoot 1998; Roy et al. 1999; Hayashi et al. 1998; Meffert et al. 2008; Menetrey et al. 1999; Fink et al. 2003). Der grundlegende Ablauf der Muskelregeneration ist bei allen Tieren vergleichbar, jedoch gibt es

zwischen den Tieren und auch innerhalb der verschiedenen Unterarten unterschiedlich lange Regenerationszeiten (Borisov 1999; Ausoni & Sartore 2009). In der vorliegenden Studie wurden Ratten des Stammes Wistar verwendet. Zum einen sind Experimente an solchen Kleintieren gesellschaftlich anerkannter und die unkomplizierte Züchtung und Haltung der Tiere bringen ökonomische Vorteile mit sich (Histing et al. 2011). Neben den Untersuchungen zur Muskulatur werden Ratten in der unfallchirurgischen und orthopädischen Forschung auch zu Untersuchungen von pathologischen Knochenstrukturen, -stoffwechselabläufen und Arthrose verwendet (Doll et al. 2001; Zhang et al. 2002).

Die ähnliche Anatomie zum Menschen vereinfacht die Durchführbarkeit. Besonders gut zugänglich für Versuche an der Muskulatur eignen sich die Hinterläufe, insbesondere der M. soleus, M. extensor digitorum longus und M. gastrocnemius (Kannus et al. 2003; Stratos et al. 2010).

Das hier angewandte Prozedere zur Traumainduktion beruht auf der Verwendung von instrumentierten Klemmen. Diese wirken mit einer konstanten Kraft von 25N auf das zu schädigende Gewebe und ermöglichen damit eine Standardisierung des Verfahrens in Bezug auf die Traumaintensität. Die Verwendung einer Stoppuhr ermöglicht eine konstante Zeit der Anwendung dieser speziellen Klemme. Dieses Verfahren ist bereits mehrfach getestet und liefert aussagekräftige Ergebnisse (Stratos et al. 2007; Stratos et al. 2010; Stratos, Li, et al. 2012). Weitere Möglichkeiten zur mechanischen Traumainduktion sind das Verwenden einer normalen Klemme, eines Hammers, eines Fallgewichtes oder eines pneumatischen Aufprallapparates (Matziolis et al. 2006; Järvinen & Sorvari 1975; Knappe et al. 2005; Schaser et al. 2005).

5.1.2 Calcitriol und VDRM2: Dosis und Applikation

VDRM2 ist aufgrund seiner Neuheit generell noch nicht oft verwendet worden und für Fragestellungen, die die Skelettmuskulatur betreffen noch gar nicht.

Zwar wurde durch Sato et al. nachgewiesen, dass bei Ratten eine hohe Toleranzschwelle von 4,6µ/kg KG bis zum Auftreten potenzieller hyperkalzämischer Nebenwirkungen besteht, doch wurde eine Erhöhung der Knochenfestigkeit bereits bei einer Dosis zwischen 0,1 und 3µg/kg KG festgestellt (Sato et al. 2010). Um erste grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen, ob VDRM2 eine Wirkung auf die Muskelregeneration aufweist, wurde in diesem Versuchsaufbau eine Dosis von 1µg/kg KG ausgewählt.

Es wurden bereits erste Versuche zur Anwendung von Calcitriol nach stumpfem Muskeltrauma von Stratos et al. getestet. Die s.c. verwendeten Dosen von 0,83mg/kg KG bzw. 8,3mg/kg KG führten zu keinem Untersuchungszeitpunkt zu einer Hyperkalzämie, Hyperkalzurämie oder reduzierten Parathormonspiegeln (Stratos et al. 2013). Um eine gute Vergleichbarkeit von VDRM2 und Calcitriol zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Dosis von 1µg/kg KG zur i.p. Gabe gewählt.

Die oben angegebene Literatur ließ vermuten, dass die hier verwendete Dosis an VDRM2 und Calcitriol eine ausreichende Wirkung ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erzielt.

5.1.3 Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung

In der vorliegenden Studie wurden alle drei Versuchsgruppen zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht, mit dem Hintergrund eine Kinetik der Muskelregeneration und der entsprechenden Parameter zu erfassen.

Um schnelle direkt vermittelte Wirkungen der applizierten Substanzen Calcitriol und VDRM2 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erfassen wurde als erster Untersuchungszeitpunkt Tag 1 gewählt. Da nach Järvinen et al. zwischen dem 3. und 5. Tag nach Trauma die wesentlichen Prozesse der Proliferation und Apoptose stattfinden, wurde Tag 4 als nächster Untersuchungszeitpunkt gewählt (Järvinen et al. 2005). Der 14. Tag nach Traumainduktion wurde als dritter und letzter Untersuchungszeitpunkt bestimmt, um insbesondere die Auswirkungen der Umbauphase zu vergleichen. Diese trägt wesentlich dazu bei, dass 14 Tage nach Traumainduktion ein erheblicher Teil der Muskelkraft - bis zu 80% der Maximalkraft - wieder hergestellt ist (Järvinen et al. 2005; Stratos et al. 2010).

5.1.4 Diskussion der Untersuchungstechniken

5.1.4.1 Muskelkraft

Die Tetanie und die Kurzkontraktion des Muskels entsprechen einer isometrischen Kontraktion und der hierfür aufgewendeten Kraft. Das Ausmaß, mit dem diese Muskularbeit auch nach dem Trauma ausgeführt werden kann, bildet die funktionelle Regeneration ab (Matziolis et al. 2006; Winkler et al. 2011).

Um die genaue funktionelle Regeneration eines Muskels zu ermitteln, ist es notwendig die gewünschte Struktur bestmöglich von agonisierenden und antagonisierenden Muskelgruppen und umliegendem Gewebe zu isolieren. Daher wurde im vorliegenden Versuchsaufbau eine invasivere *in-vivo*

Untersuchungsmethode gewählt, die gezielt den M. soleus untersucht (Rotter et al. 2012). Weniger invasive Untersuchungen gehen mit einer verminderten Genauigkeit einher, da die gesamte Muskelgruppe und nicht nur der einzelne Muskel abgebildet wird (Dartnall et al. 2009; Chawla et al. 2014). Ein Beispiel für weniger invasive Verfahren stellt die Elektromyografie (EMG) dar, welche die Potentialänderungen der einzelnen motorischen Einheiten bei Muskelaktivität wahrnimmt (Beck et al. 2008).

Der M. soleus wird in dieser Arbeit direkt durch die elektrischen Impulse stimuliert und sein Kontraktionsvermögen aufgezeichnet. Die direkte *in-vivo* Stimulation des Muskels erfordert eine genaue Positionierung der Elektrode, um interferierende Spannungsfelder zwischen den Elektroden zu vermeiden (Giannesini et al. 2005). Eine indirekte *in-vivo* Stimulation entspricht der natürlichen Innervation des Muskels mit vollständiger Aktivierung der Muskelfasern (Winkler et al. 2009). Die Innervation kann jedoch eingeschränkt sein bei traumabedingten Defekten der Strukturen der Area nervovasulorum, wie es auch der täglichen Klinik entspricht.

Bei *in-vitro* Verfahren zur Muskelkraftmessung wird der Muskel separat entfernt, ohne weitere Verbindung zum Organismus und den innervierenden Strukturen und die Kontraktionskraft mittels direkter Stimulation ermittelt (Li et al. 2008; De Naeyer et al. 2014).

Individuell vorkommende Kraftunterschiede zwischen den Tieren erschweren die Vergleichbarkeit. Im direkten Seitenvergleich zwischen linkem und rechtem Hinterlauf einer Ratte können beide Seiten dasselbe Ausmaß an Muskelkraft erreichen. Daher wird in diesem Versuchsaufbau für jede Ratte die rechte nicht traumatisierte Seite als Referenzwert für die maximal mögliche Kraft verwendet und die Muskelkraft der traumatisierten linken Seite prozentual angegeben. Diese Werte ermöglichen eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Tieren (Winkler et al. 2009).

5.1.4.2 Muskelzellproliferation

Die Zellproliferation ist nach pathologischem Gewebeverlust essenziell für die Wiederherstellung der Gewebeintegrität.

Teilungsaktive Zellen nehmen kontinuierlich am Zellzyklus teil, der in verschiedene Phasen unterteilt wird: In der M-Phase findet die Mitose, also die Zellteilung statt. Die Interphase - der Abschnitt des Zellzyklus teilungsaktiver eukaryotischer Zellen, der zwischen zwei Mitosen liegt - fasst die Stadien G1, S und G2 zusammen. In der G1-Phase laufen der zellspezifische Stoffwechsel und

das Wachstum der Zelle ab, sowie die Vorbereitung der Zellteilung mit der Synthese dafür benötigter Proteine. Die S-Phase bezeichnet die Synthesephase, in der beide DNA-Stränge als Matrize zur Verdoppelung des Erbgutes dienen. Die abschließende Vorbereitung zur Zellteilung und Reparatur von Replikationsfehlern findet in der G2-Phase statt, an die sich die oben genannte M-Phase anschließt. Die dabei entstandenen Tochterzellen können weiter am Zellzyklus teilnehmen oder gehen in die als G0-Phase bezeichnete Ruhephase über (Wenisch 2015).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Proliferationsaktivität stellt die konventionelle Untersuchung am lichtmikroskopischen Präparat dar. Dabei wird während der M-Phase die Anzahl der Mitosefiguren pro Flächeneinheit des Gewebeschnittes ermittelt (Wenisch 2015).

Eine effizientere Methode ist die immunhistochemische Darstellung proliferationsassoziierter Antigene, z.B. dem Ki-67. So können mithilfe des Antikörperklons MIB-1 alle Zellen im Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) ermittelt und prozentual zur Gesamtzellzahl angegeben werden, was dem Ki-67-Index = Proliferationsindex entspricht. Damit lässt sich die Wachstumsfraktion des entsprechenden Gewebes bestimmen, was in der Tumordiagnostik eine Rolle spielt (Scholzen & Gerdes 2000). Die kurze Halbwertszeit und Variation der Aussagekraft bei verschiedenen Zellarten sind kritisch zu betrachten (Muskhelishvili et al. 2003).

Mittels Anti-PCNA PC10 werden Zellen mit dem Proliferationsprotein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) auf ähnliche Weise detektiert. PCNA wird bei der Replikation der DNA von der DNA-Polymerase-Delta benötigt, um die DNA-Strangsynthese zu ermöglichen (Dieckman et al. 2012). PCNA besitzt dabei eine längere Halbwertszeit als Ki-67 und kann auch nach Gewebefixation noch markiert werden (Yu & Filipe 1993). Die Halbwertszeit führt aber auch dazu, dass PCNA noch nachgewiesen werden kann, wenn der Zellzyklus bereits verlassen wurde. Die Qualität der Proliferationsnachweise variiert außerdem zwischen verschiedenen Zellarten, bei malignen Zellen und je nach verwendeten Antigenlösungen (Muskhelishvili et al. 2003).

In dieser Studie wurde für den Nachweis proliferierender Zellen das Thymidinanalogon BrdU (5'-Brom-2'-desoxyuridin) verwendet. Dieses kommt physiologischerweise nicht im menschlichen Körper vor. Wird es jedoch *in-vivo* appliziert, findet der Einbau des DNA-Vorläufer-Nukleotids in der S-Phase statt. Spezifische Antikörper können dann verwendet werden, um die Zellen mit eingebauter Bromdesoxycholsäure unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Limoli & Ward 1993; Wojcik 2000). Dass BrdU in lebende Tiere injiziert

werden muss und mutagene Eigenschaften aufweist, stellt für diese Arbeit keinen Nachteil dar. Allerdings wird BrdU auch während der Reparatur von DNA in der Zelle verwendet. Dennoch wird diese Methode in der Literatur in verschiedenen Geweben verwendet, um Zellproliferation nachzuweisen, wie z.B. menschlichen Lymphomzellen und gilt als Goldstandard (Wojcik 2000; Muskhelishvili et al. 2003). Auch an Muskelzellen ist dieses Verfahren bereits erprobt (Rotter et al. 2008; Stratos et al. 2013).

5.1.4.3 Muskelzellapoptose

Abhängig vom Schweregrad der Zerstörung einer Zelle, kommt es entweder zu Nekrose mit begleitender Entzündungsreaktion oder zum programmierten Zelltod, der Apoptose. Die Apoptose kann sowohl durch interne und externe Signale ausgelöst werden und übernimmt eine wichtige Regulationsfunktion in der Embryogenese, der T-Lymphozyten-Entwicklung, der Tumorentstehung und bei irreversiblen Schäden an einer Zelle (Lemasters 2018; Wenisch 2015). Cytochrom C gelangt durch die durchlässig gewordene Mitochondrienmembran in das Zytosol und aktiviert dort Caspasen und weitere Enzyme, Endonukleasen und Proteasen, die DNA und Proteine aufspalten (Galluzzi et al. 2007). Die Bcl-Proteine (Bcl = B-cell lymphoma) steuern das Membranpotenzial und die Integrität der Mitochondrienmembran und nehmen großen Einfluss auf die Apoptoseaktivität. Bcl-2 und Bcl-xl haben einen anti-apoptotischen Effekt, dagegen gelten Bax, Bak, Bok, Bad und Bid als pro-apoptotische Faktoren (Wenisch 2015). Mikroskopische Kennzeichen der Apoptose sind ein Volumenverlust der Zelle und Vakuolenbildung im Zellplasma, Verdichtung des Chromatins (Karyopyknose) und Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis) (Grundmann et al. 2014). Im Vergleich zur Nekrose bleibt die Zytoplasmamembran intakt und es bilden sich membranumschlossene Apoptosekörper, die phagozytiert werden können ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Iorga et al. 2017; Wenisch 2015; Odin et al. 2001).

Der Goldstandard zur Identifizierung apoptotischer Zellen stellt die visuelle Inspektion mittels Licht- oder Elektronenmikroskop dar. Wesentlicher Vorteil ist die differenzierte Betrachtung und Unterscheidung der verschiedenen Formen des Zelltodes (Strasser & Ferrando-May 2008). Allerdings eignen sich diese Verfahren weniger für die quantitative Erfassung apoptotischer Zellen in einem größeren Gewebeschnitt (Pipinos et al. 2008). Aufgrund der vielfältigen Prozesse, die während der Apoptose ablaufen, ist es möglich diese auf verschiedene Weisen darzustellen. In der Lebendmikroskopie lassen sich die

verschiedenen Zellorganellen fluorimetrisch anfärben, z.B. der Nukleus mit DNA-Interkalatoren (Strasser & Ferrando-May 2008). Immunhistochemisch gelingt es mit Fluoreszenzfarbstoffen, die Aktivierung von Caspasen, Cytochrom C und anderen Enzymen, wie der Pyruvatdehydrogenase-E2 (PDC-E2), abzubilden, was aber nur als indirektes und unspezifischeres Maß für Apoptose angesehen werden kann (Strasser & Ferrando-May 2008; Duan et al. 2009; Odin et al. 2001). Vorteile dieser Untersuchungen, sind die Darstellung in-vivo stattfindender Apoptoseprozesse in der Muskelzelle (Gradl et al. 2007). Mithilfe der FACS Analyse und Permeabilitätsmarkern werden Veränderungen der Plasmamembran bereits frühzeitig erfasst, jedoch kann die detektion von nekrotischen Zellen zu falsch positiven Ergebnissen führen. (Wlodkowicz 2011, Strasser). Per ELISA kann die oligonukleosomale DNA-Fragmentierung detektiert werden (Strasser & Ferrando-May 2008). Dafür muss jedoch genügend Gewebe zur Untersuchung sicher gestellt werden (Duan et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde zur histologischen Untersuchung der apoptotischen Muskelzellen die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) verwendet. Dabei werden im Zellkern bereits fragmentierte DNA-Anteile an ihren endständigen Hydroxygruppen (3'OH-Gruppen) durch markierte Nukleotide gebunden und somit sichtbar gemacht (Huerta et al. 2007; Gavrieli et al. 1992). Diese Technik bietet eine hohe Sensitivität und technisch unkomplizierte Durchführung und wird daher häufig verwendet. Ein Nachteil ist die geringe Spezifität, da nicht exakt zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden kann, denn es kommt in beiden Verläufen zu DNA-Fragmentierung. Abgebildet wird bei dieser Untersuchung keine dynamische Entwicklung der Apoptose, sondern die zum Untersuchungszeitraum vorhandene Apoptosezellzahl. Als zusätzliche Untersuchungsmöglichkeit können die TUNEL-gefärbten Präparate mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (Huerta et al. 2007).

5.1.4.4 Lokale Leukozyteninfiltration

Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es im entsprechenden Gewebeabschnitt zu einer Vasodilatation und Margination, die die Leukozytendiapedese ermöglicht. Durch das Zusammenspiel von Selektinen und Chemokinen können Leukozyten Integrin-vermittelt an der Endotheloberfläche haften und durch Lücken zwischen den Endothelzellen ins Interstitium immigrieren. Die chemotaktischen Faktoren an der Zelloberfläche der Leukozyten führen diese zum Ort der höchsten Konzentration (Grundmann et al. 2014).

Die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen helfen als Teil der unspezifischen Abwehr bei der Phagozytose nach Muskeltrauma und lassen sich mithilfe des Oberflächenproteins CD68 bestimmen. B-Lymphozyten als Teil der spezifischen Abwehr können Antikörper produzieren und exprimieren an ihrer Oberfläche CD19. CD3 bzw. CD5 liegen an der Oberfläche der T-Lymphozyten und können so angefärbt werden (Schmetzer 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen, als Parameter der Entzündungsreaktion, mithilfe der CAE-Färbung untersucht. Bereits im Promyelozytenstadium sind die Granulozyten anfärbbar. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Verfahren mit hoher Sensitivität. Nachteil ist, dass es sich um eine Einzelpunktmessung handelt und keinen dynamischen Verlauf wiedergibt. Eine Möglichkeit der dynamischen Betrachtung der Leukozyten-Endothel-Interaktion stellt die Intravitalmikroskopie dar. Doch dabei handelt es sich um eine aufwendige und invasive Untersuchungsmethode (Gierer et al. 2008).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Muskelkraft nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2-Applikation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Traumainduktion am linken Soleusmuskel zu einer massiven Reduktion der relativen Muskelkraft führt. Im zeitlichen Verlauf verbessert sich die funktionelle Kapazität des Muskels nach Applikation von Calcitriol und VDRM2. Calcitriol kann damit bereits vorhandene Studien an Tieren und Menschen bestätigen, die ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Muskelkraft verzeichnet haben. Für VDRM2 gibt es bisher keine Studien, die einen Zusammenhang mit dessen Applikation und zunehmender funktioneller Muskelkraft nach einem Trauma untersucht haben.

In der Literatur gibt es konträre Angaben inwiefern Calcitriol die Muskelkraft und -funktion verbessert. In der Metaanalyse von Stockton et al. konnte keine signifikante Steigerung der Muskelkraft bei erwachsenen Menschen erkannt werden. Eine begrenzte Zahl Studien bewies jedoch eine verstärkte proximale Muskelkraft bei Erwachsenen mit einem Vitamin-D-Mangel (Stockton et al. 2010). Andere Studien zeigten bei Erwachsenen des höheren Lebensalters keine Steigerung der Muskelkraft und -funktion (Latham et al. 2003; Kenny et al. 2003). In ihrer Studie zeigten Bischoff et al., dass die Muskelkraft bei Vitamin-D-Mangel reduziert ist. Einen signifikanten positiven Einfluss auf die Muskelkraft konnten Beaudart et al. in ihrer systematischen Review und Metaanalyse über randomisierte kontrollierte Studien mit Menschen feststellen und auch Tanner &

Harwell beschrieben einen positiven Einfluss auf den Skelettmuskel (Beaudart et al. 2014; Tanner & Harwell 2015). Pfeifer et al. und Bischoff et al. beobachteten eine verbesserte Muskelkraft und -funktion, sowie ein reduziertes Sturzrisiko bei Senioren nach Vitamin-D-Substitution (Pfeifer et al. 2009; Bischoff et al. 2003; Bischoff-Ferrari et al. 2009). In vitro Versuche mit C2C12 Myoblasten zeigten eine reduzierte Proliferation nach Applikation von Calcitriol. In der selben Studie wurden wiederum in vivo an Mäusen eine gesteigerte Expression des VDR und von CYP27B1 beschrieben mit einem positiven Einfluss auf die Muskelregeneration (Srikuea et al. 2012). Stratos et al. untersuchte in einem vergleichbaren Tiermodell mit Ratten ebenfalls die Muskelkraft nach Calcitriolapplikation und gelangte zu übereinstimmenden Ergebnissen mit der vorliegenden Studie (Stratos et al. 2013).

Dass VDRM2 eine ähnliche Funktionsverbesserung aufweist wie Calcitriol, liegt darin begründet, dass beide Substanzen zu über 80% die gleichen Gene beeinflussen (Roberts et al. 2017). VDRM2 verfügt vermutlich über eine verminderte Transkriptionsstärke und Aktivierung von Signalkaskaden verglichen mit Calcitriol, weist aber eine längere Verfügbarkeit auf, da VDRM2 nicht von CYP24A1 abgebaut wird wie Calcitriol (Roberts et al. 2017; Makishima 2015).

Im Rahmen des Muskeltraumas konnte Stratos et al. eine Verschiebung der Ratio Kurzkontraktion zu Tetanie zugunsten der Kurzkontraktion beobachten (Stratos et al. 2013; Stratos et al. 2010). Dies erklärt sich durch den morphologischen Wandel von langsam kontrahierenden Muskelfasern zu schnell kontrahierenden Muskelfasern nach Trauma (Stratos et al. 2010). Nach Calcitriolsubstitution wurde dieser Effekt auch verstärkt beobachtet (Sørensen et al. 1979; Stratos et al. 2013). Für VDRM2 kann ein Wechsel von langsam- zu schnellkontrahierenden Fasern nur in geringerem Ausmaß angenommen werden. Zwar zeigt sich auch nach dessen Applikation eine erhöhte Kurzkontraktion an Tag 14, jedoch ohne Signifikanz, wohingegen die Tetanie signifikant vergrößert ist mit höheren Werten als Calcitriol.

Da in dieser Studie erstmals die Auswirkung von VDRM2 auf den Skelettmuskel untersucht wurde, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die detaillierte Wirkungsweise auf zellulärer Ebene zu identifizieren.

5.2.2 Muskelzellproliferation nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2-Applikation

Die Applikation von Calcitriol sowie VDRM2 zeigt in dieser Studie eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen 4 Tage nach Muskeltrauma. Die Satellitenzellen der Muskulatur gelten als maßgebliche Zelllinie bei der Bildung

neuer Muskelzellen und der damit verbundenen Regeneration. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Fibroblasten und Endothelzellen spielen dabei eine untergeordnete Rolle. Eine gesteigerte Proliferation könnte zu einer schnelleren funktionellen Regeneration beitragen und die Bildung des fibrotischen Narbengewebes reduzieren.

Ob Calcitriol einen proliferativen oder antiproliferativen Einfluss hat, differiert je nach Gewebeart. Das Plattenepithel der Haut wird in seiner Proliferation eher gestoppt, dafür zeigt sich eine verbesserte Differenzierung der Zellen, was klinisch bereits genutzt wird. In einigen benignen und malignen Tumoren konnte eine Reduktion der Proliferation festgestellt werden nach Calcitriolsubstitution (Verstuyf & Bouillon 2013). Campbell et al. berichtet von strukturellen Variationen der Bindungsdomänen am VDR in den verschiedenen Geweben, die zu veränderten Signalkaskaden führen können und damit auch kontroverse Proliferationseffekte in den Geweben erklären können (Campbell 2014).

Doch selbst spezifisch am Skelettmuskelgewebe gibt es in der Literatur Uneinigkeit in Bezug auf die Proliferation. Srikuea et al konnten *in vitro* für C2C12 Zellen von Mäusen nachweisen, dass Calcitriol die Myoblastenproliferation inhibiert. Andere Studien zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen Zuwachs (Capiati 1999, Buitrago2012). Eine mögliche Erklärung wäre, dass es zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede gibt. Auch eine direkte Übertragung von *in vitro* durchgeführten Experimenten auf den Organismus *in vivo* ist nicht immer möglich. So beobachtete Srikuea in seiner Studie *in vivo* eine Hochregulation von VDR- und CYP27B1-Expression im Skelettmuskelzellen und sieht darin einen entscheidenden Faktor in der Muskelregeneration bei der Reparatur geschädigter Muskelzellen und bei der Bildung neuer Muskelfasern (Srikuea et al. 2012).

In bisherigen Untersuchungen zeigte VDRM2 vorwiegend eine antiproliferative Wirkung, sowohl bei Epithelien der Haut als auch der Prostata (Ma et al. 2006; Roberts et al. 2017). Auch andere Calcitriolanaloga beschreiben antiproliferative Effekte, z.B. in Melanomzellen (Wasiewicz et al. 2015). In dieser Studie wird erstmals ein proliferativer Effekt am Muskelgewebe nachgewiesen. Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen je nach Gewebe weisen Parallelen zu Calcitriol auf. Daher lässt sich vermuten, dass auch VDRM2 gewebespezifisch wirkt.

Calcitriol wirkt hauptsächlich über seine Bindung am VDR. Die Aktivierung des VDR und von p38 (Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor(CDI)) führt zu einem Anstieg des Cyclin D3 (Cyclin-abhängige Kinase (CDK)) (Irazoqui et al. 2014). Dieser Anstieg führt in proliferierenden Myoblasten zu einer frühen

myogenetischen Differenzierung. (Gurung 2012) Cyclin D3 ist ein Bestandteil des Zellzykluses (Campbell 2014). Für Calcitriol ist bekannt, dass es bei C2C12 Zellen erst einen verstärkten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt und daran anschließend einen Arrest in der G0-/G1-Phase (Irazoqui et al. 2014).

Weitere proproliferative Effekte werden durch Calcitriol über Proteinkinase B-abhängige Vorgänge in C2C12 Zellen vermittelt und stimulieren die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben (Buitrago et al. 2012).

Ob diese Wirkungen auch auf Calcitriolanaloga, insbesondere VDRM2, übertragen werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen. Die vorliegende Studie kann nahelegen, dass Calcitriol und VDRM2 die Proliferation der Satellitenzellen bei der Muskelregeneration stimulieren.

5.2.3 Muskelzellapoptose nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2-Applikation

In Bezug auf die Muskelregeneration ist die Apoptose ein wichtiger Bestandteil der Destruktionsphase (Järvinen et al. 2005). Daher wurden auch in dieser Arbeit am ersten Tag nach Traumainduktion die meisten apoptotischen Zellen nachgewiesen. Eine koordinierte Phagozytose der zerstörten Faseranteile ist unerlässlich, um mit der Restitution der verbliebenen Muskelanteile zu beginnen. Durch die Substitution von Calcitriol und VDRM2 konnte eventuell eine schnellere Phagozytose der apoptotischen Zellen erreicht werden. So war an Tag 4 die Zellzahl signifikant erniedrigt, nachdem den Versuchstieren Calcitriol appliziert worden war. VDRM2 hatte einen geringeren Effekt als Calcitriol, was sich am Ehesten mit der verminderten Transkriptionsstärke der angesteuerten Gene erklären lässt. Gegen eine gesteigerte Phagozytose spricht allerdings der suppressive Einfluss von Calcitriol auf den Faktor IL-2. IL-2 aktiviert vor allem T-Zellen, aber auch die Makrophagen, deren Aufgabe die Phagozytose ist (Takeuchi et al. 1998). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Calcitriol und sein Analogon VDRM2 über andere Signalwege als IL-2, die Makrophagen aktivieren kann (Lemire 1992; Bar-Shavit et al. 1981).

Eine weitere Erklärung für die reduzierte Apoptosezellzahl wäre, dass Calcitriol und VDRM2 die dysregulierten Muskelzellen so beeinflussen, dass diese weder in den Modus des programmierten Zelltodes noch in den der Nekrose übergehen, sondern repariert werden können. Bezugnehmend auf Studien zur Wirkung von Calcitriol und seiner Analoga auf Tumorzellen werden dort gegenteilige Effekte beschrieben. Krebszellen entstehen häufig aus Zellen, die fälschlicherweise dem Apoptoseprozess entgehen und Calcitriol kann bei verschiedenen Krebszellen zu einer Induktion der Apoptose führen (Hansen et al. 2001; van den Bemd et al.

2000). Dennoch sind Tumorzellen nicht direkt vergleichbar mit regenerierenden Muskelzellen der peripheren Skelettmuskulatur.

5.2.4 Lokale Leukozyteninfiltration nach Trauma und Calcitriol- oder VDRM2-Applikation

Die Aktivierung des VDR führt in einigen Geweben, z.B. dem Pankreas, und Zellarten, wie den T-Zellen und dendritischen Zellen, zu einer Reduktion der Inflammation. Calcitriol ist bekannt als ein potenter Immunmodulator, der beispielsweise die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B hemmt, sowie IL-2, IL-8, IFN- γ und G-CSF (Takeuchi et al. 1998). Besonders IL-8 spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die neutrophilen Granulozyten. Über die Aktivierung der Rezeptoren CXCR1 und 2 wird G-Protein-gekoppelt ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg vermittelt. So fördert IL-8 wesentlich die Chemotaxis und die Expression von Adhäsionsmolekülen, was unabdingbar ist, damit die neutrophilen Granulozyten ihren Wirkungsort erreichen können (Xie 2001). In dieser Arbeit, in der das periphere Muskelgewebe untersucht wird, sind die Auswirkungen der immunsuppressiven Komponente des Calcitriols nicht sehr stark ausgeprägt. Zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung, weisen die Tiere der Calcitriol- und VDRM2-Gruppe zwar niedrigere Leukozytenzahlen im untersuchten Muskelgewebeschnitt auf, jedoch nie mit statistischer Signifikanz. Zu VDRM2 gibt es aufgrund der geringen Studienlage keine weiteren Erkenntnisse über die Auswirkung von VDRM2 auf die lokale Leukozyteninfiltration in Geweben. Das Calcitriol im hier untersuchten Muskelgewebe und in vorausgegangenen Studien keine deutlichere Reduktion der lokalen Leukozyteninfiltration aufweist, könnte sich damit erklären lassen, dass die eingeleiteten Signaltransduktionsprozesse nach Bindung am VDR nicht nur ligandenabhängig sind, sondern auch gewebeabhängig (Stratos et al. 2013; Barragan et al. 2015). Die Interleukine, als Vermittler der Immunantwort, werden ebenfalls zell- und gewebespezifisch reguliert (Wöbke et al. 2014).

5.2.5 Muskelfaserdiameter und -gewebefraktion nach Calcitriol oder VDRM2-Applikation

Zusammen betrachtet kann man durch die Muskelgewebefraktion und den Muskelfaserdiameter einen Eindruck von der Muskelmasse gewinnen. Dass diese nach Trauma reduziert ist im Vergleich zur vorherbestehenden Masse ist einleuchtend, da zum einen Gewebe zerstört wurde und das überbleibende Gewebe durch therapeutische Schonung weniger beansprucht wird. Die Erhöhung von Muskelmasse kann auch im Rahmen des natürlichen

Alterungsprozesses und bei Erkrankungen, die mit einer Sarkopenie einhergehen, wichtig sein, um Stürze und deren Folgen zu verhindern.

Für Calcitriol gibt es kontroverse Ergebnisse in verschiedenen Studien. Beaudart et al. fassen in ihrem Review zusammen, dass bei den Patienten der Studie keine signifikante Zunahme der Muskelmasse nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Studie kann ein Einfluss auf die Muskelmasse nicht ausgeschlossen werden, insofern, dass Calcitriol 14 Tage nach Muskeltraum zu einem signifikant erhöhten Muskelfaserdiameter führt. Die Muskelgewebefraktion zeigt dagegen bei beiden Substanzen keine signifikante Erhöhung zu allen Untersuchungszeitpunkten, was Beaudart et al.'s Ergebnisse bekräftigt (Beaudart et al. 2014).

Da die Anzahl der proliferierenden und differenzierenden Satellitenzellen limitiert ist, kann ein großer Anteil der Muskelmasse nicht durch vermehrte Muskelzellbildung stattfinden, sondern hauptsächlich über eine Vergrößerung der bestehenden Muskelfasern. Daher sollte der Muskelfaserdiameter als ernstzunehmende Komponente bei der Steigerung der Muskelmasse betrachtet werden.

6. Limitation und Ausblick

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden funktionelle und histologische Parameter der Muskelregeneration nach Applikation der beiden Substanzen Calcitriol und VDRM2 untersucht. Molekulare Abläufe und die Pathophysiologie nach Substitution wurden nicht untersucht.

Wie das neuartige Calcitriolanalogen VDRM2 seine Wirkung an der peripheren Skelettmuskulatur entfaltet, ist bisher nicht detailliert untersucht worden und benötigt eingehender Forschungsarbeit. Doch auch für Calcitriol konnten die Kontroversen in der Literatur nicht aufgeklärt werden durch die bestehenden wissenschaftlichen Arbeiten.

Mögliche Wechselwirkungen im Organismus in vivo, insbesondere eine Hyperkalzämie, wurden in dieser Arbeit nicht beurteilt. Bereits durchgeführte Studien konnten Nahe legen, dass bei den hier verwendeten minimalen Dosierungen, keine unerwünschten Nebenwirkungen zu erwarten waren. In weiterführenden Studien mit höheren Dosierungen sollte dieser Aspekt jedoch miteinbezogen werden, da VDRM2 in diesem Punkt einen klinisch relevanten Vorteil gegenüber Calcitriol haben könnte.

Eine direkte Übertragung der Ergebnisse des hier verwendeten Rattenmodells auf den Menschen ist nicht ohne weiteres möglich und es sollte vorerst weitere Grundlagenforschung, insbesondere zu VDRM2, betrieben werden, bevor klinische Studien am Menschen in Betracht gezogen werden.

Abschließend kann aus dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass Calcitriol und VDRM2 einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie des Muskeltraumas bieten könnten und daher weiter untersucht werden sollten.

7. Thesen

1. Muskeltraumata schränken die Funktionalität der betroffenen Extremitäten ein und können langfristige Folgen haben.
2. Die regenerativen Prozesse, die nach einem Muskeltrauma ablaufen, können auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden können.
3. Calcitriol agiert am Muskelgewebe über rezeptorgebundene Signalwege, sowie durch Auslösung direkter intrazellulärer Signalkaskaden.
4. Die Calcitriolsubstitution zeigt eine höhere Wirkung auf die Regeneration bei vorher bestehendem Calcitriolmangel.
5. VDRM2 wirkt am Vitamin-D-Rezeptor auf ähnliche Weise wie Calcitriol und beeinflusst zum großen Teil die gleichen Signalwege. VDRM2 wird nicht auf dieselbe Weise abgebaut wie Calcitriol.
6. Die Applikation von Calcitriol führt 14 Tage nach der Traumainduktion zu signifikant verbesserten Werten bei der Muskelkraft, sowohl für die Kurzkontraktion als auch die Tetanie. Die VDRM2-Gabe steigert signifikant die tetanische Kraft an Tag 14 und zeigt bei der Kurzkontraktion eine ähnliche Kinetik wie Calcitriol.
7. Calcitriol verstärkt das zelluläre turn-over 4 Tage nach dem Muskeltrauma in Bezug auf eine signifikant verringerte Apoptoserate und eine signifikant erhöhte Zellproliferation. Der zelluläre turn-over wird durch VDRM2 nicht so wirksam beeinflusst, wie durch Calcitriol, weist jedoch eine signifikant erhöhte Zellproliferation auf.
8. Der Muskelfaserdiameter weist am 14. Tag einen signifikant höheren Durchmesser auf.
9. Die Muskelgewebeinflammation, gemessen an den lokal infiltrierenden Leukozyten, sowie die Muskelgewebefraktion lassen sich nicht von Calcitriol oder VDRM2 beeinflussen und ist zwischen allen drei Gruppen gleich.
10. Calcitriol kann in dieser Arbeit einen positiven Einfluss auf die Muskelregeneration nach Trauma bestätigen.
11. VDRM2 wird in dieser Studie erstmals im Zusammenhang mit Muskelgewebe untersucht und fördert die Muskelregeneration. VDRM2

stellt einen potentiellen neuen Behandlungsansatz bei Muskelverletzungen dar.

8. Literaturverzeichnis

- Altmeppen, J., Nerlich, M. & Tscherne, H., 2003. Weichteilverletzungen und -infektionen : mit 57 Tabellen, Berlin [u.a.]: Springer.
- Alway, S.E. et al., 2005. Muscle Hypertrophy Models: Applications for Research on Aging. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 30(5), pp.591–624.
- Anderhuber, F. et al., 2012. Waldeyer : Anatomie des Menschen : Lehrbuch und Atlas in einem Band, De Gruyter.
- Aumüller, G. et al., 2017. Anatomie 1500 Abbildungen, Stuttgart: Thieme.
- Aumüller, G. et al., 2010. Duale Reihe Anatomie 2. Auflage., Stuttgart: Thieme.
- Ausoni, S. & Sartore, S., 2009. From fish to amphibians to mammals: in search of novel strategies to optimize cardiac regeneration. *The Journal of cell biology*, 184(3), pp.357–64.
- Bar-Shavit, Z. et al., 1981. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and the regulation of macrophage function. *Calcified Tissue International*, 33(1), pp.673–676.
- Barker, T. et al., 2013. Higher serum 25-hydroxyvitamin D concentrations associate with a faster recovery of skeletal muscle strength after muscular injury. *Nutrients*, 5(4), pp. 1253-1275.
- Barragan, M. et al., 2015. Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. *Nutrients*, 7(9), pp.8127–8151.
- Beaudart, C. et al., 2014. The Effects of Vitamin D on Skeletal Muscle Strength, Muscle Mass, and Muscle Power: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(11), pp.4336–4345.
- Beck, T.W. et al., 2008. The effects of electrode placement and innervation zone location on the electromyographic amplitude and mean power frequency versus isometric torque relationships for the vastus lateralis muscle. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, 18, pp. 317-328.
- Beiras-Fernandez, A. et al., 2003. Morphological assessment of reperfusion injury in a concordant xenogeneic primate model. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*, 8(3), pp.50–52.
- van den Bermd, G.-J., Pols, H. & van Leeuwen, J., 2000. Anti-Tumor Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Vitamin D Analogs. *Current Pharmaceutical Design*, 6(7), pp.717–732.

- Berchtold, R. & Keller, R., 2007. Repetitorium Chirurgie : mit 180 Tabellen, Elsevier, Urban & Fischer.
- Bettoun, D.J. et al., 2003. Retinoid X Receptor Is a Nonsilent Major Contributor to Vitamin D Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Molecular Endocrinology*, 17(11), pp.2320–2328.
- Bikle, D.D., Halloran, B.P. & Riviere, J.E., 1994. Production of 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ by Perfused Pig Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(5), pp.796–798.
- Bischoff-Ferrari, H.A. et al., 2004. Vitamin D Receptor Expression in Human Muscle Tissue Decreases With Age. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(2), pp.265–269.
- Bischoff-Ferrari, H.A. et al., 2009. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, 339, p.b3692.
- Bischoff, H.A. et al., 2003. Effects of Vitamin D and Calcium Supplementation on Falls: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(2), pp.343–351.
- Bischoff, H.A. et al., 2001. In Situ Detection of 1,25-dihydroxyvitamin D Receptor In human Skeletal Muscle Tissue. *The Histochemical Journal*, 33(1), pp.19–24.
- Bischoff, H.A. et al., 1999. Muscle strength in the elderly: its relation to vitamin D metabolites. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 80(1), pp.54–8.
- Boehm, M.F. et al., 1999. Novel nonsecosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Chemistry & Biology*, 6(5), pp.265–275.
- de Boland, A.R., Albornoz, L.E. & Boland, R., 1983. The effect of cholecalciferolin vivo on proteins and lipids of skeletal muscle from rachitic chicks. *Calcified Tissue International*, 35(1), pp.798–805.
- Boland, R., 1986. Role of Vitamin D in Skeletal Muscle Function. *Endocrine Reviews*, 7(4), pp.434–448.
- Boonstra, A. et al., 2001. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*, 167(9), pp.4974–4980.
- Borisov, A.B., 1999. Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals:

- do nonprimate models resemble human pathology? *Wound Repair and Regeneration*, 7(1), pp.26–35.
- Bruyère, O. et al., 2017. Relevance of vitamin D in the pathogenesis and therapy of frailty. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(1), pp.26–29.
- Buitrago, C.G., Arango, N.S. & Boland, R.L., 2012. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(4), pp.1170–1181.
- Byrne, C. & Eston, R., 2002. The effect of exercise-induced muscle damage on isometric and dynamic knee extensor strength and vertical jump performance. *Journal of Sports Sciences*, 20(5), pp.417–425.
- Cameron, I.D. et al., 2012. Interventions for preventing falls in older people in care facilities and hospitals. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 12/2012 [zitiert am 03.06.2017].
URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005465.pub3>
- Campbell, M.J., 2014. Vitamin D and the RNA transcriptome: more than mRNA regulation. *Frontiers in Physiology*, 5, p.181.
- Ceglia, L. et al., 2013. A randomized study on the effect of vitamin D_3 supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(12), pp.E1927-35.
- Ceglia, L. & Harris, S.S., 2013. Vitamin D and Its Role in Skeletal Muscle. *Calcified Tissue International*, 92(2), pp.151–162.
- Chanet, A. et al., 2017. Vitamin D supplementation restores the blunted muscle protein synthesis response in deficient old rats through an impact on ectopic fat deposition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, pp.30–38.
- Chargé, S.B.P. & Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), pp.209–238.
- Chawla, A. et al., 2014. Non-invasive isometric force measurement of plantar flexors in rats. *Muscle & Nerve*, 50(5), pp.812–821.
- Church, J.C.T., Noronha, R.F.X. & Allbrook, D.B., 1966. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *British Journal of Surgery*, 53(7), pp.638–642.
- Clarkson, P. & Hubal, M., 2002. Exercise-Induced Muscle Damage in Humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 81(11), pp.S52–S69.

- Colston, K.W. et al., 1994. Localisation of vitamin D receptor in normal human duodenum and in patients with coeliac disease. *Gut*, 35(9), pp.1219–25.
- Dartnall, T.J. et al., 2009. Eccentric Muscle Damage Has Variable Effects on Motor Unit Recruitment Thresholds and Discharge Patterns in Elbow Flexor Muscles. *Journal of Neurophysiology*, 102(1), pp.413–423.
- Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG), 2017. S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris Update 2017 [Internet]. 10/2017 [zitiert am 13.12.2017]. URL:https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-001l_S3_Therapie_Psoriasis-vulgaris_2017-12.pdf.
- Delmonico, M.J. et al., 2007. Alternative Definitions of Sarcopenia, Lower Extremity Performance, and Functional Impairment with Aging in Older Men and Women. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(5), pp.769–774.
- Deutsche Gesellschaft für Kinderendokrinologie und –diabetologie (DGKED), E.V., 2016. S1-Leitlinie – Vitamin-D-Mangel-Rachitis Inhalt Definition und Basisinformation [Internet]. 03/2016 [zitiert am 15.12.2017]. URL: www.awmf.org/leitlinien/detail/II/174-007.html
- Deutzmann, R. et al., 2016. Duale Reihe Biochemie 4. Auflage., Stuttgart: Thieme.
- Dieckman, L.M., Freudenthal, B.D. & Washington, M.T., 2012. PCNA Structure and Function: Insights from Structures of PCNA Complexes and Post-translationally Modified PCNA. In MacNeill S, Hrsg. *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function*. Dordrecht: Springer, pp.281–299.
- Dirix, A. & Tittel, K., 1989. Olympia-Buch der Sportmedizin : eine Veröffentlichung des IOC in Zusammenarbeit mit der FIMS, Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Dirks-Naylor, A.J. & Lennon-Edwards, S., 2011. The effects of vitamin D on skeletal muscle function and cellular signaling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3–5), pp.159–168.
- Doll, B. et al., 2001. Critical Aspects of Tissue-Engineered Therapy for Bone Regeneration. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 11(1–3), p.26.
- Duan, H. et al., 2009. Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats. *Apoptosis*, 14(1), pp.52–65.
- Ehrhardt, J. & Morgan, J., 2005. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Current Opinion in Neurology*, 18(5), pp.548–553.

- Falvo, M.J. & Bloomer, R.J., 2006. Review of Exercise-Induced Muscle Injury: Relevance for Athletic Populations. *Research in Sports Medicine*, 14(1), pp.65–82.
- Feldman, D., Krishnan, A. V. & Swami, S., 2013. Vitamin D: Biology, Actions and Clinical Implications. In Marcus, R Hrsg., *Osteoporosis*. Elsevier, pp. 283–328.
- Fink, E. et al., 2003. Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(7), pp.421–429.
- Fridén, J. & Lieber, R.L., 1992. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise*, 24(5), pp.521–30.
- Galluzzi, L. et al., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), pp.1237–1243.
- Garcia, L.A. et al., 2011. 1,25(OH)₂vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 152(8), pp.2976–86.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*, 119(3), pp.493–501.
- Giannesini, B. et al., 2005. New experimental setup for studying strictly noninvasively skeletal muscle function in rat using ¹H-magnetic resonance (MR) imaging and ³¹P-MR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54(5), pp.1058–1064.
- Gierer, P. et al., 2008. Sublethal Trauma Model With Systemic Endotoxemia for the Study of Microcirculatory Disorders After the Second Hit. *Journal of Surgical Research*, 147, pp.68–74.
- Girgis, C.M. et al., 2013. The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Endocrine Reviews*, 34(1), pp.33–83.
- Girgis, C.M. et al., 2014. The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. *Endocrinology*, 155(9), pp.3227–37.
- Girgis, C.M. et al., 2014. Vitamin D Signaling Regulates Proliferation, Differentiation, and Myotube Size in C2C12 Skeletal Muscle Cells.

- Endocrinology, 155(2), pp.347–357.
- Gradl, G. et al., 2007. Continuous intra-arterial application of substance P induces signs and symptoms of experimental complex regional pain syndrome (CRPS) such as edema, inflammation and mechanical pain but no thermal pain. *Neuroscience*, 148, pp.757–765.
- Grounds, M.D. et al., 2002. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(5), pp.589–610.
- Grounds, M.D., 1991. Towards Understanding Skeletal Muscle Regeneration. *Pathology - Research and Practice*, 187(1), pp.1–22.
- Grounds, M.D. & McGeachie, J.K., 1989. Myogenic cells of regenerating adult chicken muscle can fuse into myotubes after a single cell division in vivo. *Experimental Cell Research*, 180(2), pp.429–439.
- Grundmann, E. et al., 2014. *Kurzlehrbuch Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie mit 90 Tabellen*, Elsevier, Urban & Fischer.
- Hansen, C.M. et al., 2001. Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 6, pp.D820-48.
- Hassan-Smith, Z.K. et al., 2017. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ exert distinct effects on human skeletal muscle function and gene expression. *PloS one*, 12(2), p.e0170665.
- Hawke, T.J. & Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, 91(2), pp.534–551.
- Hayashi, M. et al., 1998. Evaluation of ischemic damage in the skeletal muscle with the use of electrical properties. *The Journal of surgical research*, 80(2), pp.266–71.
- Histing, T. et al., 2011. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 49(4), pp.591–599.
- Holick, M.F. et al., 2011. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(7), pp.1911–1930.
- Holick, M.F., 2006. The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. *Current Osteoporosis Reports*, 4(3), pp.96–102.
- Holick, M.F., 2007. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), pp.266–281.

- Huard, J., Li, Y. & Fu, F.H., 2002. Muscle Injuries And Repair: Current Trends In Research. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 84(5), pp.822–832.
- Huerta, S. et al., 2007. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 139, pp.143–156.
- Huppelsberg, J. & Walter, K., 2013. *Kurzlehrbuch Physiologie*, 4.Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Hurme, T. et al., 1991. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Medicine and science in sports and exercise*, 23(7), pp.801–10.
- Iorga, A., Dara, L. & Kaplowitz, N., 2017. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), p.1018.
- Irazaqui, A.P., Boland, R.L. & Buitrago, C.G., 2014. Actions of 1,25(OH)₂-vitamin D3 on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *Journal of molecular endocrinology*, 53(3), pp.331–43.
- Järvinen, M. & Sorvari, T., 1975. 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 Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*, 83(2), pp.259–265.
- Järvinen, T. et al., 2005. Muscle Injuries. *The American Journal of Sports Medicine*, 33(5), pp.745–764.
- Kääriäinen, M. et al., 2000. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscular disorders : NMD*, 10(2), pp.121–32.
- Kannus, P. et al., 2003. A short review. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 13(3), pp.150–154.
- Kenny, A.M. et al., 2003. Effects of Vitamin D Supplementation on Strength, Physical Function, and Health Perception in Older, Community-Dwelling Men. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(12), pp.1762–1767.
- Knappe, T. et al., 2005. Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice. *Critical Care Medicine*, 33(8), pp.1805–1813.
- LaBarge, M.A. & Blau, H.M., 2002. Biological Progression from Adult Bone

- Marrow to Mononucleate Muscle Stem Cell to Multinucleate Muscle Fiber in Response to Injury. *Cell*, 111(4), pp.589–601.
- Lamb, G.D., 2005. Rippling muscle disease may be caused by 'silent' action potentials in the tubular system of skeletal muscle fibers. *Muscle & Nerve*, 31(5), pp.652–658.
- Latham, N.K. et al., 2003. A Randomized, Controlled Trial of Quadriceps Resistance Exercise and Vitamin D in Frail Older People: The Frailty Interventions Trial in Elderly Subjects (FITNESS). *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(3), pp.291–299.
- Lau, W.Y. et al., 2015. Assessment of Muscle Pain Induced by Elbow-Flexor Eccentric Exercise. *Journal of Athletic Training*, 50(11), pp.1140–1148.
- Lehmann, B., Tiebel, O. & Meurer, M., 1999. Expression of vitamin D 3 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D 3 or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents - a preliminary study. *Archives of Dermatological Research*, 291(9), pp.507–510.
- Lemasters, J.J., 2018. Molecular Mechanisms of Cell Death. In *Molecular Pathology*. Elsevier, pp. 1–24.
- Lemire, J.M., 1992. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Cellular Biochemistry*, 49(1), pp.26–31.
- Lemon, B.D. & Freedman, L.P., 1996. Selective effects of ligands on vitamin D3 receptor- and retinoid X receptor-mediated gene activation in vivo. *Molecular and cellular biology*, 16(3), pp.1006–16.
- Li, D., Yue, Y. & Duan, D., 2008. Preservation of Muscle Force in Mdx3cv Mice Correlates with Low-Level Expression of a Near Full-Length Dystrophin Protein. *The American Journal of Pathology*, 172(5), pp.1332–1341.
- Limoli, C.L. & Ward, J.F., 1993. A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. *Radiation research*, 134(2), pp.160–9.
- Linseisen, J. et al., 2011. Stellungnahme: Vitamin D und Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten. Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE).
- Lynch, G.S. et al., 2000. Contraction-induced injury to single permeabilized muscle fibers from mdx, transgenic mdx, and control mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(4), pp.C1290–C1294.
- Ma, Y. et al., 2006. Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *Journal of*

- Clinical Investigation, 116(4),pp.892-904.
- Makishima, M., 2015. Current Topics on Vitamin D. Nonsecosteroidal vitamin D modulators and prospects for their therapeutic application. *Clinical calcium*, 25(3), pp.403–11.
- Makishima, M. & Yamada, S., 2011. Chapter 79 – The Bile Acid Derivatives Lithocholic Acid Acetate and Lithocholic Acid Propionate are Functionally Selective Vitamin D Receptor Ligands. In: Feldmann D Hrsg., *Vitamin D*. 3. Aufl. Elsevier, pp. 1509–1524.
- Mangelsdorf, D.J. et al., 1995. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*, 83, pp.835–839.
- Matziolis, G. et al., 2006. Autologous Bone Marrow-Derived Cells Enhance Muscle Strength Following Skeletal Muscle Crush Injury in Rats. *Tissue Engineering*, 12(2), pp.361–367.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9(2), pp.493–5.
- Meffert, R.H. et al., 2008. Muscle strength quantification in small animals: A new transcutaneous technique in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(11), pp.1526–1532.
- Mellerowicz, H., 1996. Operative Therapie von Muskelverletzungen : sonographische, kernspintomographische, biomechanische und morphologische Untersuchungen : mit 8 Tabellen, In: *Hefte zu der Zeitschrift Der Unfallchirurg*. Berlin: Springer.
- Menetrey, J. et al., 1999. Suturing Versus Immobilization of a Muscle Laceration. *The American Journal of Sports Medicine*, 27(2), pp.222–229.
- Müller-Wohlfahrt, H.-W., Hänsel, L. & Ueblacker, P., 2014. *Muskelverletzungen im Sport*, New York: Thieme.
- Muskhelishvili, L. et al., 2003. Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Histone mRNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(12), pp.1681–1688.
- Na, S. et al., 2011. A Nonsecosteroidal Vitamin D Receptor Modulator Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis without Causing Hypercalcemia. *Autoimmune Diseases*, Article ID 132958.
- De Naeyer, H. et al., 2014. Androgenic and estrogenic regulation of Atrogin-1, MuRF1 and myostatin expression in different muscle types of male mice.

- European Journal of Applied Physiology, 114(4), pp.751–761.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H. & Barker, J., 2009. Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361(5), pp.496–509.
- Nevitt, G.J. & Hutchinson, P.E., 1996. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *British Journal of Dermatology*, 135(4), pp.533–537.
- O'Donnell, S. et al., 2008. Systematic review of the benefits and harms of calcitriol and alfacalcidol for fractures and falls. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 26(6), pp.531–542.
- Odin, J.A. et al., 2001. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *The Journal of clinical investigation*, 108(2), pp.223–32.
- Pfeifer, M. et al., 2009. Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporosis International*, 20(2), pp.315–322.
- Pipinos, I.I. et al., 2008. The Myopathy of Peripheral Arterial Occlusive Disease: Part 1. Functional and Histomorphological Changes and Evidence for Mitochondrial Dysfunction. *Vascular and Endovascular Surgery*, 41(6), pp.481–489.
- Pointon, J.J., Francis, M.J.O. & Smith, R., 1979. Effect of Vitamin D Deficiency on Sarcoplasmic Reticulum Function and Troponin C Concentration of Rabbit Skeletal Muscle. *Clinical Science*, 57(3).
- Pojednic, R.M. et al., 2015. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D3 on the expression of the vitamin d receptor in human skeletal muscle cells. *Calcified tissue international*, 96(3), pp.256–63.
- Rachez, C. & Freedman, L.P., 2000. Mechanisms of gene regulation by vitamin D3 receptor: a network of coactivator interactions. *Gene*, 246(1), pp.9–21.
- Reichrath, J. et al., 1998. Immunohistochemical Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 Receptor in Cervical Carcinoma. *Histochemical Journal*, 30(8), pp.561–567.
- Reichrath, J. et al., 1997. Topical calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) treatment of psoriasis: an immunohistological evaluation. *Acta dermato-venereologica*, 77(4), pp.268–72.
- Roberts, J.M. et al., 2017. Vitamin D receptor activation reduces VCaP xenograft tumor growth and counteracts ERG activity despite induction of

- TMPRSS2:ERG. *Oncotarget*, 8(27), pp.44447-44464.
- Roche, S.M. et al., 2015. Measurement of Maximum Isometric Force Generated by Permeabilized Skeletal Muscle Fibers. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (100), p.e52695.
- Ross, A.C., 2011. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington DC: The National Academies Press.
- Rotter, R. et al., 2012. Erythropoietin enhances the regeneration of traumatized tissue after combined muscle-nerve injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 72(6), pp.1567–1575.
- Rotter, R. et al., 2008. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(12), pp.1618–1626.
- Roy, R.R. et al., 1999. Differential response of fast hindlimb extensor and flexor muscles to exercise in adult spinalized cats. *Muscle & Nerve*, 22(2), pp.230–241.
- Sato, M. et al., 2010. A nonsecosteroidal vitamin D receptor ligand with improved therapeutic window of bone efficacy over hypercalcemia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(6), pp.1326-1336.
- Schaser, K.-D. et al., 2005. Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(1), pp.231–241.
- Schmetzer, O., 2015. Basics Immunologie, 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Schnabel D, 2015. Vitamin D: ein wichtiges Hormon im Kindes- und Jugendalter. *Kinderärztliche Praxis. Kinderärztliche Praxis*, 86(3), pp.170–176.
- Scholzen, T. & Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), pp.311–322.
- Seifert, M., Tilgen, W. & Reichrath, J., 2009. Expression of 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (1alphaOHase, CYP27B1) splice variants in HaCaT keratinocytes and other skin cells: modulation by culture conditions and UV-B treatment in vitro. *Anticancer research*, 29(9), pp.3659–67.
- Simpson, R.U., Thomas, G.A. & Arnold, A.J., 1985. Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and activities in muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 260(15), pp.8882-8891.
- Sørensen, O.H. et al., 1979. Myopathy in Bone Loss of Ageing: Improvement by

- Treatment with 1 α -hydroxycholecalciferol and Calcium. *Clinical Science*, 56(2), pp.157–161.
- Srikuea, R. et al., 2012. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. *AJP: Cell Physiology*, 303(4), pp.C396–C405.
- Stayrook, K.R. et al., 2011. Chapter 78 – Non-secosteroidal Ligands and Modulators. In: Feldmann D Hrsg., *Vitamin D*. 3. Aufl. Elsevier pp. 1497–1508.
- Stockton, K.A. et al., 2010. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International*, 22(3), pp.859–871.
- Storch, T.G. & Talley, G.D., 1988. Oxygen concentration regulates the proliferative response of human fibroblasts to serum and growth factors. *Experimental Cell Research*, 175(2), pp.317–325.
- Strasser, C. & Ferrando-May, E., 2008. Der illustrierte Zelltod: zur Mikroskopie apoptotischer Prozesse. *BioSpektrum*, 14, pp.597–599.
- Stratos, I. et al., 2007. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *Journal of Applied Physiology*, 103(5), pp.1857–1863.
- Stratos, I., Li, Z., et al., 2012. Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 17(3), pp.269–77.
- Stratos, I., Richter, N., et al., 2012. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. *Journal of Pineal Research*, 52(1), pp.62–70.
- Stratos, I. et al., 2010. Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(7), pp.950-957.
- Stratos, I. et al., 2013. Vitamin D Increases Cellular Turnover and Functionally Restores the Skeletal Muscle after Crush Injury in Rats. *The American Journal of Pathology*, 182(3), pp.895–904.
- Stumpf, W. et al., 1979. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*, 206(4423).
- Takeuchi, A. et al., 1998. Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) as a Molecular Target for 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3-Mediated Effects. *The*

- Journal of Immunology, 160(1).
- Tanner, S.B. & Harwell, S.A., 2015. More than healthy bones: a review of vitamin D in muscle health. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 7(4), pp.152–9.
- Thorsson, O. et al., 1998. Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Medication on Satellite Cell Proliferation During Muscle Regeneration. *The American Journal of Sports Medicine*, 26(2), pp.172–176.
- Tiidus, P.M., 2008. *Skeletal muscle damage and repair*, Champaign, IL: Human Kinetics.
- Vaittinen, S. et al., 2002. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscular disorders : NMD*, 12(6), pp.584–7.
- Verstuyf, A. & Bouillon, R., 2013. Vitamin D and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(7), p.1018.
- Wagatsuma, A. & Sakuma, K., 2014. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. *BioMed research international*, 2014, p.121254.
- Wang, Y. & DeLuca, H.F., 2011. Is the Vitamin D Receptor Found in Muscle? *Endocrinology*, 152(2), pp.354–363.
- Wasiewicz, T. et al., 2015. Antitumor Effects of Vitamin D Analogs on Hamster and Mouse Melanoma Cell Lines in Relation to Melanin Pigmentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp.6645–6667.
- Wenisch, D. phil. nat. T., 2015. *Kurzlehrbuch Biologie 4. Auflage.*, München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Winkler, T. et al., 2009. Dose–Response Relationship of Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Functional Regeneration After Severe Skeletal Muscle Injury in Rats. *Tissue Engineering: Part A*, 15, pp.487–492.
- Winkler, T. et al., 2011. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma Muscle function against the background of MRI and histological findings. *Acta Orthopaedica*, 82(1), pp.102–111.
- Wöbke, T.K., Sorg, B.L. & Steinhilber, D., 2014. Vitamin D in inflammatory diseases. *Frontiers in Physiology*, 5, p.244.
- Wojcik, A., 2000. Untersuchungen zu Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen nach ionisierender Bestrahlung [zitiert am 19.01.2018]. URL: <https://langendorff-stiftung.de/pdf/wojcik.pdf>.
- Xie, K., 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4), pp.375–391.

- Yamada, S. & Makishima, M., 2014. Structure–activity relationship of nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(7), pp.324–337.
- Yu, C.C.-W. & Filipe, M.I., 1993. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *The Histochemical Journal*, 25(12), pp.843–853.
- Zammit, P.S. et al., 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of cell biology*, 166(3), pp.347–57.
- Zehnder, D. et al., 2001. Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(2), pp.888–894.
- Zhang, J. & Dhoot, G.K., 1998. Localized and limited changes in the expression of myosin heavy chains in injured skeletal muscle fibers being repaired. *Muscle & Nerve*, 21(4), pp.469–481.
- Zhang, Y. et al., 2002. Animal models of ankylosing spondylitis. *Current Rheumatology Reports*, 4(6), pp.507–512.

9. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. Ioannis Stratos für die intensive Betreuung bedanken, selbst über die Grenzen Rostocks hinweg. Ohne seine Hilfe, wissenschaftliche Erfahrung und konstruktive Kritik wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nur schwer vorstellbar.

Mein Dank geht natürlich auch an Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier für das Überlassen des Themas dieser Promotionsschrift und die mentale Unterstützung während meines Vortrages auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2017.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, für die freundliche Unterstützung bei jeglichen wissenschaftlichen Fragen und die Möglichkeit diese Arbeit in Ihrem Institut für Experimentelle Chirurgie durchführen zu können. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern dieses Instituts für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Insbesondere bei Dorothea Frenz, die nicht nur meine histologischen Präparate erstellt hat, sondern die mir auch mit Ratschlägen wissenschaftlicher und privater Natur zur Seite stand. Zudem danke ich den Tierpflegern für die verantwortungsvolle Betreuung und Pflege der Versuchstiere.

Ein ebenso großes Dankeschön gilt meinen Eltern, meinen Großeltern, sowie meinem Bruder Boris und seiner Frau Julia. Dank eurer bedingungslosen Unterstützung und euren unerschütterlichen Glauben an mich, gelang es mir meine Ziele zu erreichen.

Die Zeit des Studiums war unter anderem geprägt durch lange Aufenthalte in der Bibliothek, doch dank guter Freundschaften ging man immer zusammen durch Klausurphasen oder Krisen während des Schreibens der Dissertation. Vielen Dank an meine Mädels und die Stemmers, dass wir uns immer gegenseitig eine Stütze waren, alle großen und kleinen Erfolge des Studiums gebührend gefeiert haben und auch weiterhin solche Ereignisse miteinander teilen werden.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Ehemann Lennart bedanken, der mir schon seit Beginn des Studiums zur Seite steht. Wir sind ein Team und Partner auf Augenhöhe und unterstützen uns gegenseitig auf unserem Weg. Du sorgst für unsere kleine Familie und gibst mir sogar die Möglichkeit ein zweites Studium zu absolvieren, auch wenn das sicher nicht der einfachste Weg ist. Ich danke dir von ganzem Herzen.

Svenja Schleese

10. Curriculum Vitae

zur Person

Name, Vorname: Schleese, Svenja
Geburtsdatum, Ort: 29. Dezember 1991, Offenburg
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Studium

10/ 2009	Beginn des Studiums für Lehramt Gymnasium, Fächer: Geschichte und Mathematik
04/ 2010	Wechsel zum Studium der Mathematik Bachelor
10/ 2010	Beginn des Medizinstudiums in Rostock
08/ 2012	1. Staatsexamen der Humanmedizin in Rostock
10/ 2015	2. Staatsexamen der Humanmedizin in Rostock
10/ 2017	Beginn des Studiums der Zahnmedizin in Rostock
11/ 2017	3. Staatsexamen der Humanmedizin in Rostock
10/ 2021	voraussichtlich Abschluss des Studiums der Zahnmedizin

Berufliche Laufbahn

seit	Haema AG
03/ 2018	Blutspendezentrum Rostock

Wissenschaftliches Arbeiten

01/ 2013	Beginn der Dissertation
10/ 2017	Vortrag auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie in Berlin

Rostock, 25.12.2018

Svenja Schleese