

Aus der Klinik für Kardiochirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Ardawan J. Rastan
des Fachbereichs Medizin der Phillips Universität Marburg
In Zusammenarbeit mit der Kardiochirurgie Fachbereich Medizin
Rhön-Klinikum Campus Bad Neustadt an der Saale
Chefarzt: Prof. Dr. med. Anno Diegeler

Titel der Dissertation:

**Muskelregeneration nach induzierten Traumata unter
Blockade von TNF-Rezeptoren durch den TNF-Inhibitor
Infliximab an einem etablierten Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin bzw. Zahnmedizin, Naturwissenschaften
oder Medizinwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian-Alexander Anselm aus Würzburg

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
27.01.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. med. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. med. Jörg Babin-Ebell

Korreferent/in: Prof. Dr. med. Thomas Worzfeld

Widmung

Für meine Familie

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	4
II Abkürzungen	5
III Diagramm- und Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Skelettmuskulatur: Aufbau, Funktion und Trauma	7
1.2 Muskeltrauma: Pathophysiologie des Muskels	8
1.2.1 Destruktionsphase	8
1.2.2 Wiederherstellungsphase	9
1.2.3 Umbauphase	11
1.3 Therapie im klinischen Alltag	12
1.4 Geschichte, Aufbau und Eigenschaften von TNF	13
1.4.1 Die Signalwege von TNF und die Aktivierung von NF- κ B	15
1.4.2 Infliximab und seine klinische Anwendung	16
2 Studienziele	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Versuchsaufbau	19
3.2 Versuchsablauf	20
3.3 Messung der Muskelkraft	21
3.4 Berechnung der Muskelkraft	23
3.5 Immunhistochemie	23
3.5.1 BrdU-Immunhistochemie	23
3.5.2 CAE-Histologie	24
3.5.3 TUNEL-Histologie	25
3.5.4 Histologische Auswertung	26
3.5.5 BrdU/Laminin- und BrdU/Desmin-Doppelimmunhistochemie	26
3.5.6 NF- κ B p65-Immunhistochemie	27
3.5.7 Apoptotischer Zelltod CAE	27
3.5.8 Western Blot-Analyse	28
3.6 Statistische Analyse	29
4 Ergebnisse	30
5 Diskussion	37
5.1 Dosis und Pharmakokinetik von Infliximab	38
5.2 TNF und Infliximab	39
6 Zusammenfassung	42
6.1 Summary	43
7 Literaturverzeichnis	44
IV Lebenslauf	57
V Liste der Lehrenden	59
VI Danksagung	61
VII Ehrenwörtliche Erklärung	62

II Abkürzungen

°C	Grad Celsius
BrdU	Bromodeoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CTRL	Kontrollgruppe
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
IL-6	Interleukin-6
IFX	Infliximab-Gruppe
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LPS	Lupus erythematodes
LT	Lymphotoxin
M. soleus	Musculus soleus
M. gastrocnemius	Musculus gastrocnemius
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Newton
n	Anzahl
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nekrosefaktor κB
o.g.	oben genannte
-OH	Hydroxylgruppe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PsA	Psoriasis-Arthritis
s	Sekunde
SODD	Silencer of Death Domain
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1 oder 2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 oder 2
TRADD	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 associated Death Domain Protein
U/L	Einheiten pro Liter
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

III Diagramm- und Tabellenverzeichnis

- Schema 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (Seite 22)
- Abb. 1a: Kurzkontraktion [N] links (Seite 31)
- Abb. 1b: Tetanie [N] (Seite 31)
- Abb. 2a: CAE-positive Zellen [n/mm²] (Seite 32)
- Abb. 2b: TUNEL-positive Zellen [n/mm²] (Seite 32)
- Abb. 3a: Muskelgewebe [%] (Seite 33)
- Abb. 3b: Muskelfaserdurchmesser [%] (Seite 34)
- Abb. 4a: BrdU-positive Zellen [n/mm²] (Seite 35)
- Abb. 4b: NF-κB-positive Zellen [n/mm²] (Seite 37)
- Tabelle 1: Verhältnis von unverletztem Muskel und verletztem Muskel des M. soleus zum Körpergewicht (Seite 34)
- Tabelle 2: Quantitative Western Blot-Analyse von IL-6 und TNF im Verhältnis zu GAPDH im Muskelgewebe (Seite 36)
- Tabelle 3: Verhältnis von TRAF-2, p105 und p65 zu GAPDH (Seite 36)

1 Einleitung

1.1 Skelettmuskulatur: Aufbau, Funktion und Trauma

Insgesamt besteht der Körper eines gesunden Menschen aus 600 einzelnen Muskeln. 40% der Körpermasse eines Mannes und 23% der Körpermasse einer Frau sind Muskeln. Kontraktion und Kraftproduktion sind Leistungen des Muskels, die bewirken, dass wir gehen, stehen, atmen und unseren Alltag meistern können. Vielkernige Muskelzellen bilden den Skelettmuskel. Embryonal verschmelzen Hunderte einkerniger Myoblasten zu einem Synzytium. Das Endomysium, eine Bindegewebsschicht aus Basallamina und retikulären Fasern, umschließt die Muskelfasern. Kapillaren, Lymphgefäße und Nerven durchziehen die Bindegewebsscheiden zwischen den Muskeln. Der gesamte Muskel wird von einer derben Bindegewebshülle, dem Epimysium umhüllt. Vom Epimysium ausgehend, unterteilt das Perimysium, dünne Bindegewebssepten, den Muskel in Bündel. Die kleinste Funktionseinheit und der Auslöser der Muskelkontraktion ist das Sarkomer, bestehend aus den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin.

Die Muskelverletzung ist der Verlust der Funktion nach direktem oder indirektem Trauma. Muskelverletzungen gehören zu den häufigsten Verletzungen des menschlichen Körpers. Manchmal können diese so schwer sein, dass eine Operation nicht zu vermeiden ist. Außerdem können dadurch chronische Schmerzen oder Behinderungen unterschiedlichen Ausmaßes entstehen. Die Entstehungsmechanismen teilt man in Kontusion, Laceration und Zerrung ein. Die Schwere und das Ausmaß der Weichteilschädigung ist entscheidend für die Therapie des Patienten und vor allem für die Prognose [(67)Oestern und Tscherne 1983]. Per definitionem liegt dem Muskeltrauma eine externe Kräfteinwirkung zugrunde. Der Muskelschaden wird dabei in offen und geschlossen unterteilt, abhängig von der Kontinuität der Haut. Eine weitere Genese ist die Muskelschädigung von innen, wie zum Beispiel beim Hämatom. Solche Verletzungsmuster treten häufig bei geschlossenen Frakturen oder bei erhöhter Blutungsneigung auf. Das klinische Bild kann von Prellmarken bis hin zu Hautnekrosen reichen. Offene Muskelverletzungen gehen mit einer Durchtrennung des Muskels und Schädigung des umliegenden Gewebes einher.

1.2 Muskeltrauma: Pathophysiologie des Muskels

Der Unterschied zwischen den einzelnen Heilungsphasen eines Muskels und z.B. eines Knochens ist, dass der Knochen wieder seine volle Funktion erreicht und keine Narbe zurückbleibt. Dies ist am verletzten Muskel anders. Die Muskelheilung ist dabei in drei Phasen unterteilt [(42)Jarvinen et al.2005]:

I. Destruktionsphase: Ruptur und Nekrose der Muskelfasern, Hämatombildung und Infiltration des Gewebes durch inflammatorische Zellen.

II. Wiederherstellungsphase: Phagozytose von nekrotischem Gewebe, Muskelfaserregeneration mit zeitgleicher Bindegewebsformation und Einwachsen von Kapillaren in das traumatisierte Gewebe.

III. Umbauphase: Wiederherstellung und Regeneration der Muskelfasern, Erhöhung der Reißfestigkeit des traumatisierten Muskels, Reorganisation des Narbengewebes und funktionelle Wiederherstellung des Muskels.

1.2.1 Destruktionsphase

Intramuskuläre Strukturen wie Gefäße und Nerven werden bei einem Trauma geschädigt. Bei partieller oder vollständiger Durchtrennung des Muskels durch Krafteinwirkung kommt es makroskopisch bei intakter Muskelfaszie zur intramuskulären Hämatombildung und damit zum Anstieg des intramuskulären Drucks. Ein extramuskuläres Hämatom tritt auf, wenn die Muskelfaszie durch das Trauma beschädigt wurde und das extravasiierte Blut direkten Zugang zum interstitiellen oder intrafasziellen Gewebe hat, ohne den intramuskulären Druck zu erhöhen [(42)Jarvinen et al. 2005]. Mikroskopisch zeigt sich bei einer Ruptur der Muskelfaser ein offener Zytoplasma-Muskelzell-Stumpf. Um eine Ausbreitung der Nekrose und damit das Absterben der geschädigten Muskelfasern zu verhindern, bildet sich am offenen Muskelfaserende eine membranähnliche Struktur, welche als „Kontraktionsbande“ bezeichnet wird. Bestehend aus kondensiertem zytoskelettalem Material schließt sie förmlich das offene Ende der Membran wenige Stunden posttraumatisch ab, verhindert dabei eine Nekrose und formt gleichzeitig eine schützende Barriere, unter welcher die zerstörte Zytoplasmamembran wiederhergestellt werden kann [(40)Hurme et al. 1991].

Während der akuten Phase des Muskeltraumas wandern hauptsächlich polymorphnukleäre Leukozyten in das geschädigte Gewebe ein. Die Monozyten werden in Makrophagen transformiert und induzieren durch Freisetzung von lysosomalen Enzymen die Phagozytose nekrotischen Gewebes. Inflammatorische Zellen dringen ins Gewebe ein und bauen das gebildete Hämatom ab [(43)Jarvinen und Lamb 2005]. Neben der Traumatisierung der Muskelfasern kommt es zur Schädigung von Blutgefäßen und zur Infiltration inflammatorischer Zellen des Blutes. Die inflammatorische Reaktion wird von Satellitenzellen sowie von nekrotischem Gewebe induziert. Myozyten, welche das Trauma überlebt haben, erlauben es den Satellitenzellen, neue Muskelzellen auszubilden. Gleichzeitig phagozytieren die Makrophagen die nekrotischen Fragmente und gewährleisten damit das Überleben der Satellitenzellen [(13)Chazaud et al. 2003]. Die Proteine Fibrin und Fibronektin, welche aus dem Blut stammen, bilden ein relativ unreifes Granulationsgewebe, die sogenannte extrazelluläre Matrix. Diese dient den einwandernden Fibroblasten als Gerüst [(11)Bunn et al. 2004]. Fibroblasten initiieren die Synthese von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix, um die Stabilität des Bindegewebes zu stärken [(40)Hurme et al. 1991]. Einige dieser eindringenden Fibroblasten können sogar von Zellen stammen, die aktiv zur Muskelregeneration beitragen [(39)Huard et al. 2003]. Das neugeformte Gewebe verleiht dem geschädigten Muskel die nötige Stabilität, um die Zugkräfte, welche durch die Kontraktionskräfte auftreten, zu tolerieren [(59)Lehto et al. 1985]. Während der ersten Tage werden extrazelluläre Matrixproteine gebildet, welche elastische Eigenschaften besitzen und etwa zehn Tage nach dem Trauma dem Bindegewebe eine relativ große Reißfestigkeit verleihen [(42)Jarvinen et al. 2005].

1.2.2 Wiederherstellungsphase

Nach der Destruktionsphase beginnt die Wiederherstellungsphase mit der Regeneration der Muskelfasern und der Formation von Bindegewebe. Muskelfasern gelten als irreversibel postmitotische Zellen. Sie sind jedoch durch spezielle Mechanismen in der Lage, den Kontraktionsapparat wiederherzustellen. Wichtig hierbei sind undifferenzierte Reservezellen, welche sich im

Spalt zwischen Basal- und Plasmamembran der Muskelfaser befinden und als Satellitenzellen bezeichnet werden [(63)Mauro 1961]. Satellitenzellen nehmen normalerweise nicht an mitotischen Prozessen teil und befinden sich in einem inaktiven Zustand. Als Antwort auf verschiedene Reize, wie z.B. Verletzungen, werden Satellitenzellen reaktiviert und kehren in den Zellzyklus zurück [(33)Grounds et al. 1998]. Die Satellitenzellen proliferieren, differenzieren sich anschließend zu Myoblasten und verbinden sich untereinander, um ein Synzytium zu bilden. Die Synzytien fusionieren am Ende mit den noch verbliebenen Muskelfasern [(12)Charge und Rudnicki 2004]. Heute ist bekannt, dass weitere Populationen multipotenter Stammzellen den traumatisierten Muskel wiederherstellen können. Zu diesen Zellen gehören einerseits die sich im Muskel befindenden Stammzellen und die in der peripheren Blutbahn zirkulierenden Stammzellen. Isolierte Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, aus neuronalem Gewebe und mesenchyalem Gewebe tragen zur Regeneration des Muskels bei. Außerdem gibt es im Bindegewebe des Muskels weitere Populationen von Muskelvorläuferzellen mit der Möglichkeit der Differenzierung zu Myoblasten [(12)Charge und Rudnicki 2004]. Die aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen können sich zusätzlich in Satellitenzellen differenzieren, jedoch ist ihr Regenerationspotential im Vergleich zu den muskulären Satellitenzellen deutlich geringer. Deshalb ist es bis heute fraglich, ob diese Stamm- und Vorläuferzellen wesentlich zur Muskelregeneration beitragen können [(35)Grounds et al. 2002]. Zeitgleich mit den Satellitenzellen proliferieren die Fibroblasten und bilden zahlreiche Kollagenfasern aus. Wichtig dabei ist ein Gleichgewicht der Proliferation von Satellitenzellen und Fibroblasten. Dies ist die Grundvoraussetzung für die Muskelregeneration und die optimale Wiederherstellung der Kontraktionsfunktion des Muskels. Bei besonders großer Schädigung kann die Proliferation der Fibroblasten der Satellitenzellproliferation überlegen sein und zu einer dichten Bindegewebsbildung kommen. Die Narbe stellt dann eine mechanische Barriere dar, welche die Regeneration der Myozyten an der Übergangszone zwischen gesundem und traumatisiertem Gewebe verhindert [(43)Jarvinen und Lamb 2005] [(42)Jarvinen et al. 2005]. Als eines der ersten Regenerationszeichen nach dem Trauma kommt es zur Vaskularisation des verletzten Areals. Diese wird als eine wesentliche Voraussetzung für die Wiederherstellung der Funktion des Muskels

beschrieben [(42)Jarvinen et al. 2005]. Aus der ungeschädigten Peripherie wachsen neue Kapillaren in das geschädigte Gewebe ein [(43)Jarvinen und Lamb 2005]. Ziel dieses Vorgangs ist es, eine adäquate Oxygenierung zu erreichen, um den Zellmetabolismus der regenerierenden Muskelfasern zu ermöglichen [(43)Jarvinen und Lamb 2005]. Ähnlich wie bei der Vaskularisation kann die Regeneration durch unzureichende intramuskuläre Innervation gehemmt werden [(40)Hurme et al. 1991]. Die Reinnervation erfolgt hierbei durch das Wachsen eines neuen Axons distal des Schadens.

1.2.3 Umbauphase

Nach kompletter Muskelruptur klaffen während der Kontraktionsphase beide Muskelstümpfe an der Rupturstelle weiter auseinander. Die freien Enden der Muskelfasern versuchen, in das Narbengewebe einzudringen und nehmen dabei eine charakteristische Konusformation ein [(42)Jarvinen et al. 2005]. Dabei hängen sich die Muskelfasern an die seitlich gelegene extrazelluläre Matrix, um dadurch die Stabilität des Gewebes zu unterstützen und eine weitere Ruptur zu vermeiden [(46)Kaariainen et al. 2000]. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass diese seitliche Adhäsion in Abwesenheit mechanischer Zugkräfte nicht auftritt [(47)Kaariainen et al. 2001]. Im Verlauf bildet sich zwischen dem proximalen und dem distalen Muskelstumpf Bindegewebe aus, welches ähnliche Eigenschaften und gleiche Adhäsionsmoleküle wie ein Muskelsehnenansatz besitzt [(42)Jarvinen et al. 2005]. Dadurch werden zwei individuelle Sehnen-Muskel-Sehnen-Einheiten gebildet, welche vom selben Nerv innerviert werden und gleichzeitig kontrahieren können. [(42)Jarvinen et al. 2005]. Das dazwischenliegende Narbengewebe wird später reduziert und die stumpfen Muskelfaserteile sehr eng zueinander gebracht. Allerdings können sich diese Stümpfe der Muskelfasern nicht wieder vereinigen [(101)Vaittinen et al. 2002].

1.3 Therapie im klinischen Alltag

Die klassische und am weitesten verbreitete Therapie, welche auch von Laien angewandt werden kann, ist die sogenannte „RICE“-Therapie. Dabei sollte das traumatisierte Gewebe mit Immobilisation (rest), Kälte (ice), Kompression (compression) und Hochlagerung der traumatisierten Extremität (elevation) behandelt werden [(42)Jarvinen et al. 2005]. Experimentelle Studien haben gezeigt und bestätigt, dass dieses Therapiekonzept einen hohen Stellenwert in der Behandlung einnimmt [(9)Bleakley et al. 2006]. Die Kryotherapie scheint mit geringerer Inflammation und Hämatombildung einherzugehen. Zusätzlich wird die Regeneration durch Kühlung beschleunigt [(22)Deal et al. 2002]. Insbesondere scheint die Kombination aus Kompression und Kryotherapie einen positiven Effekt auf den Muskel zu haben [(42)Jarvinen et al. 2005]. Im Gegensatz dazu bewirkt die alleinige Kompressionstherapie eine Reduktion des intramuskulären Blutflusses im geschädigten Areal und hat somit einen fragwürdigen Einfluss auf die Muskelregeneration nach Trauma [(95)Thorsson et al. 1997]. Der positive Einfluss der Hochlagerung der Extremität über Herzene wird durch die Reduktion des hydrostatischen Druckes und die dadurch bedingte Verringerung des interstitiellen Ödems und der extravasalen Flüssigkeit erklärt. Ein weiteres sehr verbreitetes Therapiekonzept ist die Gabe nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR). Trotz des Fehlens direkter Beweise für den Menschen, wurde die Wirkung von NSAR am Tier experimentell recht gut dokumentiert [(44)Jarvinen et al. 1992] [(76)Rahusen et al. 2004] [(95)Thorrson et al. 1997] [(68)Obremsky et al. 1994]. Eine kurzfristige NSAR-Anwendung in der frühen Phase der Heilung führte nachweislich zu einer Verringerung der entzündlichen Zellreaktion [(44)Jarvinen et al. 1992] [(76)Rahusen et al. 2004] ohne nachteilige Auswirkungen auf den Heilungsprozess, auf die Zugfestigkeit oder die Fähigkeit des verletzten Muskels, sich zusammenzuziehen [(44)Jarvinen et al. 1992]. Außerdem verzögern NSAR die Regeneration der Muskelfasern nicht [(44)Jarvinen et al. 1992] [(95)Thorrson et al. 1997]. Vollkommen gegenteilig verhält es sich mit der Gabe von Glucocorticoiden. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass es unter Glucocorticoiden zu einer verzögerten Beseitigung des Hämatoms und einer großen Nekrose des Skelettmuskelgewebes kommt [(44)Jarvinen et al. 1992] [(5)Beiner et al. 1999]. Zusätzlich kommt es zu

einer Verlangsamung des Muskelregenerationsprozesses, woraus letztendlich eine reduzierte biomechanische Festigkeit des verletzten Muskels resultiert [(44)Jarvinen et al. 1992] [(5)Beiner et al. 1999]. Ein weiteres Therapiekonzept, welches sich großer Beliebtheit erfreut, ist der therapeutische Ultraschall. Jedoch hat dieser trotz der Förderung der Proliferationsphase der Myoregeneration [(60)Levinen et al. 2000] keinen positiven Effekt auf das Endergebnis der Muskelheilung [(77)Rantanen et al. 1999] [(105)Wilkin et al. 2004]. Sollte innerhalb der ersten Tage nach Trauma keine Besserung auftreten, ist die Wahrscheinlichkeit einer ausgedehnten Muskelschädigung groß. Eine detaillierte klinische Untersuchung in Kombination mit einer Ultraschalluntersuchung sind essentiell für die weitere Therapieauswahl und um die Möglichkeit eines Kompartmentsyndroms auszuschließen. Als letzte Therapiemöglichkeit bleibt noch die chirurgische Entlastung des Hämatoms [(42)Jarvinen et al. 2005]. Es muss betont werden, wie wichtig es ist, jene seltenen Muskelverletzungen zu erkennen, die sehr früh (d.h. innerhalb von drei Wochen nach der Verletzung) operiert werden müssen, da eine operative Behandlung innerhalb dieses Zeitraums signifikant bessere Ergebnisse liefert als danach [(2)Äärimaa et al, 2004].

1.4 Geschichte, Aufbau und Eigenschaften von TNF

Geschichtlich gesehen wurde zuerst der von Lymphozyten produzierte zytotoxische Faktor, das Lymphotoxin (LT), heute aufgrund der sequentiellen und funktionellen Homologie TNF- β genannt [(70)Pennica et al. 1984], entdeckt [(53)Kolb und Granger 1968]. 1975 wurde dann ein weiterer, von Makrophagen produzierter zytotoxischer Faktor, der Tumornekrosefaktor, entdeckt [(16)Carswell et al. 1975]. Die cDNAs, die für LT und TNF kodieren, wurden 1984 kloniert. Dabei wurde festgestellt, dass sie ähnlich sind [(70)Pennica et al. 1984]. Die Bindung von TNF an seinen Rezeptor und seine Verdrängung durch LT bestätigte die funktionelle Homologie zwischen den beiden Faktoren. Diese führte zur Umbenennung von TNF in TNF- α und LT in TNF- β [(70)Pennica et al. 1984]. 1985 entdeckte man, dass Cachectin (ein Hormon, das Kachexie induziert) TNF- α entspricht [(6)Beutler et al. 1985]. TNF wurde als Mediator

einer tödlichen Endotoxinvergiftung identifiziert [(7)Beutler et al. 1985]. Des Weiteren wurde TNF eine Schlüsselrolle bei letalem septischem Schock zugeschrieben und man identifizierte die therapeutischen Effekte von monoklonalen Anti-TNF-Antikörpern [(98)Tracey et al. 1986] [(99)Tracey et al. 1987]. TNF ist ein 233 Aminosäuren langes Typ II-Transmembranprotein in stabilen Homotrimeren [(56)Kriegler et al. 1988] [(91)Tang et al. 1996]. Aus dieser membranintegrierten Form wird das lösliche homotrimere Zytokin (sTNF) durch proteolytische Spaltung durch das Metalloprotease-TNF- α -konvertierende Enzym (TACE, auch ADAM17 genannt) freigesetzt [(8)Black et al. 1997]. Sowohl die sezernierte als auch die membrangebundene Form sind biologisch aktiv, obwohl ihre spezifischen Funktionen umstritten sind. Beide Formen haben teils überlappende und teils unterschiedliche biologische Aktivitäten [(69)Palladino et al. 2003]. Der Tumornekrosefaktor α (TNF, TNF- α , Cachexin oder Cachectin) gehört zur Gruppe der Zellsignalproteine, auch Zytokine genannt, welche an systemischen Entzündungen und Akute-Phase-Reaktionen beteiligt sind. Der TNF- α ist ein entscheidender Wirkstoff, der die Immunantwort sowie die durch Entzündungszellen induzierte Gewebeschädigung modifiziert [(94)Thoma et al. 2018]. Er wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert, obwohl er ebenfalls von vielen anderen Zelltypen (wie CD4+-Lymphozyten, NK-Zellen [(92)Terunuma et al. 2008], Neutrophilen, Mastzellen, Eosinophilen und Neuronen [(25)Gahring et al. 1996] produziert werden kann. In der Haut scheinen Mastzellen die vorherrschende Quelle für präformierten TNF zu sein, der bei entzündlichen Stimuli (z.B. bei LPS) freigesetzt werden kann [(104)Walsh et al. 1991]. Die Forschung der letzten zwei Jahrzehnte hat die Existenz einer Superfamilie von TNF-Proteinen gezeigt, welche aus 19 Mitgliedern besteht, die an 29 verschiedene Rezeptoren binden können. Diese Liganden regulieren zusätzlich normale Funktionen wie Immunantworten, Hämatopoese und Morphogenese, werden aber auch mit der Tumorgenese, Transplantatabstoßung, septischem Schock, viraler Replikation, Knochenresorption, Rheumatoider Arthritis und Diabetes in Verbindung gebracht [(4)Aggarwal et al. 2003]. Die primäre Rolle des TNF liegt in der Regulation von Immunzellen. TNF, das ein endogenes Pyrogen ist, ist in der Lage, Fieber, apoptotischen Zelltod, Kachexie und Entzündungen zu induzieren, sowie Tumorgenese und virale Replikation zu inhibieren [(18)Chen et al. 2002]. Die

Dysregulation der TNF-Produktion wurde mit einer Reihe von humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Alzheimer [(90)Swardfager et al. 2010], Krebs [(62)Locksley et al. 2001], Major Depression [(23)Dowlati et al. 2010], Psoriasis [(102)Victor et al. 2002] und entzündliche Darmerkrankungen [(15)Brynskov et al. 2002] [(65)Mikocka-Walus et al. 2007]. Außerdem wird von Abubakar et al. auch Bronchialasthma in die Reihe der Erkrankungen mit aufgenommen [(3)Abubakar et al. 2022].

1.4.1 Die Signalwege von TNF und die Aktivierung von NF- κ B

TNF kann zwei Rezeptoren binden, TNFR1 und TNFR2 [(93)Theiss et al. 2005]. TNFR1 wird in den meisten Geweben exprimiert und kann sowohl durch die membrangebundene als auch durch die lösliche trimere Form des TNF vollständig aktiviert werden, während TNFR2 typischerweise in Zellen des Immunsystems vorkommt und auf die membrangebundene Form des TNF-Homotrimerers reagiert [(103)Wajant et al. 2003]. Da die meisten Informationen bezüglich des TNF-Signals von TNFR1 stammen, wird die Rolle von TNFR2 möglicherweise unterschätzt. Wie alle Todesdomänen-haltigen Mitglieder der Superfamilie ist TNFR1 am Todessignal beteiligt [(27)Gaur und Aggarwal 2003]. Der TNF-induzierte Zelltod spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu seiner herausragenden Rolle im Entzündungsprozess [(45)Jian-Hong et al 2018]. Nach Bindung des TNF an seinen Rezeptor kommt es zur Dissoziation des inhibitorischen Proteins SODD und zur Bindung des Adapterproteins TRADD an die Todesdomäne. Nach der TRADD-Bindung können drei Wege in Gang gesetzt werden [(103)Wajant et al. 2003] [(18)Chen et al. 2002]. Solche komplizierten Signalwege stellen sicher, dass immer dann, wenn TNF freigesetzt wird, verschiedene Zellen mit sehr unterschiedlichen Funktionen angemessen auf Entzündungen reagieren können.

NF- κ B (Kernfaktor-kappa-Leichtketten-Enhancer von aktivierten B-Zellen) ist ein Proteinkomplex, der die Transkription von DNA, die Zytokinproduktion und das Zellüberleben steuert [(108)Zizzo et al. 2021]. NF- κ B kommt in fast allen tierischen Zelltypen vor und ist an zellulären Reaktionen auf Reize wie Stress, Zytokine, freie Radikale, Schwermetalle, ultraviolette Strahlung, oxidiertes LDL

und bakterielle oder virale Antigene beteiligt [(28)Gilmore et al. 2006] [(14)Brasier et al. 2006] [(71)Perkins et al. 2007]. NF- κ B spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Immunantwort auf Infektionen. Eine falsche Regulation von NF- κ B wurde mit Krebs, entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen, septischem Schock, Virusinfektionen und falscher Immunentwicklung in Verbindung gebracht [(29)Gilmore et al. 1999] [(96)Tian et al. 2003].

1.4.2 Infliximab und seine klinische Anwendung

In unserer Studie verwendeten wir den Wirkstoff Infliximab (Handelsname Remicade®). Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der gegen TNF- α gerichtet ist. Er wird daher auch als TNF-Blocker bezeichnet. Infliximab wird durch intravenöse Infusion verabreicht, typischerweise in Abständen von sechs bis acht Wochen. Es kann nicht oral gegeben werden, da das Verdauungssystem den Wirkstoff zerstören würde [(85)Steinhilber et al. 2005].

Infliximab wird bevorzugt gegen Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Die Therapie mit Infliximab ist bei folgenden Erkrankungen in der Europäischen Union zugelassen: Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn (Infliximab ist auch für die Behandlung des Morbus Crohn bei Kindern zugelassen), Fistelbildungen bei Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew), Psoriasis und Psoriasis-Arthritis [(78)Zusammenfassung EMEA].

Drei Krankheitskategorien treten bei Morbus Crohn auf: strikturierende Krankheit (die eine Verengung des Darms verursacht), penetrierende Krankheit (die Fisteln oder abnormale Verbindungen des Darms verursacht) und entzündliche Erkrankung (die hauptsächlich eine Entzündung verursacht) [(24)Dubinsky et al. 2003]. Infliximab wurde 1999 zum ersten Mal für den Verschluss von Fisteln bei Morbus Crohn eingesetzt. In einer klinischen Phase II-Studie mit 94 Patienten zeigten die Forscher, dass Infliximab bei 56-68% der Patienten wirksam Fisteln zwischen Haut und Darm verschloss [(73)Present et al. 1999]. Eine große klinische Phase III-Studie erbrachte, dass Infliximab bei der Aufrechterhaltung des Fistelverschlusses von Vorteil war. Bei 36% der Patienten konnte man nach einem Jahr den Verschluss von Fisteln weiter aufrechterhalten, verglichen mit 19% in der Placebo-Gruppe [(81)Sands et al. 2004]. Diese Studie führte zur FDA-Zulassung des Medikaments zur Behandlung von fistulierenden Erkran-

kungen. Infliximab wurde verwendet, um eine Remission bei entzündlichem Morbus Crohn zu induzieren und beizubehalten. Die ACCENT 1-Studie, eine große, multizentrische Studie, zeigte, dass 39-45% der mit Infliximab behandelten Patienten sich nach dreißig Wochen in Remission befanden im Vergleich zur Placebo-Gruppe mit 21%. Es fand sich darüber hinaus eine mittlere Remissionserwartung von 38-54 Wochen im Vergleich zu 21 Wochen für Patienten mit Placebo [(37)Hanauer et al. 2002]. Zwischen den Perioden der Krankheitsruhe haben Morbus Crohn-Patienten zum Teil schwere Krankheitssymptome. Diese werden normalerweise mit Steroiden behandelt, um eine Remission zu erreichen. Aber Steroide haben viele unerwünschte Nebenwirkungen, weshalb einige Gastroenterologen aktuell die Gabe von Infliximab als erste Wahl befürworten. Diese Strategie wird als Top-Down-Ansatz bezeichnet [(36)Hanauer et al. 2003]. Bei Colitis ulcerosa fanden Studien ähnliche Ergebnisse. So ergaben Studien zur akuten Colitis ulcerosa, dass 44-45% der mit Infliximab behandelten Patienten über einen Zeitraum von einem Jahr eine positive Reaktion auf das Medikament zeigten, verglichen mit 21% der Kontrollgruppe. Nach zwei Monaten betrug die Remissionsrate 61-69% für mit Infliximab behandelte Patienten und 31% für die mit Placebo behandelten Patienten [(80)Rutgeerts et al. 2005]. Bei Psoriasis-Arthritis verbessern TNF-Inhibitoren wie Infliximab die Anzeichen und Symptome. Studien zu Ankylosierender Spondylitis [(64)Maxwell et al. 2015] ergaben, dass TNF-Antikörper wie Infliximab, Etanercept und Adalimumab das Potenzial haben, die Anzeichen und Symptome einer mittelschweren bis schwergradigen axialen Beteiligung, welche auf NSAR nicht ausreichend angesprochen haben, zu reduzieren. Infliximab und Etanercept sind wirksamer bei der Behandlung von Enthesitis als NSAR. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Infliximab bei der Behandlung von Daktylitis bei PsA wirksam ist [(50)Kavanaugh et al. 2006]. Bei der chronischen Polychondritis ist Infliximab das am häufigsten verwendete Medikament [(74)Puechal et al. 2014]. Es gibt darüber hinaus zahlreiche Fallberichte über die Wirksamkeit von Infliximab bei verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen. 2006 wurde Infliximab für die chronische schwere Plaque-Psoriasis bei Erwachsenen zugelassen [(31)Gupta et al. 2004]. Außerdem wird es off-label auch zur Behandlung des Morbus Behcet verwendet [(82)Sfikakis et al. 2002].

2 Studienziele

Die Muskelregeneration geht nach der direkten Gewebeverletzung mit einer Vielzahl von pathophysiologischen Veränderungen, wie Entzündungen, Angiogenese, Proliferation, Apoptose sowie Bildung von Narbengewebe einher [(100)Turner und Badylak et al. 2012]. Diese werden unmittelbar nach dem Trauma vom Körper initiiert. Der Entzündungsprozess erstreckt sich über die ersten vier Tage nach der Verletzung und ist in erster Linie für den Abbau des nekrotischen Gewebes verantwortlich [(42) Jarvinen et al. 2005]. TNF- α ist ein wichtiger Immunmodulator, der eine Rolle in der Entwicklung des Immunsystems, bei der Regulation der Immunantwort und der Zellantwort auf das geschädigte Gewebe spielt [(54)Kollias et al. 1999]. Einige Berichte bringen die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF mit der Pathogenese der lokalen Gewebeentzündung nach Muskelverletzungen bei Menschen und Tieren in Verbindung [(10)Bradley et al. 2008]. TNF, durch aktivierte Monozyten und Makrophagen produziert, stimuliert die Chemokin-, Cytokin- und Wachstumsfaktor-Sekretion. Es erfolgt zusätzlich eine Up-Regulation adhäsiver Moleküle, damit diese den Zustrom von Entzündungszellen zum Ort des Traumas fördern und Reparaturprozesse induzieren [(17)Chen et al. 2005] [(49)Karalaki et al. 2009]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass TNF die Regeneration von Muskelgewebe während der akuten posttraumatischen Phase beeinträchtigt [(49)Karalaki et al. 2009]. Aus pathophysiologischer Sicht ist TNF bei der Entwicklung verschiedener entzündlicher Erkrankungen über den Bewegungsapparat hinaus beteiligt, so zum Beispiel Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Asthma bronchiale. PsA, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Rheumatoide Arthritis sind häufige Erkrankungen, die eine TNF-assoziierte Pathogenese beinhalten [(10)Bradley et al. 2008]. Um die TNF-induzierte Reaktion zu hemmen, zeigte sich beim Menschen und in vielen verschiedenen Tiermodellen die Neutralisation von TNF als eine wirksame Therapie [(69)Palladino et al. 2003]. In Anbetracht der polytropen Zusammensetzung von Infliximab nehmen wir an, dass eine TNF-Hemmung den Abbau von TNF-assoziierten Geweben nach Trauma stoppt und so die posttraumatische entzündliche Reaktion des Muskels reduziert wird. Wir nehmen weiterhin

an, dass dies zu einer schnelleren Regeneration und Wiederherstellung der Funktion des verletzten Muskels führt. Aus diesem Grund verwendeten wir den monoklonalen TNF-Inhibitor Infliximab in unserem gut etablierten Rattenmodell für leichten Weichteilschaden [(87) Stratos et al. 2012]

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden an 42 männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 275–325 g durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Der 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus wurde gesichert und die Bereitstellung von Laborfutter und Wasser für Nager ad libitum in Einzelkäfigen bereitgestellt. Das Forschungsvorhaben wurde von der Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern (Aktenzeichen LALLF MV/ TSD/7221.3-1.1-046/06) genehmigt. Die Versuche an den Tieren wurden eine Woche nach Akklimatisation an die Laborbedingungen durchgeführt.

In unserer Studie wurden zwei Versuchstiergruppen gebildet. In der Infliximab-Gruppe (IFX, n=21) wurde den Tieren sofort nach Trauma des linken M. soleus eine einzige i.p.-Injektion des TNF-Inhibitors Infliximab (10 mg/kg KG i.p.; Remicade®, Centocor Inc., Horsham, PA) verabreicht. Die Kontrollgruppe (CTRL, n=21) erhielt eine äquivalente Dosis einer 0,9% NaCl-Lösung (0,6 ml/kg KG NaCl i.p.) unmittelbar nach Trauma des linken M. soleus. Anschließend wurde die Analyse am ersten., vierten und vierzehnten Tag nach der Verletzung durchgeführt (n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe).

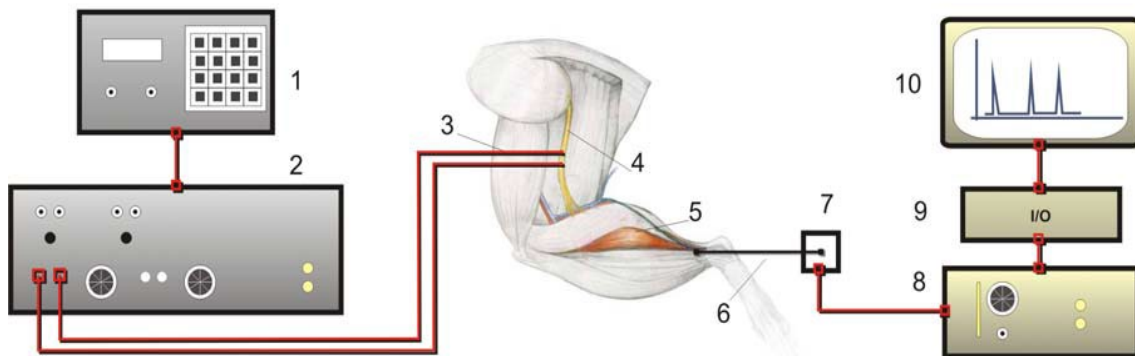
3.2 Versuchsablauf

Nach Randomisierung und Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen wurden die Tiere mittels i.p.-Injektion von Pentobarbital-Natrium 6% (55 mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Die Tiere wurden am linken Hinterlauf rasiert, mit Povidon-Iod desinfiziert (Betaisodona®, Mundipharma, Limburg, Deutschland) und anschließend in Bauchlage positioniert. Mittels Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizintechnische Geräte, Pfaffing, Deutschland) wurde die Körperkerntemperatur konstant bei 36-37°C gehalten. Die Eingriffe wurden unter nicht sterilen Bedingungen mit Hilfe mikrochirurgischer Instrumente durchgeführt. Die Haut des linken Hinterlaufes wurde postero-lateral in der Längsachse auf einer imaginären Linie zwischen Patella und Sprunggelenk auf einer Länge von ca. 2,5 cm inzidiert. Die Faszie wurde in der Länge des Zugangs eröffnet. Daran anschließend erfolgte die Präparation der Beugemuskulatur (M. gastrocnemius/M. soleus). Der laterale Bauch des M. gastrocnemius wurde mobilisiert, damit der M. soleus freigelegt werden konnte. Mittels einer instrumentierten, leicht gebogenen Klemme wurde der Muskel in voller Breite erfasst. Diese am Muskel angewandte Kontusionskraft wurde durch die instrumentierte Klemme über das Messgerät DMC plus (Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland) und eine speziell entwickelte Softwareanwendung in Echtzeit gemessen. Die Kalibrierung des Messgerätes und Entwicklung der Software erfolgten am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock. Der Muskel wurde manuell mit einer Kraft von 25 N zehnmal für je 10 s jeweils über seine ganze Länge gequetscht. Die Innervation und Vaskularisation in Form des zentral sitzenden Gefäß-Nerven-Bündels des M. soleus wurden von der Kontusion ausgeschlossen. Nach sorgfältigem Abspülen der Wunde mit steriler NaCl-Lösung wurde erst die oberflächliche Muskelfaszie mit 4-0 Vicryl-Naht (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) und dann die Haut mit 3-0 Prolene-Nahtmaterial vernäht. Anschließend wurde die Wunde mit Povidon-Iod desinfiziert. Nach der Operation erwachten die Tiere in ihrem Käfig aus der Narkose und hatten dort freien Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter.

3.3 Messung der Muskelkraft

Die biomechanische Testung erfolgte mittels der kontraktiven Funktionsmessung des M. soleus. Dazu wurde mit Hilfe einer speziellen Versuchsanordnung der M. soleus indirekt gereizt und die dabei auftretenden kontraktiven Kräfte, wie nachfolgend beschrieben, erfasst. Die Tiere wurden erneut mittels Pentobarbital-Natrium narkotisiert und an den Hinterläufen beidseits rasiert. Die Kraft des traumatisierten M. soleus (links) wurde prozentual zur Kraft der gesunden Seite (rechts) ausgedrückt. Folglich war es notwendig, die Muskelkraftmessung bei allen Versuchstieren beidseitig durchzuführen. Die chirurgische Präparation und Muskelkraftmessung erfolgte zuerst an der gesunden rechten Seite und dann an der traumatisierten linken Seite. An den Hinterläufen der Ratte wurden zwei Schnitte durchgeführt. Mittels einer stumpfen Schere wurde die Haut im mittleren Drittel des Oberschenkels ca. 1 cm eröffnet. Durch Abspreizung der Muskelbäuche am Oberschenkel wurde in der Tiefe der N. ischiadicus dargestellt. Um die Achillessehne darzustellen, wurde über einen zweiten 2,5 cm langen Schnitt am Unterschenkel die Haut und die Muskelfaszie inzidiert und der M. soleus erneut mobilisiert. Die Sehne wurde am Ansatz des M. gastrocnemius und proximal der Ferse durchtrennt. Damit wurde der distale Ansatz des M. soleus frei gelegt. Das Versuchstier wurde dann auf der Heizplatte umgelagert und in Bauchlage auf der Muskelkraft-Messvorrichtung (NM-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) platziert. Das Knie und die Ferse wurden an den entsprechenden Halterungen fixiert und der distale Teil des M. soleus mit einem 4-0 Vicryl-Faden mit dem Messwandler (FSG-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) der Muskelkraftmessvorrichtung verbunden. Die Elektrode wurde am N. ischiadicus eingerastet und bipolar durch den Impulsgeber und die Steuerungseinheit stimuliert (CRS-ST-02-O, Experimetria, Budapest, Ungarn). Um eine Kurzkontraktion des M. soleus zu erzeugen, wurden 9 mA/75 Hz über den N. ischiadicus geleitet, fünfmal für jeweils 0,1 s mit 5 s-Pausen-Intervallen zwischen den Pulsen. Danach wurde an derselben Vorrichtung die maximale Muskelkraft des M. soleus gemessen, mit 9 mA/75 Hz fünfmal für jeweils 3 s pro Stimulation mit 5 s-Pausen-Intervallen zwischen den Pulsen. In allen Fällen wurde dadurch eine Tetanie erreicht. Um die Kontraktionskraft des M. soleus zu messen, wurde das Signal der Zugkraft

des Muskels durch den Messwandler an den Empfänger übermittelt und dort auch verstärkt (CRS-SG, Experimentria, Budapest, Ungarn). Das analoge Signal wurde dann durch ein Modem (LabJack U12, LabJack Corporation, Lakewood, USA) digitalisiert und die Werte mit einer speziell entwickelten Visual Basic-Anwendung (Visual Basic 6, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) erfasst und gespeichert.



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

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues nach Genehmigung aus Stratos et al. 2007(88)

Anschließend wurde die Ratte auf der Heizplatte erneut umgelagert. An der linken unteren Extremität wurde - wie zuvor beschrieben - der N. ischiadicus dargestellt. Nachdem die Fäden des ersten Eingriffs entfernt worden waren, wurden die Haut und die Muskelfaszie inzidiert. Es erfolgten die Darstellung des M. soleus mit der Achillessehne und nachfolgend die Kraftmessung der linken hinteren Extremität. Nach Abschluss der Muskelkraftuntersuchung wurden die Tiere, nach Vertiefung der Narkose, thorakotomiert und es wurde durch direkte Punktion des linken Ventrikels mittels einer EDTA-beschichteten Spritze Blut entnommen. Der linke M. soleus wurde ebenfalls entnommen und für nachfolgende histologische Untersuchungen in 4%iger Formalinlösung fixiert.

3.4 Berechnung der Muskelkraft

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

3.5 Immunhistochemie

3.5.1 BrdU-Immunhistochemie

Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des BrdU-Einbaus in die DNA der Skelettmuskelzellen konnte die Proliferationsaktivität der Skelettmuskulatur untersucht werden. 48 h vor Gewebeentnahme wurden allen Versuchstieren eine einzelne Dosis 50 mg/kg KG BrdU i.p. appliziert. Mittels Immunhistochemie an Gewebeschnitten konnte das BrdU detektiert werden. Dafür wurde an den Primär-Antikörper ein Sekundär-Antikörper gebunden, welcher gleichzeitig mit einem Enzym gekoppelt ist, das nach Zugabe eines Substrates die Entstehung eines Chromogens erlaubt. Dadurch kann das gesuchte Antigen indirekt sichtbar gemacht und somit das BrdU lichtmikroskopisch quantitativ analysiert werden.

Der M. soleus wurde in 4%iges Formalin gelegt, für drei Tage fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 µm dünne Gewebeschnitte wurden angefertigt und der Muskel longitudinal vom proximalen zum distalen Ansatz aufgeschnitten. So konnte der Muskel in seiner vollen Länge auf dem poly-L-Lysin-beschichteten

Objektträger lichtmikroskopisch begutachtet werden. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, zur Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle behandelt (DAKO Target Retrieval Solution, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bzw. unspezifischer Peroxidase-Aktivität mit entsprechenden Blocker-Lösungen überschichtet (DAKO Protein Block X0909, 3% bzw. DAKO Peroxidase-Block). Um das eingebaute BrdU im Schnitt detektieren zu können, wurde das Gewebe mit einem monoklonalen anti-BrdU-Primär-Antikörper (M0744, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 4°C für 18 h in einer Verdünnung von 1:50 mit Antikörper-Verdünnungs-medium (S3022, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Der Zweit-Antikörper entstammt dem kommerziell erhältlichen Kit LSAB (K0609, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und wurde entsprechend der Anweisungen des Herstellers angesetzt. Die nachfolgende Inkubation mit dem DAB-Farbstoff (3.3'- Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, S3000, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) führte nach ca. 13 min zu einer Reaktion, welche die BrdU-positiven Zellkerne braun färbte. Die Präparate wurden mit Mayers Hämalaun-Kernfärbung über 5 min gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und anschließend mit Deckglas-klebstoff eingedeckt (Pertex, Medite, Burgdorf, Deutschland). Die Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter histologischer Auswertung beschrieben.

3.5.2 CAE-Histologie

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

Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter histologischer Auswertung beschrieben.

3.5.3 TUNEL-Histologie

Zum histomorphologischen Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen wurden die Präparate mittels der TUNEL-Methode (S7101 ApopTag kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) untersucht. Bei der TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) wird durch das Enzym Terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen ein biomarkiertes dUTP angehängt, dessen Biotin im Anschluss durch einen farblich markierten Antikörper sichtbar gemacht wird. Im Einzelnen wurde die spezifische Bindung von Digoxigenin-Nukleotiden an die freien 3'-OH Enden der fragmentierten DNA von apoptotischen Zellen durch das TdT katalysiert. Die gebundenen Nukleotide bildeten daraufhin ein Heteropolymer aus Digoxigenin-11-dUTP und dATP, welche nach Zusatz von Anti-Digoxigenin diese binden. Das Anti-Digoxigenin-Antikörperfragment trägt das konjugierte Peroxidaseenzym, welches ein Farbsubstrat umsetzt. Dafür wurden die vorhandenen Schnitte, wie zuvor beschrieben, aufgearbeitet, in Xylol deparaffiniert und mit PBS gewaschen. Es folgten ein Proteinase K-Verdau (20 µg/ml) für 15 min bei Raumtemperatur und das Waschen mit PBS. Nach 3% Peroxidase-Behandlung und erneuter PBS-Spülung wurden die Schnitte für 10 s mit „Equilibration-Puffer“ gepuffert und dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h mit TdT-Enzym-Puffer aus dem ApopTag-Kit inkubiert. Nachfolgend wurde der „Stop/Wash-Puffer“ aufgetragen und die Schnitte für 10 min erneut inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang in PBS wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 min mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Antikörpern behandelt. Schließlich folgten vier weitere Waschvorgänge, die Inkubation mit DAB-Farbstoff über 5 min und das erneute dreimalige Waschen mit PBS. Die Präparate wurden mit Mayers Hämalaun-Kernfärbung über 5 min gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und mit Deckglasklebelement eingedeckt. Die Auswertung erfolgte über die gesamte Länge des Muskels, wie unter Histologischer Auswertung beschrieben.

3.5.4 Histologische Auswertung

Durch die Heterogenität der Traumata wies das zu untersuchende Gewebe keine einheitliche Struktur auf. Die morphologische Unterscheidung zwischen intakten Muskelzellen und Zellfragmenten war nicht immer exakt möglich. Jedes Präparat enthielt ungeschädigtes Muskelgewebe, traumatisiertes Muskelgewebe und eine Übergangszone (Penumbra-Zone). Um dieses morphologisch-inhomogene Gewebe objektiv zu analysieren, wurde der Muskel über seine gesamte Länge untersucht und quantitativ ausgewertet. Die Auswertung der TUNEL-, BrdU- und CAE-Färbung erfolgte an einem Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Jena, Deutschland) unter 400facher Vergrößerung, wobei zunächst mit Hilfe eines Mikrometermaßstabes die Größe des Gesichtsfeldes bestimmt wurde. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte zweimal über die gesamte Länge des M. soleus vom proximalen bis zum distalen Ansatz. Dabei wurden von jedem Schnitt durchschnittlich dreißig Gesichtsfelder erfasst und die Anzahl der positiv-gefärbten Zellen bestimmt. Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert der Zellen pro Gesichtsfeld gebildet und in Zellen pro mm² umgerechnet.

3.5.5 BrdU/Laminin- und BrdU/Desmin-Doppelimmunhistochemie

Um die Anzahl der proliferierenden Satellitenzellen zu ermitteln, war es notwendig, eine doppelimmunhistochemische Analyse mit Desmin bzw. Laminin und BrdU durchzuführen. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, ein polyklonaler Ziegen-anti-Desmin-Antikörper (1:100; 1 h Inkubation bei 37°C; Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA) oder ein polyklonaler Kaninchen-anti-Laminin-Antikörper (1:50; 1 h Inkubation bei 37°C; Dako Cytomation) und der o.g. monoklonale Maus-anti-BrdU-Antikörper mit 3.3-Diaminobenzidin und Fuchsin als Chromogene verwendet. Die proliferierenden BrdU-positiven Satellitenzellen innerhalb der gesunden Zone und unterhalb der Laminin-positiven Membran konnten durch die Markierung der Laminin-positiven Basallamina identifiziert werden [(83)Smith et al. 2001]. Desmin ist ein

zytoskelettales Filament. Es dient als Marker, um zwischen Fibroblasten und Myoblasten zu unterscheiden [(84)Sjoberg et al. 1994]. Die Auswertung erfolgte pro 100 BrdU-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern (1000fache Vergrößerung; Öl-Objektiv) sowohl in der nicht traumatisierten Zone (mittels BrdU/Laminin-Doppelimmunhistochemie) als auch in der geschädigten Zone (mittels BrdU/Desmin-Doppelimmunhistochemie). Die Berechnung der proliferierenden Satellitenzellen erfolgte durch Multiplikation der absoluten Zahl BrdU-positiver Zellen/mm² mit dem prozentualen Anteil der Satellitenzellen, ermittelt durch die Doppelimmunhistochemie. Die Satellitenzellanzahl wird in Zellen/mm² angegeben.

3.5.6 NF-κB p65-Immunhistochemie

Um NF-κB p65 im Muskelgewebe zu analysieren, wurden 10 µm-Paraffin-Dias hergestellt und mit einem Kaninchen-Anti-NF-κB-mAb (1 inkubiert: 100; No. SC-372 g, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) bebrütet. 3,3'-Diaminobenzidin wurde als Chromogen verwendet. Die Abschnitte wurden durch ein Lichtmikroskop (BX 51, Olympus, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung eines x40 Objektivs (numerische Apertur 0.65) analysiert. Nur NF-κB-positive Kerne innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Muskelzelle wurden gezählt, wodurch NF-κB-positive Muskelzellkerne oder NF-κB-positive Satellitenzellkerne gezählt wurden. Die Quantifizierung erfolgte in zehn Beobachtungsfeldern innerhalb der Penumbra Zone (d.h. das Muskelgewebe, welches unmittelbar an die Verletzung anschließt). Daten wurden in Zellen/mm² angegeben.

3.5.7 Apoptotischer Zelltod CAE

Der Apoptotische Zelltod wurde über einen ApopTag Satz gemäß der Herstellerangaben (ApopTag, S7100, Chemicon, Temecula, CA, USA) festgelegt. Unter Verwendung eines x40 Objektivs (numerische Apertur 0,65) wurden die Zellen mit DNA-Schäden vom proximalen zum distalen Insertionspol (ca. dreißig aufeinanderfolgende Beobachtungsfelder) gezählt und als Zellen/mm²

angegeben. Um die Wirkung der Entzündung auf die Muskelverletzung genauer untersuchen zu können, begutachteten wir die Gewebe-infiltrierenden Entzündungszellen (hauptsächlich Leukozyten, aber auch Monozyten und Makrophagen) durch Anfärben mit Chloracetat-Esterase (CAE). Anschließend wurde die Anzahl der CAE-positiven Zellen/mm² im Beobachtungsgebiet ermittelt. Unter Verwendung eines x40 Objektivs (numerische Apertur 0,65) wurden CAE-positive Zellen im Muskelgewebe vom proximalen zum distalen Pol gezählt (ca. dreißig aufeinander folgende Beobachtungsfelder). Um den Schaden und die Wiederherstellung von Muskelgewebe aufzuklären, setzten wir das gesamte Muskelgewebe eines Beobachtungsfeldes ins prozentuale Verhältnis zum Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbten Gewebe desselben Beobachtungsfeldes. Hochauflösende digitale Bilder des Muskels wurden mittels einer digitalen Kamera erfasst (Olympus Colorview II, Olympus, Hamburg, Deutschland) und mit Photoshop planimetrisch analysiert (Photoshop 7, Adobe Systems Europa; Uxbridge, Großbritannien). In gleicher Sitzung analysierten wir die Muskelfaserdurchmesser (0,01/mm²) des Penumbra-Areals (vier Beobachtungsfelder) unter Verwendung eines x20 Objektivs und einer bildgebenden Software auf lichtmikroskopischer Ebene (Cell ^ D, Olympus, Hamburg, Deutschland).

3.5.8 Western Blot-Analyse

Mittels des Western Blots analysierten wir folgende Proteine: TNF, TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 2 (TRAF-2), die Kernfaktor-kappa-Leichtketten-Enhancer aktivierenden B-Zell-Untereinheiten p65 und p105 (NF- κ B p65 und p105), Interleukin-6 (IL-6) und Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das Muskelgewebe wurde mittels Lysepuffer homogenisiert (1 M Tris, pH 7,5, 5 M NaCl, 250 mM EDTA, 10% Triton-X-100, 4% NaN₃ und 100 mM PMSF mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100 v/v; Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), für 30 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Als Eiweißkonzentration wurde Bicinchoninsäure (BCA) Proteinassay (PierceBiotechnology, Rockford, IL, USA) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard festgelegt.

Pro Spur wurden 20 µg (TNF, TRAF-2, NF-κB) oder 60 µg (IL-6) Protein-Extrakt diskontinuierlich auf 6%, 10% (TRAF-2, NF-κB p65 oder p105) und 14% (TNF, IL-6) SDS-Polyacrylamidgel verteilt und auf eine polyvinylidifluoride Membran aufgetragen (Immobilon-P-Transfermembran, Millipore Billerica, MA, USA). Nach Blockade der unspezifischen Bindungsstellen mit 2,5% BSA (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) wurden die Membranen über Nacht bei 4° C mit primären Antikörpern gefolgt von sekundären Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: **TNF** (# sc-1350, 1:1.000; Sekundär Ab: Esel Anti-Ziege-IgG-HRP, # sc-2020, 1:10.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), **TRAF-2** (# ab126758, 1:2.000, Abcam, Cambridge, UK, Sekundär Ab: Ziege-Anti-Kaninchen-IgG HRP, # sc-2004, 1:20.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), **NF-κB** (p65 # sc-372 g, 1:500 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; p105 # 14-6732, 1:500, eBioscience; Sekundär Ab: Esel anti-Ziege IgG HRP, # sc-2020, 1: 40.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Anti-Kaninchen-IgG-HRP, # 7074, 1:20.000 Zellsignalisierung, Danvers, MA, USA), **IL-6** (# sc-1265, 1:1000; Sekundär Ab: Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, #SC 2004 1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Proteinspiegel wurden mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht und mit dem ChemiDoc™ XRS-System (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) digitalisiert. Die Signale wurden mittels quantitativer Farbdichtemessung beurteilt (Quantity One, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) und auf die GAPDH-Signale normiert (# MAB374, 1:20.000, Millipore, Billerica, MA, USA, Sekundär Ab: Anti-Maus IgGPeroxidase, # A9044, 1:40.000, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland).

3.6 Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Vor der statistischen Analyse wurde der Bevölkerungsdurchschnitt jeder Gruppe getestet. Bei bestandem Normalitätstest wurde der ungepaarte T-Test zur Differenzierung der Gruppen verwendet. Nach gescheitertem

Normalitätstest wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Die Statistiken wurden unter Verwendung des Softwarepakets SigmaStat 3.0 (Jandel Gesellschaft; San Rafael, CA, USA) ausgewertet.

4 Ergebnisse

Muskelerletzungen verursachen eine massive Reduktion der Muskelkraft. Von Tag eins bis Tag vierzehn nach der Verletzung zeigte das Muskelgewebe in unserer Studie eine kontinuierliche Verbesserung der Kraft in der Kontrollgruppe. Die posttraumatische Anwendung von Infliximab führte an Tag vierzehn zur signifikanten Verbesserung der Kurzkontraktion des Muskels. Der Peak an in das verletzte Gewebe infiltrierenden Leukozyten (156 Zellen/mm^2) wurde in der Kontrollgruppe an Tag eins nach dem Trauma beobachtet (Abb. 2a).

Dagegen zeigte sich mit 122 Zellen/mm^2 eine deutlich niedrigere Zahl CAE-positiver Zellen in der Infliximab-Gruppe. Der lokale Entzündungsprozess, gemessen durch die Anzahl der CAE-positiven Zellen, verminderte sich über vierzehn Tage hinweg auf nur noch 11 Zellen/mm^2 am vierzehnten Tag in der Kontrollgruppe. Tiere aus der Infliximab-Gruppe zeigten eine signifikante Reduktion der CAE-positiven Zellen am Ende des vierzehnten Tages mit nur noch 7 Zellen/mm^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$ vs. CTRL).

Abb. 1a/b: Quantitative Analyse von Kurzkontraktion (A) und Tetanie (B) am verletzten Muskel. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *p<0,05 vs CTRL

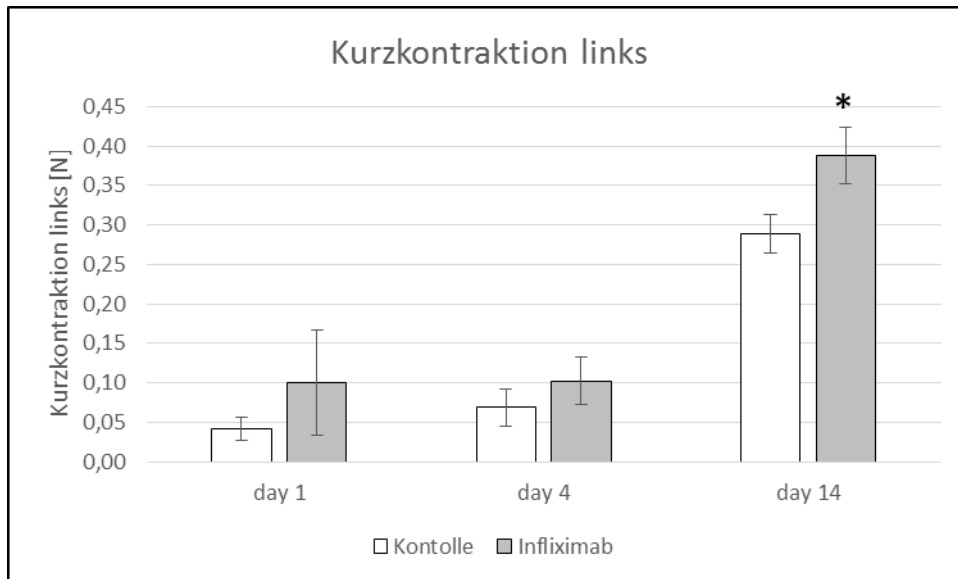


Abb. 1a

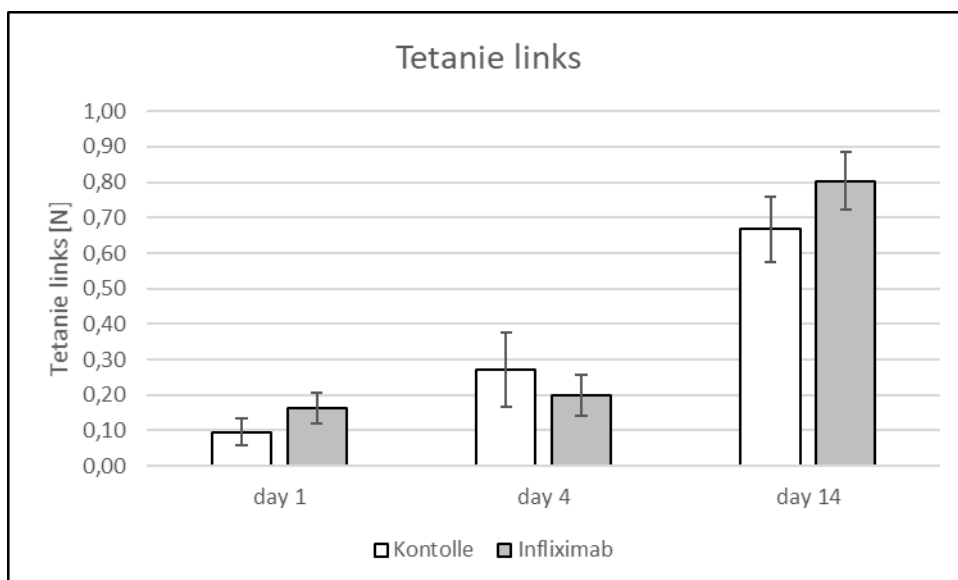


Abb. 1b

Abb. 2a/b: Quantitative Analyse von CAE-positiven Zellen (A) und TUNEL-positiven Zellen (B) am verletzten Muskel. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *p<0,05 vs CTRL

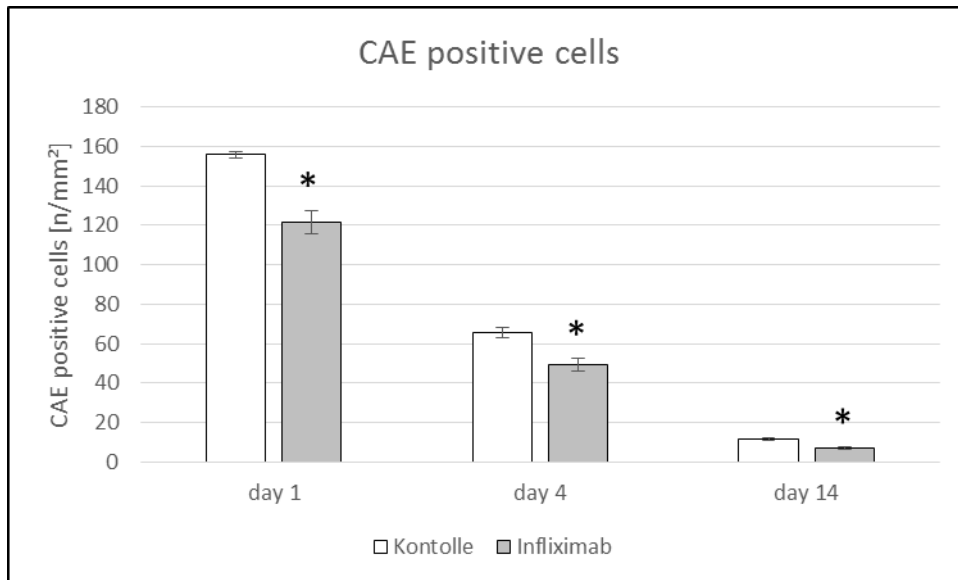


Abb. 2a

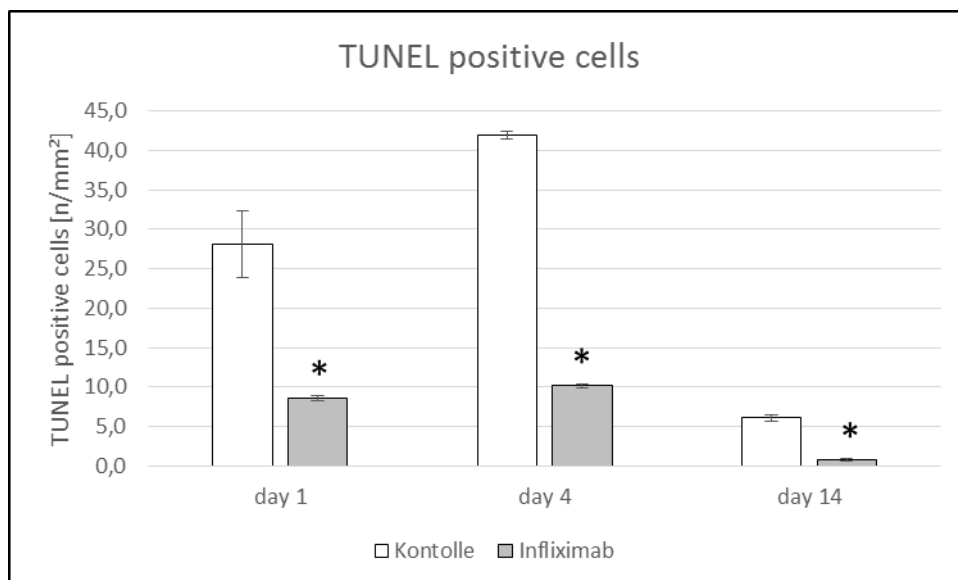


Abb. 2b

Eine ähnliche Dynamik wurde für den apoptotischen Zelltod beobachtet, welcher durch die TUNEL-Färbung ermittelt wurde. Die Apoptose erreichte ihr Maximum in der Kontrollgruppe am vierten Tag mit 42 Zellen/mm² und verringerte die Zellzahl im Laufe der Zeit auf 6 Zellen/mm² am vierzehnten Tag nach Trauma. Durch die Behandlung mit dem TNF-Hemmer Infliximab konnte zu jeder Zeit eine signifikante Reduktion des apoptotischen Zelltodes im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Auch der signifikante Anstieg der Zellzahl aus der Kontrollgruppe am vierten Tag blieb in der Infliximab-Gruppe aus (Abb. 2b). Planimetrische Analysen des Muskelgewebes zeigten eine verringerte Zerstörung von Muskelgewebe nach Behandlung mit Infliximab über den gesamten Zeitraum, am signifikantesten am vierten Tag der Untersuchung (Abb. 3a)

Abb. 3a/b: Repräsentative quantitative Analyse des Muskelgewebes im verletzten Muskel (3a) und des Muskelfaserdiameters (3b). An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *p<0,05 vs CTRL

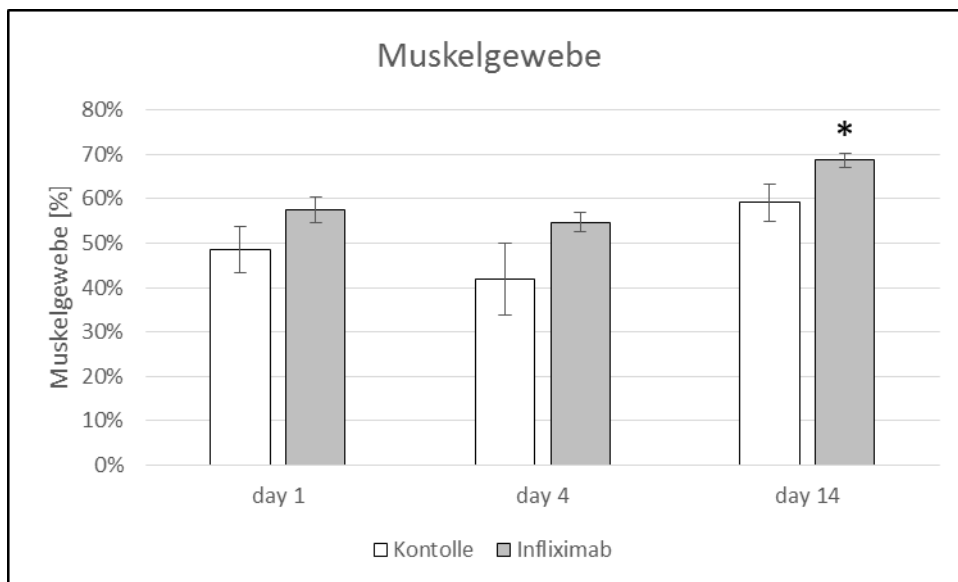


Abb. 3a

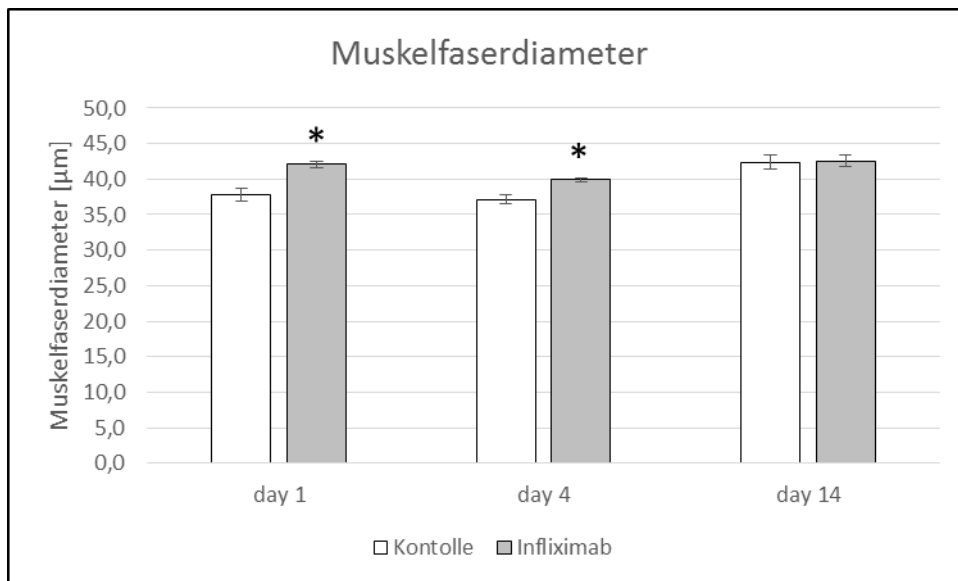


Abb. 3b

Gesunde unverletzte Muskelfasern haben einen Durchmesser zwischen 38 und 42 µm [(86)Stratos et al. 2012]. Unsere quantitative Analyse des Muskelfaserdurchmessers in der Penumbra zeigte eine signifikante Reduktion des Muskelfaserdurchmessers in der Kontrollgruppe an Tag eins und vier (Abb. 3b).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die posttraumatische Muskelatrophie an Tag eins und vier durch die Behandlung mit Infliximab verhindert werden kann und es darüber hinaus zu einer signifikanten Zunahme der Muskelmasse am vierzehnten Tag nach Trauma kommt. Diese Zunahme zeigte sich auch am Körpergewicht in der Infliximab-Gruppe (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verhältnis von unverletztem und verletztem M. soleus zum Körpergewicht. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. *p<0,05 vs CTRL

Tag	Verhältnis von unverletzten (rechten) M. soleus zu Körpergewicht (mg/g)		Verhältnis von verletztem (linkem) M. soleus zu Körpergewicht (mg/g)	
	CTRL	IFX	CTRL	IFX
1	0.90±0.02	0.91±0.10	0.89±0.04	0.88±0.10
4	0.78±0.02	0.78±0.01	0.78±0.02	0.77±0.01
14	0.76±0.03	0.83±0.02	0.71±0.01	0.80±0.01*

Tabelle 1

Der unverletzte Muskel zeigte im Vergleich mit dem mit Infliximab behandelten Muskel keinen Unterschied bezüglich der Muskelmasse (Tabelle 1). Die Analyse der Zellproliferation mit BrdU-Immunhistochemie erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 4a).

Abb. 4a: Quantitative Analyse von BrdU-positiven Zellen im verletzten Muskelgewebe. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *p<0,05 vs CTRL

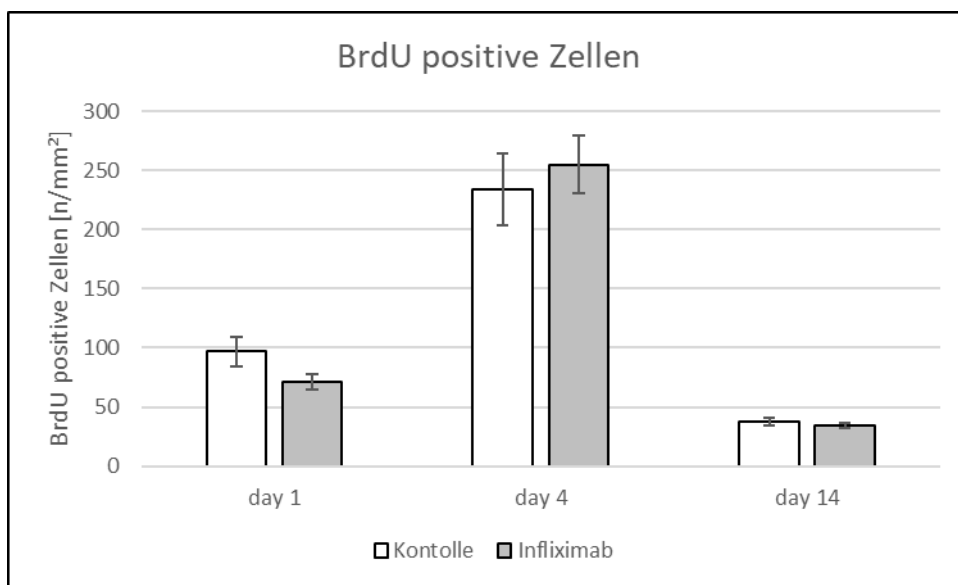


Abb. 4a

Um die Aktivität der inflammatorischen Zytokine im verletzten Muskel zu detektieren, bestimmten wir die Werte von TNF und IL-6. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte der TNF-Blocker Infliximab die TNF-Spiegel im verletzten Muskel an Tag vier nach der Verletzung deutlich reduzieren. Die densitometrische Analyse von IL-6 erbrachte keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (Tabelle 2).

Tabelle 2: Quantitative Western Blot Analyse von IL-6 und TNF im Verhältnis zu GAPDH im Muskelgewebe. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs CTRL

Tag	Verhältnis von IL-6 zu GAPDH		Verhältnis von TNF zu GAPDH	
	CTRL	IFX	CTRL	IFX
1	0.53 \pm 0.25	0.46 \pm 0.11	0.27 \pm 0.11	0.38 \pm 0.27
4	0.62 \pm 0.16	0.46 \pm 0.09	0.50 \pm 0.12	0.12 \pm 0.05*
14	0.35 \pm 0.05	0.46 \pm 0.10	0.16 \pm 0.05	0.25 \pm 0.15

Tabelle 2

Darüber hinaus untersuchten wir den TRAF-2-Spiegel, ein Signal-Adaptermolekül, welches in der Signal-Kaskade des TNF-Rezeptors zur Hochregulation von NF- κ B führt. Es zeigten sich erhöhte TRAF-2-Spiegel am vierten und vierzehnten Tag nach Trauma in der Infliximab-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verhältnis von TRAF-2, p105 und p65 zu GAPDH. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs CTRL

Tag	Verhältnis von TRAF-2 zu GAPDH		Verhältnis von p105 zu GAPDH		Verhältnis von p65 zu GAPDH	
	CTRL	IFX	CTRL	IFX	CTRL	IFX
1	0.24 \pm 0.08	0.41 \pm 0.15	0.13 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.13 \pm 0.06	0.19 \pm 0.12
4	1.02 \pm 0.07	0.91 \pm 0.38	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02
14	1.33 \pm 0.46	0.72 \pm 0.19	0.10 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01

Tabelle 3

Wie durch vergleichbare densitometrische Untersuchungen gezeigt werden konnte, beeinflusst Infliximab den TRAF-2-Proteinspiegel in beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkten der Untersuchung (Tabelle 3).

Abb. 4b: Quantitative Analyse von NF- κ B p65-positiven Zellkernen (red arrows) in der Penumbra-Zone. An allen Tieren wurde eine standardisierte Verletzung am linken M. soleus herbeigeführt und diese anschließend mit Infliximab (IFX; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) oder Vergleichslösung (CTRL; n=7 Tiere pro Zeitpunkt und Gruppe) behandelt. Aufeinanderfolgende Analysen am ersten, vierten und vierzehnten Tag nach Trauma wurden durchgeführt. Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs CTRL

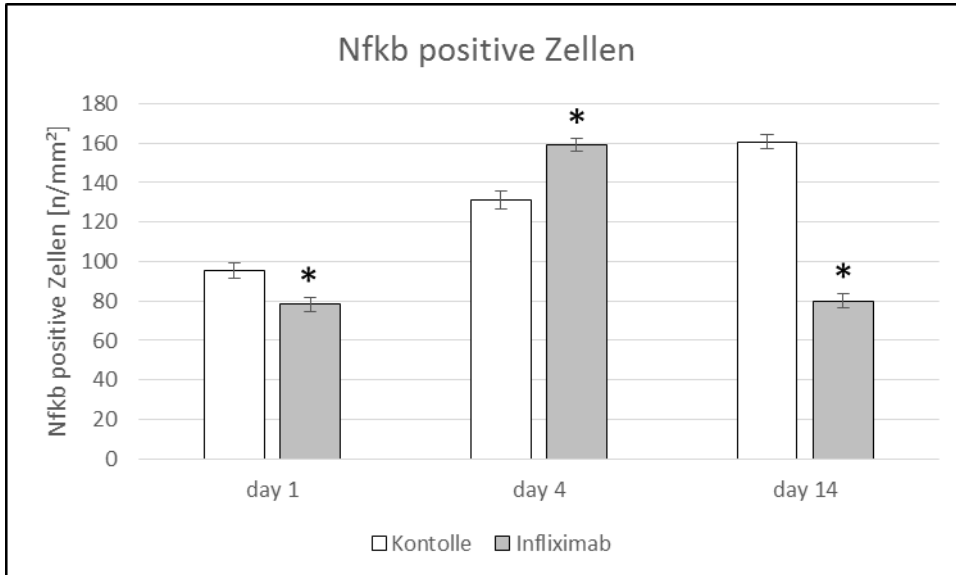


Abb. 4b

Immunhistochemische Analysen des NF- κ B p65-Spiegels in der Penumbra-Zone zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen der Infliximab-Gruppe und der Kontrollgruppe. Infliximab führte zu einer signifikanten Abnahme der NF- κ B p65-positiven Kerne an Tag eins und Tag vierzehn, wohingegen an Tag vier eine signifikante Zunahme beobachtet werden konnte (Abb. 4b). Im Gegensatz hierzu zeigte die Quantifizierung der NF- κ B-Untereinheiten p65 und p105 durch einen Western Blot im verletzten Muskelgewebe zu keinem Zeitpunkt Veränderungen (Tabelle 3).

5 Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, dass Infliximab die biomechanische Funktion des verletzten Muskels durch eine deutliche Erhöhung der Muskelkraft verbessert. Weiterhin haben wir nachgewiesen, dass die funktionelle Wiederherstellung des Muskels mit einem gesteigerten Wachstum des Muskelgewebes an Tag

vierzehn einhergeht. Außerdem fiel ein Rückgang der Apoptose und der lokalen Leukozyten-Infiltration während des gesamten Versuchszeitraumes auf. Als mögliche Erklärung für diese Ergebnisse sehen wir eine verminderte Bioaktivität des TNF durch die Infliximab-Anwendung und die daraus resultierende Reduktion der überschießenden Nekrose der Muskelfasern nach Trauma [(34)Grounds et al. 2005] [(38)Hodgetts et al. 2006] an.

5.1 Dosis und Pharmakokinetik von Infliximab

Im Rahmen dieser Studie verabreichten wir den Tieren eine einzige i.p.-Injektion Infliximab mit einer Dosis von 10 mg/kg KG, welche gemäß der aktuellen Literatur ausreicht, um einen biologischen Effekt zu erzielen. Nach einer einmaligen Injektion von Infliximab konnte eine Halbwertszeit von sieben bis zwölf Tagen und eine mittlere Verweilzeit im Körper von zwölf bis siebzehn Tagen nachgewiesen werden [(52)Klotz et al. 2007]. Bezüglich der von uns verwendeten Konzentration von Infliximab gibt es zahlreiche Studien, die einen positiven Effekt auf Menschen, Ratten und Mäuse zeigen. Die übliche therapeutische Dosis für den Menschen bei Morbus Crohn oder Rheumatoider Arthritis beträgt 3-5 mg/kg KG intravenös verabreicht [(52)Klotz et al. 2007]. Es konnte in Studien mit einer einmaligen, wöchentlichen Infliximab-Dosis von 10-20 mg/kg KG ein positiver Effekt bei Diabetes [(1)Araujo et al. 2007], bei Entzündungen von Muskeltransplantaten [(34)Grounds et al. 2005] sowie Osteoporose [(20)Dagdeviren et al. 2011] nachgewiesen werden. Obwohl die Verwendung von NaCl-Lösung als Kontrolllösung bei Infliximab-Studien üblich ist, wäre eine Isotyp-Kontrolle die angemessenere Wahl gewesen. Isotyp-Kontroll-Antikörper werden verwendet, um die unspezifische Bindung von primären Antikörpern zu schätzen. Die unspezifische Bindung von primären Antikörpern ist bedingt durch unspezifische Fc (kristallisierbares Fragment)-Rezeptorbindungen, unspezifische Antikörper-Interaktionen mit zellulären Proteinen, Autofluoreszenz der Zellen oder andere Protein-Protein-Wechselwirkungen. Im Fall von Infliximab wäre der entsprechende monoklonale Kontroll-Antikörper ein Immunglobulin G1 (IgG1). Regatieri et al. verglichen die Wirkung von intravenös verabreichter NaCl-Lösung, mono-klonalen IgG1-

Antikörpern und Infliximab in einem experimentellen Rattenmodell hinsichtlich choroidaler Neovaskularisation. Hier fand sich zwischen der NaCl-Gruppe und der IgG1-Gruppe kein Unterschied [(79)Regatieri et al. 2009]. Allerdings gibt es Berichte, die zeigen, dass eine alleinige intravenöse Immunglobulin-Behandlung die Muskelfunktion bei Muskelerkrankungen verbessern kann [(21)Dalakas et al. 2014]. Leider sind die Gesamtdaten hinsichtlich der Stärke der Wirksamkeit nicht ausreichend [(26)Gajdos et al. 2012]. In Vorarbeiten wurde die Wirksamkeit von Immunglobulinen bei Muskeldystrophie Duchenne im Mausmodell belegt. Die Mechanismen, die der Wirksamkeit des IgG im Muskel zugrunde liegen, sind bisher jedoch nur unzureichend entschlüsselt [(107)Zschüntsch et al. 2016].

5.2 TNF und Infliximab

Verschiedene in-vitro-Experimente mit Muskelzellen haben belegt, dass TNF diverse Auswirkungen auf die Myogenese hat. Es wurde berichtet, dass, abhängig vom Zustand der Muskelzellen, TNF den Zelltod, Muskelzellwachstum oder sogar Muskeluntergang fördert [(58)Layne et al. 1999] [(89)Szalay et al. 1997]. In-vivo-Studien zeigten außerdem die Schwierigkeit, die Wirkung des TNF auf Wachstum und Lebensfähigkeit der Muskelzellen vorherzusagen, da einerseits von positiven, andererseits aber auch von negativen regulatorischen Effekten des TNF auf das Muskelgewebe berichtet wurde. Degenerative Effekte des TNF auf das Muskelgewebe durch Stimulation der Muskelatrophie, hervorgerufen durch Depression der Proteinsynthese und Erhöhung des Proteinabbaus via Ubiquitin-Proteasom-Weg und nachfolgend Hochregulation von NF- κ B, wurden beschrieben [(97)Tisdale et al. 2008]. Frühere Ergebnisse von Li et al. zeigten, dass eine erhöhte Konzentration des TNF Satellitenzellen aktiviert, welche während des Zellzyklus die Mitose der Skelettmuskulatur beschleunigen [(61)Li et al. 2003]. Ein vorübergehender Anstieg der TNF-Freisetzung während der Muskelregeneration stimuliert die Myogenese, wohingegen eine kontinuierliche Steigerung der TNF-Freisetzung im Rahmen z.B. entzündlicher Erkrankungen einen negativen Effekt auf die Myogenese hat [(19)Chen et al. 2007]. Wegen der komplexen Wirkungen des TNF auf Muskelgewebe ist es schwierig,

eine Vorhersage über die Wirkung von Infliximab nach Muskelverletzungen zu machen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Infliximab Einfluss auf Apoptose, Entzündungen, NF- κ B-Aktivität und das Muskelgewebe hat. In Bezug auf die biologische Wirkung von Infliximab ist bekannt, dass es an die lösliche und membrangebundene Form des TNF bindet. Sobald die Aktivität des TNF blockiert ist, finden zahlreiche zelluläre Ereignisse statt. Diese Ereignisse führen zu einer lokalen und systemischen proinflammatorischen Zytokin-Down-regulation, Verringerung der lokalen Leukozyteninfiltration, verminderten lokalen Lymphozytenzahl, zur Apoptose von TNF-produzierenden Zellen sowie zur Reduktion von Akutphasenproteinen und zu einer Erhöhung der NF- κ B-Inhibitor-Anzahl [(52)Klotz et al. 2007].

TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF), sind eine Familie von cytoplasmatischen Signaladapterproteinen. Als Reaktion auf eine Vielzahl von Reizen interagieren die TRAF-Moleküle mit unterschiedlichen Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie und anderen Transmembran-Rezeptoren [(41)Inoue et al. 2000]. Die Bindung von TRAF-Adapterproteinen an die cytoplasmatischen Domänen von Rezeptormolekülen ist das Ergebnis einer Vielzahl von Signalwegen, welche eine intrazelluläre Signalkaskade wie die Mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAPK) aktiviert. Dadurch werden nicht nur Entzündungsreaktionen moduliert, sondern auch die Apoptose initiiert [(41)Inoue et al. 2000]. Im Hinblick auf die Apoptose von Geweben gibt es Arbeiten, die die These der pro-apoptotischen Wirkung von Infliximab bestätigen [(106)Wong et al. 2008]. Radley et al. haben in einem dystrophischen Mausmodell jedoch gezeigt, dass die Blockade des TNF die Muskelfaserschädigung und die Muskelzellenekrose reduziert [(75)Radley et al. 2008]. Andere Forschungsgruppen beobachteten ähnliche Ergebnisse nach exzentrischer Bewegung und Infliximab-Applikation bei dystrophischen und normalen Mäusen [(72)Piers et al. 2011]. Zusätzlich berichtete Kurt et al. über die anti-apoptotische Wirkung auf Neuronen nach Behandlung mit Infliximab in einem Kaninchen-Hydrocephalus-Modell [(57)Kurt et al. 2010]. Leider sind die molekularen Vorgänge, welche für die anti-apoptotische Wirkung zuständig sind, noch nicht ausreichend erforscht und könnten durchaus Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die pleiotrope Natur des NF- κ B-Transkriptionsfaktors zeigt seine Wichtigkeit für die Physiologie und Pathophysiologie des Muskels deutlich. Die Aktivität von NF- κ B scheint auf direktem Weg die Muskeldifferenzierung sowie mitotische Ereignisse zu regulieren. Es wird angenommen, dass NF- κ B auch andere Moleküle steuert, welche für die Energie des Muskels und seinen Stoffwechsel bis hin zur Atrophie verantwortlich sind [(66)Mourkioti et al. 2008] [(108)Zizzo et al. 2021]. Die Hemmung von NF- κ B-Signalen ist eine bekannte Wirkung von Infliximab [(30)Guo et al. 2013]. Man geht davon aus, dass die Behandlung mit Infliximab die Konzentration der NF- κ B-Inhibitoren erhöht. Dies wiederum verringert die NF- κ B-Signale, was wiederum zu einer Verringerung der TNF-Produktion führt [(30)Guo et al. 2013]. Ähnliche Effekte konnten wir in unserer Studie beobachten. An Tag eins und vierzehn fanden sich eine verminderte NF- κ B-Produktion in den Muskelfasern sowie an Tag vier ein verringerter TNF-Spiegel im verletzten Muskelgewebe. Die erhöhte Konzentration des NF- κ B an Tag vier könnte als Folge der anabolen Ereignisse, welche in der verletzten Muskelfaser während des zellulären Wiederaufbaus beschrieben wurden, gedeutet werden [(32)Guttridge et al. 1999]. Es gibt sehr wenige Berichte über die Muskelkraft nach der Behandlung mit Infliximab. Kakoulidou und Mitarbeiter beschrieben, dass bei einem Patienten mit Myasthenia gravis die wiederholte Behandlung mit Infliximab eine Verbesserung der Ermüdung des Muskels erbrachte [(48)Kakoulidou et al. 2007]. Eine weitere klinische Studie zeigte, dass eine kontinuierliche Behandlung mit Infliximab zu einer erhöhten linksventrikulären Funktion des Herzmuskels bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis führte [(55)Kotyla et al. 2012]. Piers et al. konnten nachweisen, dass die TNF-Blockade das Muskelkraft-Defizit in einem dystrophischen Maus-Modell reduziert [(72)Piers et al. 2011]. Die gleiche Arbeitsgruppe hat geschlussfolgert, dass die schützende Wirkung der TNF-Blockade auf die kontraktile Dysfunktion auf die kurzfristige Blockade des TNF zurückgeführt werden muss und nicht durch eine Anpassung der Muskelumgebung bedingt ist [(72)Piers et al., 2011]. Die Behandlung mit Infliximab bei Muskelverletzungen hat die vielfältigen Wege gezeigt, welche durch die TNF-Hemmung reguliert werden. Anlässlich der Corona-Pandemie sollte auch die CLARITY IBD-Studie nicht unerwähnt bleiben, bei der bei fast 7.000 Patienten unter Infliximab-Therapie die Immunantwort auf eine Sars-Covid-Infektion weitestgehend

ausblieb und keine oder lediglich eine geringe Serokonversion stattfand [(51)Kennedy et al. 2021]. Daraus könnte gefolgert werden, dass der gefürchtete Zytokinsturm unter TNF-Blockade ausbleibt und die Schwere der Erkrankung abgemildert wird. Diese Thesen sind jedoch noch Teil weiterer Forschungen.

Unsere Studie konnte einige der komplexen zellulären und cytokinetischen Pfade entwirren, die die Bedeutung des TNF bei der Regeneration der Skelettmuskulatur zeigen. Hieraus wird deutlich, wie wichtig Biologicals in Zukunft für die Medizin werden oder auch schon sind. Die Möglichkeiten und Chancen sollten Grund für weitere Forschungen und Studien sein.

6 Zusammenfassung

Das Ziel unserer Studie war es, zu untersuchen, ob die Blockade von TNF-Rezeptoren durch den TNF-Inhibitor Infliximab die Muskelregeneration nach Verletzungen verbessern und beschleunigen kann. Aus diesem Grund induzierten wir insgesamt sieben stumpfe Verletzungen am vorher frei präparierten linken M. soleus von insgesamt 42 Ratten. Nach dem Trauma erhielten diese 42 Tiere eine einzelne Dosis von entweder 10 mg Infliximab/kg KG oder äquivalente Volumina an Kochsalzlösung intraperitoneal. Nachfolgende Beobachtungen wurden am ersten, vierten sowie am vierzehnten Tag nach der Verletzung durchgeführt. Am Ende des Experiments quantifizierten wir die Muskelkraft, die Muskelmasse des M. soleus im Verhältnis zum Körpergewicht, die Muskelzellproliferation (BrdU-Immunhistochemie), die Fläche der Muskelzellen sowie den Durchmesser der Muskelfasern (HE-Histologie). Das Verhältnis von Muskelmasse zu Körpergewicht zeigte sich erhöht. Bei der Muskelkraft-Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Muskelkraft am vierzehnten Tage nach der Verletzung durch TNF-Hemmung. Die Bestimmung des Muskelfaserdurchmessers erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen an Tag eins und vier nach der Verletzung, hervorgerufen durch eine deutliche Hypertrophie des Muskels in der Infliximab-Gruppe.

Nach planimetrischen Analysen des Muskelgewebes ergab sich eine signifikante Erhöhung der sichtbaren Muskelzellen am vierzehnten Tag in der Infiximab-Gruppe. Allerdings unterschied sich die Muskelzellproliferation zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Insgesamt stützen unsere Daten unsere primäre Hypothese, dass die Hemmung des TNF eine Vielzahl von regenerativen Prozessen im verletzten Muskel induziert.

6.1 Summary

The aim of our study was to investigate whether blockade of TNF using the TNF inhibitor infliximab could improve and accelerate muscle regeneration after injury. Therefore we induced a blunt injury of the left soleus muscle on 42 rats. After trauma, 42 animals received a single dose of either 10 mg/kg bw infliximab or equivalent volumes of saline as vehicle solution i.p.. Subsequent observations were performed at day 1, 4 and 14 after injury. At the end of the experiment we quantified the muscle force, the wet muscle weight to body weight, the muscle cell proliferation (BrdU immunohistochemistry) and the area of muscle cells as well as the myofiber diameter (HE histology). The ratio of muscle weight to body weight was increased and the muscle force analysis showed a significant increase of twitch muscle force 14 days after injury by TNF inhibition. Quantification of myofiber diameter showed a significant difference between both groups at day 1 and 4 after injury, indicated by muscle hypertrophy in the infliximab group. Planimetric analysis of muscle tissue revealed at day 14 a significant increase of visible muscle cells in the infliximab group compared to the controls. However, muscle cell proliferation did not differ between both groups. Overall these data support our primary hypothesis that inhibition of TNF induces regenerative processes in the injured muscle.

7 Literaturverzeichnis

1. Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. *"Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet induced obesity and diabetes."* Endocrinology. 2007 Dec;148(12):5991-7.
2. Äärimaa V, Kääriäinen M, Vaittinen S, Tanner J, Järvinen T, Best T, Kalimo H. *"Restoration of myofiber continuity after transaction injury by surgical suturing."* Neuromuscul Disord. 2004 Jul;14(7):421-8.
3. Abubakar, S. D., S. A. Ihim, A. Farshchi, S. Maleknia, H. Abdullahi, T. Sasaki and G. Azizi. *"The role of tnf- α and anti-tnf- α agents in the immunopathogenesis and management of immune dysregulation in primary immunodeficiency diseases."* Immunopharmacol Immunotoxicol. 2022 Apr;44(2):147-156.
4. Aggarwal B.B. *"Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword."* Nat Rev Immunol 2003 Sep;3(9):745-56.
5. Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J. *"The effects of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury."* Am J Sports Med Jan-Feb 1999;27(1):2-9.
6. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. *"Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin."* Nature. 1985 Aug 8-14;316(6028):552-4.
7. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. *"Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin."* Science. 1985 Aug 30;229(4716):869-71.
8. Black RA1, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Cas-tner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. *"A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells."* Nature. 1997 Feb 20;385(6618):729-33.
9. Bleakley CM, McDonough SM, MacAuley DC, Bjordal J. *"Cryotherapy for acute ankle sprains: a randomised controlled study of two different icing protocols."* Br J Sports Med. 2006; 40:700-705; discussion 705.

10. Bradley JR. "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol. 2008 Jan;214(2):149-60.
11. Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. "Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study." J Orthop Res. 2004; 22:1336-1344.
12. Chargé SB, Rudnicki MA. "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." Physiol Rev. 2004 Jan;84(1):209-38.
13. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. "Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth." J Cell Biol. 2003; 163:1133-1143.
14. Brasier AR. "The NF-kappaB regulatory network." Cardiovasc Toxicol. 2006;6(2):111-30.
15. Brynskov J1, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, Saermark T. "Tumour necrosis factor α converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease." Gut. 2002 Jul;51(1):37-43.
16. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3666-70.
17. Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP. "Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle." Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Nov;289(5):C1179-87.
18. Chen G1, Goeddel DV. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science. 2002 May 31;296(5573):1634-5.
19. Chen SE, Jin B, Li YP. "TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK." Am J Physiol Cell Physiol. 2007 May;292(5):C1660-71.
20. Dagdeviren S, Kandilci HB, Uysal B, Zeybek ND, Korkusuz P, Gumusel B, Korkusuz F. "Tumor necrosis factor- α antagonist administration recovers skeletal muscle dysfunction in ovariectomized rats." J Orthop Res. 2011 Feb;29(2):275-80.
21. Dalakas MC. "Mechanistic Effects of IVIg in Neuroinflammatory Diseases:

- Conclusions Based on Clinicopathologic Correlations.*” J Clin Immunol. 2014 Jul;34 Suppl 1:S120-6.
22. Deal DN, Tipton J, Rosencrance E, Curl WW, Smith TL. “*Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats.*” J Bone Joint Surg Am. 2002; 84-A:1573-1578.
23. Dowlati Y1, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL.
“*A meta-analysis of cytokines in major depression.*” Biol Psychiatry. 2010 Mar 1;67(5):446-57.
24. Dubinsky MC, Fleshner PP.” *Treatment of Crohn's Disease of Inflammatory, Stenotic, and Fistulizing Phenotypes.*” Curr Treat Options Gastroenterol. 2003 Jun;6(3):183-200.
25. Gahring LC1, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW. “*Neuronal expression of tumor necrosis factor α in the murine brain.*” Neuroimmunomodulation. Sep-Oct 1996;3(5):289-303.
26. Gajdos P, Chevret S, Toyka KV. “*Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis.*” Cochrane Database Syst Rev. 2012 Dec 12;12(12):CD002277.
27. Gaur U1, Aggarwal BB. “*Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily.*” Biochem Pharmacol. 2003 Oct 15;66(8):1403-8.
28. Gilmore TD1. “*Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives.*” Oncogene. 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
29. Gilmore TD. “*The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction.*” Oncogene. 1999 Nov 22;18(49):6842-4.
30. Guo Y, Lu N, Bai A. “*Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update.*” Biomed Res Int. 2013;2013:581631.
31. Gupta AK, Skinner AR “*A review of the use of infliximab to manage cutaneous dermatoses.*” J Cutan Med Surg. Mar-Apr 2004;8(2):77-89.
32. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. “*NFkappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1.*” Mol Cell Biol. 1999 Aug;19(8):5785-99.

33. Grounds MD. "Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration." *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:78-91.
34. Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. "Silencing TNF- α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice." *Cell Tissue Res.* 2005 Jun;320(3):509-15.
35. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. "The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair." *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:589-610.
36. Hanauer SB "Crohn's disease: step up or top down therapy." *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Feb;17(1):131-7.
37. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. "Maintenance in-fliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial." *Lancet.* 2002 May 4;359(9317):1541-9.
38. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. "Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF- α function with Etanercept in mdx mice." *Neuromuscul Disord.* 2006 Oct;16(9-10):591-602.
39. Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH. "Gene therapy and tissue engineering for sports medicine." *J Gene Med.* 2003; 5:93-108.
40. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. "Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study". *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23:801-810.
41. Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T. "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling." *Exp Cell Res.* 2000 Jan 10;254(1):14-24.
42. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. "Muscle injuries: biology and treatment." *Am J Sports Med.* 2005 May;33(5):745-64.
43. Jarvinen JL, Lamb TD. "Inverted photocurrent responses from amphibian rod

- photoreceptors: role of membrane voltage in response recovery.*” J Physiol. 2005; 566:455-466.
44. Jarvinen M, Lehto M, Sorvari T. “*Effect of some anti-inflammatory agents on the healing of ruptured muscle. An experimental study in rats.*” J Sports Traumatol. 1992b;14:19-28.
45. Jian-Hong Shi, Shao-Cong Sun “*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways*”. Front Immunol. 2018 Aug 9;9:1849.
46. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. “*Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair.*” Scand J Med Sci Sports. 2000; 10:332-337.
47. Kaariainen M, Liljamo T, Pelto-Huikko M, Heino J, Jarvinen M, Kalimo H. “*Regulation of α 7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration.*” Neuromuscul Disord. 2001; 11:360-369.
48. Kakoulidou M, Bjelak S, Pirskanen R, Lefvert AK. “*A clinical and immunological study of a myasthenia gravis patient treated with infliximab.*” Acta Neurol Scand. 2007 Apr;115(4):279-83.
49. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. “*Muscle regeneration: cellular and molecular events.*” In Vivo. Sep-Oct 2009;23(5):779-96.
50. Kavanaugh AF, Ritchlin CT. “*Systematic review of treatments for psoriatic arth-ritis: an evidence based approach and basis for treatment guidelines.*” J Rheumatol. 2006 Jul;33(7):1417-21.
51. Kennedy NA, Lin S, Goodhand JR, Chanchlani N, Hamilton B, Bewshea C, Nice R, Chee D, Cummings JF, Fraser A, Irving PM, Kamperidis N, Kok KB, Lamb CA, Macdonald J, Mehta S, Pollok RC, Raine T, Smith PJ, Verma AM, Jochum S, McDonald TJ, Sebastian S, Lees CW, Powell N, Ahmad T; “*Contributors to the CLARITY IBD study.*” Gut. 2021 “*Infliximab is associated with attenuated immunogenicity to BNT162b2 and ChAdOx1 nCoV-19 SARS-CoV-2 vaccines in patients with IBD.*” Gut. 2021 Oct;70(10):1884-1893.
52. Klotz U, Teml A, Schwab M. “*Clinical pharmacokinetics and use of infliximab.*” Clin Pharmacokinet. 2007;46(8):645-60.

53. Kolb WP, Granger GA. "Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin." Proc Natl Acad Sci USA. 1968 Dec;61(4):1250-5.
54. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. *The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease.* Ann Rheum Dis. 1999 Nov;58 Suppl 1(Suppl 1):I32-9.
55. Kotyla PJ, Owczarek A, Rakoczy J, Lewicki M, Kucharz EJ, Emery P. "Infliximab treatment increases left ventricular ejection fraction in patients with rheumatoid arthritis: assessment of heart function by echocardiography, endothelin 1, interleukin 6, and NT-pro brain natriuretic peptide." J Rheumatol. 2012 Apr;39(4):701-6.
56. Kriegler M1, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." Cell. 1988 Apr 8;53(1):45-53.
57. Kurt G, Cemil B, Borcek AO, Borcek P, Akyurek N, Sepici A, Ceviker N. "Infliximab administration reduces neuronal apoptosis on the optic pathways in a rabbit hydrocephalus model: a preliminary report." Br J Neurosurg. 2010 Jun;24(3):275-9.
58. Layne MD, Farmer SR. "Tumor necrosis factor- α and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts." Exp Cell Res. 1999 May 25;249(1):177-87.
59. Lehto M, Duance VC, Restall D. "Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat." J Bone Joint Surg Br. 1985; 67:820-828.
60. Levinen WM, Begfeld JA, Tessedorf W, Moorman CT., 3rd. "Intramuscular corticosteroid injection for hamstring injuries. A 13-year experience in the National Football League." Am J Sports Med. May-Jun 2000;28(3):297-300.
61. Li YP. "TNF- α is a mitogen in skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Aug;285(2):C370-6.
62. Locksley RM1, Killeen N, Lenardo MJ. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell. 2001 Feb 23;104(4):487-501.

63. Mauro A. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9:493-495.
64. Maxwell, LJ; Zochling, J; Boonen, A; Singh, JA; Veras, MM; Tanjong Ghogomu, E; Benkhalti Jandu, M; Tugwell, P; Wells, GA. "TNF- α inhibitors for ankylosing spondylitis." *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Apr 18;(4):CD005468.
65. Mikocka-Walus AA1, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ. "Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review." *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Feb;13(2):225-34.
66. Mourkioti F, Rosenthal N. "NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases." *J Mol Med (Berl).* 2008 Jul;86(7):747-59.
67. Oestern H J, Tscherne H. "Physiopathology and classification of soft tissue lesion". *Hefte Unfallheilkd.* 1983;162:1-10.
68. Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE., Jr. "Biomechanical and histological assessment of controlled muscle strain injury treated with piroxicam." *Am J Sports Med.* Jul-Aug 1994;22(4):558-61.
69. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. "Anti-TNF- α therapies: the next generation." *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Sep;2(9):736-46.
70. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." *Nature.* 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):724-9.
71. Perkins ND. "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62.
72. Piers AT, Lavin T, Radley-Crabb HG, Bakker AJ, Grounds MD, Pinniger GJ. "Blockade of TNF in vivo using cV1q antibody reduces contractile dysfunction of skeletal muscle in response to eccentric exercise in dystrophic mdx and normal mice." *Neuromuscul Disord.* 2011 Feb;21(2):132-41.
73. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van

- Deven-ter SJ. "*Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.*" N Engl J Med. 1999 May 6;340(18):1398-405.
74. Puéchal X, Terrier B, Mouthon L, Costedoat-Chalumeau N, Guillevin L, Le Jeune C. "*Relapsing polychondritis.*" Joint Bone Spine. 2014 Mar;81(2):118-24.
75. Radley HG, Davies MJ, Grounds MD. "*Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment.*" Neuromuscul Disord. 2008 Mar;18(3):227-38.
76. Rahunen FT, Weinhold PS, Almekinders LC. "*Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury.*" Am J Sports Med. 2004 Dec;32(8):1856-9.
77. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. "*Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal muscle myofibers after experimental muscle injury.*" Am J Sports Med. Jan-Feb 1999;27(1):54-9.
78. Remicade: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels, Stand: November 2009 Seite 2-3 auf der Website der Europäischen Arzneimittelagentur EMA,.
79. Regatieri CV, Dreyfuss JL, Melo GB, Lavinsky D, Farah ME, Nader HB. "*Dual role of intravitreal infliximab in experimental choroidal neovascularization: effect on the expression of sulfated glycosaminoglycans.*" Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Nov;50(11):5487-94.
80. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. "*Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis.*" N Engl J Med. 2005 Dec 8;353(23):2462-76.
81. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. "*Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease.*" N Engl J Med. 2004 Feb 26;350(9):876-85.
82. Sfikakis PP. "*Behçet's disease: a new target for anti-tumour necrosis factor treatment.*" Ann Rheum Dis. 2002 Nov;61 Suppl 2(Suppl 2):ii51-3.

83. Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, McKee NH, Plyley MJ. "*Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle.*" J Appl Physiol. 2001; 90:1407-1414.
84. Sjoberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. "*Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy.*" Exp Cell Res. 1994; 214:447-458.
85. Steinhilber D. "*The pharmacology of immunosuppressives.*" Pharm Unserer Zeit. 2005;34(4):276-81.
86. Stratos I, Li Z, Rotter R, Herlyn P, Mittlmeier T, Vollmar B. "*Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. Apoptosis.*" 2012 Mar;17(3):269-77.
87. Stratos I, Richter N, Rotter R, Li Z, Zechner D, Mittlmeier T, Vollmar B. "*Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats.*" J Pineal Res. 2012 Jan;52(1):62-70.
88. Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. "*Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats.*" J Appl Physiol (1985). 2007 Nov;103(5):1857-63.
89. Szalay K, Razga Z, Duda E. "*TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin.*" Eur J Cell Biol. 1997 Dec;74(4):391-8
90. Swardfager W1, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. "*A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease.*" Biol Psychiatry. 2010 Nov 15;68(10):930-41.
91. Tang P1, Hung M-C, Klostergaard J. "*Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer.*" Biochemistry. 1996 Jun 25;35(25):8216-25.
92. Terunuma H1, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. "*Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections.*" Int Rev Immunol. 2008;27(3):93-110.
93. Theiss AL1, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. "*Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2.*" J Biol Chem. 2005 Oct 28;280(43):36099-109.

94. Thoma, A. and A. P. Lightfoot. "*Nf-kb and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy.*" *Adv Exp Med Biol.* 2018;1088:267-279.
95. Thorsson O, Lilja B, Nilsson P, Westlin N. "*Immediate external compression in the management of an acute muscle injury.*" *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7:182-190.
96. Tian B, Brasier AR. "*Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network.*" *Recent Prog Horm Re.* 2003;58:95-130.
97. Tisdale MJ. "*Catabolic mediators of cancer cachexia.*" *Curr Opin Support Palliat Care.* 2008 Dec;2(4):256-61.
98. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD, et al. "*Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.*" *Science.* 1986 Oct 24;234(4775):470-4.
99. Tracey KJ1, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Ce-rami A. "*Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.*" *Nature.* 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4.
100. Turner NJ, Badylak SF. "*Regeneration of skeletal muscle.*" *Cell Tissue Res.* 2012 Mar;347(3):759-74.
101. Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. "*Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. Neuromuscul Disord.*" 2002; 12:584-587.
102. Victor FC1, Gottlieb AB. "*TNF- α and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis.*" *J Drugs Dermatol.* 2002 Dec;1(3):264-75.
103. Wajant H1, Pfizenmaier K, Scheurich P. "*Tumor necrosis factor signaling.*" *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65.
104. Walsh LJ1, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. "*Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1.*" *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 May 15;88(10):4220-4.
105. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. "*Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion.*" *Int J Sports Med.* 2004 Jan;25(1):73-7.
106. Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, Gjertson D, Braun J, Reed E,

Singh RR. "*TNF α blockade in human diseases: mechanisms and future directions.*" Clin Immunol. 2008 Feb;126(2):121-36.

107. Zschüntzsch J. , Yaxin Zhang , Florian Klinker , Gregor Makosch , Lars Klinge , Dörthe Malzahn , Heinrich Brinkmeier , David Liebetanz , Jens Schmidt „*Treatment with human immunoglobulin G improves the early disease course in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy*“. J Neurochem. 2016 Jan;136(2):351-62.

108. Zizzo, J. "*Muscle atrophy classification: The need for a pathway-driven approach.*" Curr Pharm Des. 2021;27(27):3012-3019.

V Liste der Lehrenden

Meine akademischen Lehrenden an der Universität Rostock waren:

Bertsche
Binder
Böttcher
Bullerdiek
Büttner
Emmert
Erbersdopler
Frierich
Fuchsluger
Gerber
Hakenberg
Hemmer
Hildebrandt
Hinz
Ince
Köhling
Kraft
Krause
Kröger
Kropp
Krüger
Kumbier
Lambrecht
Mittelmaier
Mittelmaier
Mitzner
Müller-Hilke
Mylinski
Nebe
Piek
Podbielski
Reisinger
Schafmayer
Schmitz
Schubert
Steinhagen-Thiessen

Storch
Tiedge
Ulfig
Virchow
Völlm
Vollmer
Weirich
Westphal
Willenberg
Wree

VI Danksagung

Mein Dank geht zuerst an meine wundervolle Frau und an meine wundervollen Kinder, die immer hinter mir stehen und mich unterstützen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Babin-Ebell ,der mir die Chance gegeben hat, diese Arbeit noch zu einem versöhnlichen Ende zu bringen, für sein tolle Unterstützung.

Weiterhin geht mein Dank an Prof. Dr. med. Ioannis Stratos, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit überhaupt auf die Beine zu stellen und die Experimente in der Experimentellen Chirurgie durchzuführen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Vollmar und Herrn Prof. Dr. med. Mittlmeier für die Chance auf eine Promotion in der Experimentellen Chirurgie der Universitätsklinik Rostock bedanken.

