

Aus dem Bereich
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Wirkung von Traumeel bei Muskelkontusionen im Mausmodell

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2022**

vorgelegt von: Anna Dahlem
geb. am: 24.08.1995 in Ludwigshafen am Rhein

Tag der Promotion: 16.02.2023

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. T. Histing
Prof. Dr. med. T. Tschernig

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung.....	1
1. Summary.....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Muskel	3
2.1.1. Histologie	3
2.1.2. Physiologie	4
2.1.3. Satellitenzellen	5
2.2. Regeneration bei Muskelschädigung.....	6
2.2.1. Regeneration des Skelettmuskels	6
2.2.1.1. Destruktionsphase	7
2.2.1.2. Reparaturphase	7
2.2.1.3. Remodeling	8
2.3. Posttraumatisches Ödem.....	9
2.4. Regeneration bei Muskelkontusion im Tiermodell	10
2.5. Muskelkontusionsmodelle	12
2.6. Muskelkontusionen.....	12
2.6.1. Allgemein	12
2.6.2. Einteilung	13
2.6.3. Symptome.....	14
2.6.4. Diagnostik	14
2.6.5. Therapie der Kontusion	14
2.7 Traumeel S®.....	17
2.7.1. Allgemein	17
2.7.2. Inhaltsstoffe.....	18
2.7.3. Nebenwirkung	18
2.8. Zielsetzung.....	19
2.9. Fragestellung	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Versuchsprotokoll.....	20
3.1.1. Tierhaltung	22
3.1.2. Intervention	22
3.1.2.1. Vorbereitung.....	22
3.1.2.2. Anästhesie	22
3.1.2.3. Kontusion	23
3.1.2.4. Injektionsbehandlung	24
3.1.2.5. Postoperative Kontrolle.....	25
3.1.3. Tötung der Tiere.....	26
3.1.4. Präparation des M. gastrocnemius	26
3.2. Zielkriterien und Auswertung.....	27
3.2.1. Ganganalyse	27
3.2.2. Sonographie und Photoakustik.....	30
3.2.3. Schiebelehre	32

3.2.4. Magnetresonanztomographie	33
3.2.5. Histologie	35
3.2.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
3.2.5.2. Immunhistologische Färbung	37
3.2.5.2.1. Caspase-3-Färbung	37
3.2.5.2.2. Myeloperoxidase (MPO)	39
3.2.5.2.3. CD68	39
3.3. Statistik	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Postinterventioneller Verlauf	41
4.2. Makroskopie	41
4.3. Ganganalyse	42
4.4. Muskeldurchmesser	45
4.5. Sonographie	46
4.5.1. Sauerstoffsättigung	46
4.5.2. Hämoglobin Threshold	48
4.6. MRT	52
4.7. Histologie	57
4.7.1. HE	57
4.7.2. CD68	60
4.7.3. Caspase-3	63
4.7.4. MPO	65
5. Diskussion	68
5.1. Diskussion der Methoden	68
5.1.1. Kontusionsmodell	68
5.1.2. Ganganalyse	68
5.1.3. Sonographie und Photoakustik	70
5.1.4. MRT	71
5.1.5. Schiebelehre	71
5.1.6. Histologie	71
5.2. Diskussion der Ergebnisse	72
6. Fazit	76
7. Literaturverzeichnis	77
8. Publikationen/ Danksagung	92
8.1. Publikation	92
8.2. Danksagung	92
9. Lebenslauf	94
10. Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µL	Mikroliter
%	Prozent
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AEC	Amino Ethyl Carbazol
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
Av	Average
B-Mode	Brightness modulation
bpm	Beats per minute
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
ctrl	Control, rechtes Hinterbein der Kontrollmäuse
d	Day
d	Durchmesser
dB	Dezibel
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
et al.	Et alteri
EZM	Extrazellularmatrix
Fc-Fragment	Crystallizable fragment

FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HbT	Hämoglobin Threshold
HCL	Chlorwasserstoffsäure/Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIV	Human immunodeficiency virus
HR	Heart rate
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
LED	Light-emitting diodes
LH	Left hind paw
m	Meter
M.	Musculus
med.	Medicinae
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
MPR	Multiplanare Reformation
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid

NF- κ B	Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PAI	Photoakustik Imaging
RF	Radiofrequenz
RH	Right hind paw
ROI	Region of interest
RR	Respiratory rate
s	Sekunde
sDev.	Standard deviation
SEM	Standard Error of the Mean
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SO ₂	Sauerstoffsättigung
Tab.	Tabelle
TH	T-Helferzelle
T-Zelle	Thymus-Zelle
V.	Vena
u.a.	Unter anderem
V	Volumen
vet.	Veterinariae
z.B.	Zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Muskuläre Verletzungen machen einen Großteil der Sport assoziierten Verletzungen aus. Diese sind häufig mit einer vorübergehenden Sportpause verbunden. Um die Ausfallzeit zu reduzieren, werden hierzu in den letzten Jahren zunehmend Infiltrationen des verletzten Muskels mit Präparaten wie Traumeel S® oder Actovegin verwendet. Trotz der häufigen Anwendung in der Sportmedizin gibt es bis dato keine Studien, die die Wirksamkeit von Traumeel untersuchten.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Traumeel in einem standardisierten murinen Muskelkontusionsmodell zu untersuchen. Nach Kontusion des M. gastrocnemius wurden 3µL Traumeel (Versuchsgruppe, n=24) oder 0,9% Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe, n=24) appliziert. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nachuntersucht. Die Mäuse wurden mittels wiederholten Ganganalysen, Magnetresonanztomographie, Sonographie, Photoakustik sowie Umfangsmessungen am Tag des Traumas und am jeweiligen Auswertzeitpunkt (d=1, d=3, d=7 oder d=14) untersucht. Nach definierten Endzeitpunkten (d=1, d=3, d=7 oder d=14) wurden zudem histologische Untersuchungen des Muskels durchgeführt.

Hinsichtlich der Ganganalyse zeigten sich zwischen der Traumeel- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Traumeel-Gruppe konnte eine reaktive Hyperämie und eine induzierte Neoangiogenese nachgewiesen werden. Dies äußerte sich in erhöhten Hämoglobin Threshold-Werten.

Die Magnetresonanztomographie Untersuchungen der hinteren Extremitäten zeigten eine kontinuierliche Verringerung der intramuskulären Flüssigkeitsansammlung von Tag eins bis 14 in beiden Gruppen. In der Traumeel-Gruppe war eine signifikant stärkere Reduktion des Ödems erkennbar.

In der histologischen Untersuchung konnten Muskelfasernekrosen sowie eine perivasale und interstitielle Infiltration mit Immunzellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine starke Neutrophilenreaktion in beiden Gruppen. Außerdem zeigte sich eine größere Anzahl an Makrophagen und eine geringere Apoptoserate bei der Traumeel-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Behandlung mit Traumeel hat einen deutlichen Effekt auf die Ödemresorption und den Hämoglobingehalt im Gewebe. Nichtsdestotrotz ist das Bewegungsmuster in beiden Gruppen vergleichbar.

1. Summary

Muscular injuries account for a large proportion of sports-associated injuries. These are often associated with a temporary break from sport. In recent years, infiltration of the injured muscle with preparations such as Traumeel S® or Actovegin has been increasingly used to reduce downtime. Despite their frequent use in sports medicine, studies on their efficacy remain unclear.

The aim of the present study was to investigate the effect of Traumeel in a standardized murine muscle contusion model. After contusion of the gastrocnemius muscle, 3µL Traumeel (experimental group, n=24) or 0.9% sodium chloride solution (control group, n=24) was applied. The experimental animals were followed up over a period of 14 days. The mice were examined by repeated gait analysis, magnetic resonance imaging, sonography, photoacoustics, and circumferential measurements on the day of trauma and at the time of evaluation (d=1, d=3, d=7 or d=14). Histological examinations of the muscle were performed at defined endpoints (d=1, d=3, d=7 or d=14).

There were no significant differences between the Traumeel and control group with regards to gait analysis.

Reactive hyperemia and induced neoangiogenesis were detected in the Traumeel group. This was demonstrated by elevated hemoglobin threshold values.

Magnetic resonance imaging examinations of the posterior extremities showed a continuous reduction in intramuscular fluid accumulation from day one to 14 in both groups. A significantly greater reduction in edema was seen in the Traumeel group.

Histological examination showed muscle fiber necrosis and perivascular and interstitial infiltration with immune cells. There was a strong neutrophil reaction in both groups. In addition, there was a greater number of macrophages and less apoptosis in the Traumeel group compared to the control group.

Traumeel treatment has a significant effect on edema resorption and hemoglobin content of the tissue. Nevertheless, the movement pattern is similar in both groups.

2. Einleitung

2.1. Muskel

2.1.1. Histologie

Der Mensch besitzt ca. 400 Muskeln, die die Fort- und Gelenkbewegung ermöglichen (AUMÜLLER et al., 2017; BEHRENDTS et al., 2017; BEINER, JOKL, 2001). Anhand der Histologie und weiterer physiologischer Eigenschaften lässt sich Muskelgewebe in drei Typen unterteilen: Die glatte Muskulatur sowie die quergestreifte Muskulatur des Herz- und Skelettmuskels (ULFIG, 2015).

Die Arbeit untersucht die quergestreifte Skelettmuskulatur der Maus. Charakteristisch für die quergestreifte Muskulatur ist die gleichmäßige und parallele Anordnung der dünneren Aktin- und dickeren Myosinfilamente, welche das typische licht- beziehungsweise (bzw.) elektronenmikroskopische Bild einer Querstreifung erzeugen. Die Filamente bilden Myofibrillen (ULFIG, 2015).

Die länglichen Zellen des Muskels werden als Muskelfasern bezeichnet und erreichen eine Länge von bis zu 20cm mit einer Dicke von ca. 40-100µm (AUMÜLLER et al., 2017; ULFIG, 2015). Charakteristisch ist die große Zahl an randständigen Zellkernen, die durch die entwicklungsgeschichtliche Verschmelzung der einkernigen Myoblasten zu einem Synzytium entstanden sind. Die Zellkerne liegen unterhalb des Sarkolemm (ULFIG, 2015).

Die ca. 2,2µm große Funktionseinheit des Muskels wird als Sarkomer bezeichnet und ist definitionsgemäß der Abstand zwischen zwei Z-Streifen (AUMÜLLER et al., 2017). Die zuvor beschriebenen Einheiten entstehen im polarisierten Licht durch eine Doppelbrechung des Lichts an dicken Myosinfilamenten (anisotrop, A-Streifen) sowie durch die Einfachbrechung des Lichtes an dünnen Aktinfilamenten (isotrop, I-Streifen). Die darin liegende anisotrope Linie wird als Z-Streifen bezeichnet und ist Ort der Quervernetzung der Aktinfilamente. Der helle Bereich innerhalb der A-Linie ist der H-Streifen, welcher nur Myosinfilamente enthält. Im restlichen Teil des I-Streifens überlappen sich Aktin- und Myosinfilamente. Mittig im H-Streifen liegt der dunklere M-Streifen, der durch querverbundene Myosinfilamente gebildet wird. Er beinhaltet Proteine, die die Muskelfilamente verbinden. Diese Beobachtungen lassen sich elektronenmikroskopisch nachweisen (BEHRENDTS et al., 2017; ULFIG, 2015).

Neben den morphologischen Charakteristika enthält das Sarkomer regulatorische Proteine wie Tropomyosin, Troponin und Titin. Titin befindet sich zwischen dem Z- und M-Streifen, dient der Elastizität und verhindert eine Überdehnung des Sarkomers (BEHRENDTS et al., 2017; ULFIG, 2015). Weitere funktionswichtige Proteine sind Dystrophin und Spektrin, die für die Dehnbarkeit und Stabilität der Plasmamembran zuständig sind (ULFIG, 2015).

Den bindegewebigen Anteil des Muskels bilden das Epi-, Peri- sowie Endomysium, durch die das Gewebe verschieblich bleibt. Es beinhaltet außerdem Gefäße und Nerven (ULFIG, 2015). Das lockere

Bindegewebe des Epimysiums (Tertiärbündel) verbindet den Muskel mit der straffen äußeren Faszie durch Septen, welche in den Muskel ziehen und ihn dort weiter in die sogenannten Sekundärbündel teilen. Diese Septen werden als Perimysium externum bezeichnet. Vom Sekundärbündel ausgehend strahlen weitere Septen, das Perimysium internum, in den Muskel ein und bilden die Primärbündel. Das Endomysium umhüllt die Muskelfaser direkt mit retikulären Fasern (AUMÜLLER et al., 2017; ULFIG, 2015). Zur Befestigung des Muskels sind die Muskelfasern an Sehnen/Faszien befestigt, welche bei maximaler Belastung Kräften von bis zu 1000kg standhalten können. Aufgrund dessen enthält jede Muskelfaser spezifische Moleküle, die als Integrine und Dystrophin- Glykoproteinkomplexe bezeichnet werden. Diese verbinden den kontraktilen Apparat über das Sarkolemm mit der extrazellulären Matrix (JARVINEN et al., 2005).

2.1.2. Physiologie

Die Skelettmuskulatur gehört zur Willkürmotorik und unterliegt der Aktivierung durch das somatische Nervensystem. Ein efferenter Nerv versorgt über sein Axon die motorische Endplatte und damit eine Muskelfaser. Acetylcholin dient als Neurotransmitter. Ein Axon kann mehrere dieser motorischen Endplatten versorgen. Letztere bestehen definitionsgemäß aus dem Neuron mit Axon und allen dazugehörigen Muskelfasern (AUMÜLLER et al., 2017).

Das Sarkolemm, seinerseits erregbar, leitet die an der postsynaptischen Membran der Muskelfaser entstandenen Aktionspotentiale weiter zu dem transversalen Tubulus-System (BEHRENDTS et al., 2017). Dieses entspricht einer Einfaltung des Sarkolemm und leitet die Erregung in das Innere der Faser. Das longitudinale System dient dagegen als Speicher für Kalzium und entspricht dem sarkoplasmatischen Retikulum. Beide Systeme ermöglichen die elektromechanische Kopplung (AUMÜLLER et al., 2017).

Eine ankommende Erregung führt zur Freisetzung von Kalziumionen aus dem zuvor beschriebenen Speicher der Muskelzelle. Es folgt die Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) über die Aktivierung entsprechender Enzyme und die Konformationsänderung der Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin. Es kommt, der Filament-Gleit-Theorie folgend, zur Brückenbildung zwischen Aktin und Myosin und daraufhin zu einem Ineinandergleiten von Aktin- zwischen Myosinfilamenten. Dies führt über Verkürzung der Faser zur Kontraktion (AUMÜLLER et al., 2017; ULFIG, 2015).

Die Skelettmuskulatur lässt sich anhand funktioneller und physiologischer Gesichtspunkte in rote Haltemuskulatur und weiße Bewegungsmuskulatur unterteilen (AUMÜLLER et al., 2017). Der in der hier vorliegenden Arbeit untersuchte *M. gastrocnemius* zählt beispielsweise (bspw.) zur weißen Bewegungsmuskulatur. Diese zeichnet sich durch schnelle, kurze und kraftvolle Bewegungen aus. Sie enthält vermehrt breitere Typ-II Fasern, weniger Mitochondrien und Myoglobin im Vergleich zur Haltemuskulatur. Die Typ-II Fasern bedienen sich vorwiegend eines glykolytischen Stoffwechsels. Muskeln der weißen Bewegungsmuskulatur können in die anaerobe Stoffwechsellage übergehen. Die Gefäßversorgung

pro motorischer Einheit ist vergleichsweise geringer. Aufgrund einer Neigung zur Atrophie bei Immobilisation ist es nötig, den Muskel regelmäßig zu kräftigen (AUMÜLLER et al., 2017; ULFIG, 2015).

Darüber hinaus lassen sich Muskeln anhand ihrer Fasertypen in Slow-Fasern (Typ I) mit hohem oxidativem Stoffwechsel und den bereits genannten Fast-Fasern (Typ II) unterteilen (AUMÜLLER et al., 2017). Der M. gastrocnemius zählt zu den Schnellkraftmuskeln des Typ II und zeichnet sich dadurch aus, dass er schnell zuckend, rasch ermüdbar ist und viele Mitochondrien enthält (AUMÜLLER et al., 2017). Typ II Fasern lassen sich weiter in Typ IIa und Typ IIb unterteilen. Typ IIa Fasern haben einen höheren Myoglobin- und Mitochondriengehalt und besitzen die Fähigkeit zum glykolytischen oder oxidativen Stoffwechsel. Ihre Ermüdbarkeit lässt sich zwischen die der Typ I und Typ IIb einordnen (BEHRENDTS et al., 2017).

2.1.3. Satellitenzellen

Zellkerne reifer Muskelfasern haben ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren. Als Zellvorrat dienen deshalb Satellitenzellen, die zwischen Sarkolemm und Basalmembran liegen. Aufgrund ihrer Entstehung durch das Zusammenschmelzen von Myoblasten, besitzen sie Stammzellpotenz und ruhen eng anliegend an der Basalmembran (AUMÜLLER et al., 2017; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019). Als Vorläuferzellen der Ontogenese behalten sie ihre Fähigkeit zur Teilung lebenslang bei und dienen der Regeneration bei Atrophie oder Verletzung. Die Kapazität zur Proliferation nimmt mit dem Alter ab. Anzunehmen ist, dass sich die Phasen des Reparaturprozesses mit dem Alter verlangsamen und verschlechtern (AUMÜLLER et al., 2017; JARVINEN et al., 2005). Die Satellitenzellen begrenzen die Regenerationsfähigkeit des quergestreiften Skelettmuskels (ULFIG, 2015).

Im Zuge von Mikrotraumata, Kontusionen sowie Arzneimittel induzierten Schäden, kommt es zu segmentalen Nekrosen mit Schädigungen im umschriebenen Bereich. Solche Schäden führen nicht zu einer Unterbrechung der Basalmembran, weshalb die Regeneration durch die Satellitenzellen innerhalb des Basalmembranschlauches möglich ist. Nach einem vorausgegangenen Trauma wandern Neutrophile und nachfolgend Makrophagen in den Läsionsort ein und räumen entstandene Zelltrümmer ab. Dabei sezernieren Makrophagen Zytokine, welche die Satellitenzellen zur Proliferation anregen. Bereits drei Stunden post Trauma werden die Satellitenzellen an dem Läsionsort aktiviert, wobei das Maximum bei circa (ca.) zwölf Stunden liegt (SRIKUEA et al., 2010). Wichtig ist die sequentielle, zeitlich abgestimmte Einwirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf die Satellitenzellen (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Beispielsweise aktivieren die Faktoren Fibroblast Growth Factor (FGF) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) sowie Insulin-like Growth Factor (IGF) -1 die Satellitenzellen. IGF-1 induziert zudem die Proliferation der Satellitenzellen (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Nach abgeschlossener Aktivierung gehen die Satellitenzellen wieder in den ruhenden Zustand über (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019). Des Weiteren spielen die Faktoren IGF-2 und Transforming

Growth Factor β (TGF- β) eine Rolle. Letzteres reguliert die Myoblasten und hemmt die Proliferation der Satellitenzellen (JARVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Die durch die Proliferation entstandenen Tochterzellen, die Myotuben, schließen sich an intakte Muskelfasern an. Später vereinigen sich diese auch lateral miteinander.

Mikroskopisch lassen sich kürzlich reparierte Fasern an zentralisierten Zellkernen erkennen. Diese verlagern sich später an das Sarkolemm (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019). Bei unvollständiger Fusion entstehen verzweigte Fasern, die hyperplastisch erscheinen (AUMÜLLER et al., 2017). Bei starker Gewebeschädigung wird das ursprüngliche Gewebe durch Bindegewebe ausgetauscht und erscheint als Narbe. Kleinere Schäden des Sarkolemm können unter Zuhilfenahme des Proteins Dysferlin mit Hilfe von Vesikeln verschlossen werden (ULFIG, 2015). Hierbei werden lysosomale Vesikel temporär an der zerstörten Plasmamembran integriert (JARVINEN et al., 2005).

2.2. Regeneration bei Muskelschädigung

2.2.1. Regeneration des Skelettmuskels

Ein direktes Trauma erstreckt sich über den gesamten Querschnitt der einzelnen Faser und bewirkt ein Rupturieren der Basalmembran sowie des Sarkolemm und die segmentale Degeneration von Sarkomeren mit daraus resultierendem Verlust des Membranpotentials (CARLSON, 1973). Im Gegensatz zu Knochengewebe heilt Muskelgewebe nicht durch einen Regenerationsprozess, bei dem das neue Gewebe mit dem vorherigen identisch ist, sondern durch einen Reparaturprozess. Die Heilung folgt, unabhängig der zugrunde liegenden Ursache, einem konstanten Muster (JARVINEN et al., 2005).

Die Schädigung des Muskels durch eine auf ihn einwirkende Kraft lässt sich in zwei Phasen gliedern: Die initiale Phase, hervorgerufen durch die ursprüngliche Verletzung, und die sekundäre Phase, die durch Reaktionsprozesse geprägt ist. Bei der initialen Phase löst die Verletzung bzw. die einwirkende Kraft eine starke Dehnung der Sarkomere aus, die bis zum Riss der enthaltenen Filamente führen kann. Ein erhöhter Kalziumeinstrom löst autodegenerative und proteolytische Reaktionen aus. Es kommt zum Verlust der Faserarchitektur und Schädigung intrazellulärer Strukturen. Die durch die Läsion aus Muskelfasern und Endothelzellen freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren initiieren die Diapedese von Neutrophilen und Makrophagen (JARVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Durch Sezernieren von Nicotinamidadenindinukleotid (NADPH)-Oxidase und Myeloperoxidase durch Neutrophile werden freie Sauerstoffradikale erzeugt. Zum einen zerstören die Radikale nekrotisches Gewebe, zum anderen befeuern sie aber auch den Entzündungsprozess und schädigen gesunde Muskelfasern. Die Konzentration an freien Sauerstoffradikalen nimmt nach ungefähr fünf Tagen ab (SOUZA, GOTTFRIED, 2013).

2.2.1.1. Destruktionsphase

Die erste Phase erstreckt sich vom ersten bis ca. fünften Tag post Trauma (HOTFIEL et al., 2016). Zu Beginn rupturieren und nekrotisieren die Fasern. Es finden vor allem nekrotische Prozesse statt, wobei Proteinase auf die extrazelluläre Matrix (EZM) wirken. Falls im Zuge des Traumas Gefäße zerstört wurden, bildet sich ein Hämatom. Zunächst ist die Basalmembran intakt und es befinden sich wenig Phagozyten in der Muskelfaser (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Innerhalb von ein bis zwei Tagen werden kapillarnahen Muskelfasern von Phagozyten infiltriert, das Sarkoplasma degeneriert und wird von Phagozyten abgebaut. Areale, welche weit von der Blutversorgung entfernt lokalisiert sind, nekrotisieren. Die Degeneration des Sarkoplasmas erfolgt ohne Phagozytose und dauert Tage bis Wochen (CARLSON, 1973). Zu Beginn der Destruktionsphase überwiegen vor allem Neutrophile, wobei nach zwei Tagen die Anzahl der phasentypischen Makrophagen-Subtypen steigt (CARLSON, 1973; JÄRVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

Im Zuge des Traumas wandern Makrophagen aus Kapillaren oder dem Epi-/Perimysium ein. Die früh eindringenden, proinflammatorischen M1-Makrophagen entfernen die durch das Trauma verursachten Ablagerungen und exprimieren T-Helferzellen-1 (TH-1) Zytokine. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung von Satellitenzellen. Sie ähneln den Neutrophilen und tragen zu Phagozytose und Entzündungsreaktion bei. Anschließend wandern die entzündungshemmenden M2-Makrophagen ein, fördern die Gewebereparatur und mindern die Entzündungsreaktion. Sie produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Makrophagen sind ab dem zweiten Tag post Trauma vermehrt anzutreffen (SOUZA, GOTTFRIED, 2013; TIDBALL, 2011).

Des Weiteren werden proinflammatorische Zytokine und vasoaktive Substanzen von der Muskelfaser selbst ausgeschüttet. Dadurch kommt es zur weiteren Aktivierung von Immunzellen, die ihrerseits die Entzündungsreaktion durch Enzyme und Zytokine weiter unterhalten und durch ausgeschüttete Sauerstoffradikale lokal zusätzliche Strukturen schädigen (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

2.2.1.2. Reparaturphase

Die Reparaturphase vereint die Phagozytose, Regeneration und Bildung der Bindegewebsnarbe sowie das Kapillarwachstum im verletzten Bereich. Die vorab entstandene Brücke aus Bindegewebe wird stabilisiert. Der Prozess erstreckt sich in etwa vom fünften bis zehnten Tag nach Verletzung und überschneidet sich mit der Destruktionsphase (HOTFIEL et al., 2016; JÄRVINEN et al., 2005). Zeitgleich zu einwandernden Phagozyten lassen sich Myoblasten zwischen Basalmembran und Muskelfaser erkennen. Das Maximum der Konzentration an Myoblasten liegt 48 bis 72 Stunden post Trauma. Anschließend entstehen durch eine Fusion der Myoblasten die Myotuben, die sich mit dem unverletzten Teil der beschädigten Muskelfasern verbinden (JÄRVINEN et al., 2005; MINAI, YELIN, 2022). Die

Qualität, Struktur und Funktion des gesunden Muskels werden in dieser Phase jedoch noch nicht wiederhergestellt (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

Bei der Regeneration der EZM spielt vor allem die Bildung von Kollagen eine wichtige Rolle. Dieses weist in der Reparaturphase eine andere Zusammensetzung auf, welche anschließend in der Remodulationsphase korrigiert wird und dann der des gesunden Muskels entspricht. Schon nach 48 Stunden wandern Fibroblasten ein. Damit beginnt die Bildung der EZM vor der eigentlichen Regeneration der Fasern. Dies dient dazu, eine mechanische Stabilität am Verletzungsort zu erzeugen. Das Gewebe weist durch Regulatorproteine eine gute Kontraktilität auf, wodurch die Narbe verkleinert werden kann (JARVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Problematisch ist die überschießende Narbenbildung, welche diverse Regenerationsprozesse behindert und auch eine mechanische Barriere im Regenerationsprozess darstellt. Ausgelöst wird sie bspw. durch Einblutung, Entzündung und schlechte Revaskularisierung oder Rupturen der Fasern (JARVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

Ein weiterer zentraler Prozess ist die Neoangiogenese, welche die Regeneration der Faser und Bildung von Narbengewebe erst ermöglicht. Anzunehmen ist, dass diese Prozesse ab dem dritten bis neunten Tag post Schädigung ablaufen. Das in der EZM gebildete Fibronectin aktiviert die Einwanderung von Endothelzellen, welche zu einer Neovaskularisierung führen können (BENTZINGER et al., 2013; JARVINEN et al., 2005). Ferner fördern frei gewordene Wachstumsfaktoren und Zytokine die Revaskularisierung, die in der Peripherie der Verletzung beginnt und nach zentral fortschreitet. Initial bedient sich die verletzte Muskelfaser eines durch den Kapillar- und Mitochondrienuntergang bedingten anaeroben Stoffwechsels. Durch die Revaskularisierung wird nun zunehmend ein aerober Stoffwechsel sichergestellt (JARVINEN et al., 2005). Ein ebenso wichtiger Prozess ist die Reinnervation. Zwar läuft die Regeneration auch ohne nervale Innervation ab, jedoch sollte der Muskel reinnerviert werden, um möglicher Muskelatrophie vorzubeugen (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

2.2.1.3. Remodeling

In der sogenannten „Remodeling-Phase“ finden die Kontraktion und Reorganisation des Narbengewebes, die Reifung der regenerierten Fasern und somit das Wiedererlangen der Funktionsfähigkeit statt (CALVI et al., 2022; JARVINEN et al., 2005). Die regenerierten Fasern verbinden sich über eine End-zu-End-Verbindung miteinander und bilden neue musklotendinöse Einheiten zwischen den Fasern aus (HOTFIEL et al., 2016; JARVINEN et al., 2005). Ziel ist es, die Stabilität und Qualität eines gesunden Muskels zu erhalten, was oft erst nach Wochen erreicht wird (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Die beiden letzten Phasen der Reparatur und des Remodelings finden überlappend statt.

2.3. Posttraumatisches Ödem

Klinisch lässt sich nach einem Trauma ein Ödem nachweisen. Die Herausforderung hierbei ist, die Ätiologie zu klassifizieren. Zu unterscheiden sind Hämatome, Serome, postthrombotische sowie lymphostatische Ödeme (HIRSCH, WAHL, 2017).

Pathophysiologisch entstehen Ödeme durch ein Ungleichgewicht zwischen extravasaler Flüssigkeit sowie der Kapazität zum Abtransport durch das Lymphsystem. Ödeme sind Ansammlungen von hydrophoben Lipiden, Proteinen, Zellen und überschüssiger Gewebeflüssigkeit, die nicht über das venöse System abtransportiert werden können (FÖLDI, 2015; KASSEROLLER, 1999). Der genaue Pathomechanismus des posttraumatischen Ödems der unteren Gliedmaße ist weitgehend unbekannt. Im Unterschied zu chronisch-venöser oder lymphatischer Insuffizienz entwickelt es sich unmittelbar nach Trauma. Posttraumatische Ödeme entstehen nach Kontusion, postoperativ oder auch aufgrund von Frakturen mit mechanisch einwirkenden Kräften und können klinisch bei über 25% der Patienten nach Trauma beobachtet werden (HIRSCH, WAHL, 2017).

Extravasale Flüssigkeit wird mittels blind endender Lymphkapillare resorbiert und mit Hilfe der Muskelpumpe und Venenklappen abtransportiert. Die Lymphe gelangt anschließend über Präkolektoren weiter über Lymphkolektoren zum Ductus thoracicus sowie Ductus lymphaticus dexter. Als gemeinsame Endstation dient die V. cava superior. Bei einem Muskelschaden entfällt die Muskelpumpe, Blutgefäße sowie Lymphsysteme sind geschädigt, das Gleichgewicht ist zerstört. Je nach Ätiologie besitzt die Ödemflüssigkeit einen hohen Anteil an Proteinen und birgt langfristig die Gefahr der Fibrosierung und Sklerosierung durch aktivierte Fibroblasten (HIRSCH, WAHL, 2017; KASSEROLLER, 1999; WAŚKO et al., 2016).

Ist die Hauttemperatur erhöht und die Läsionsstelle druckdolent und gerötet, lässt sich am ehesten auf eine entzündliche Genese schließen, die aus der Kombination von Gewebeschädigung sowie venöser und lymphatischer Insuffizienz entsteht (MAJEWSKI-SCHRAGE, SNYDER, 2016; SZCZESNY, OLSZEWSKI, 2003). Als Reaktion auf ein Trauma kommt es zur Hyperämie. Es werden Zytokine und Wachstumshormone, Immunglobuline, Komplement- und Gerinnungsfaktoren sowie hämatopoetische Zellen freigesetzt, die die interstitielle Ödembildung bedingen und das Ödem weiter unterhalten. Meist sind posttraumatische Ödeme mit Hämatomen vergesellschaftet, befinden sich an der Läsionsstelle und verheilen innerhalb von mehreren Wochen (HIRSCH, WAHL, 2017). Die Blutung als Akutreaktion auf ein Trauma verursacht eine Störung der Hämostase. Physiologisch reagiert der Organismus mit Vasoconstriktion und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Nach Wiederherstellung der Hämostase beginnt die Entzündungsreaktion mit Gefäßerweiterung und Anstieg der Permeabilität sowie Rekrutierung von

Leukozyten. Die Entzündungsmediatoren erhöhen die vaskuläre Permeabilität. Die intravaskuläre Flüssigkeit und zelluläre Komponenten gelangen nach extravasal und bedingen das Ödem, das durch das Lymphsystem abtransportiert werden soll.

Das intramuskuläre Ödem reduziert die Durchblutung und mindert aufgrund des erhöhten Abstands zwischen Kapillaren und Zellen die Sauerstoffversorgung (MAJEWSKI-SCHRAGE, SNYDER, 2016). Die negative Beeinflussung der Hypoxie auf den Stoffwechsel hat einen zellulären Verlust an Wasser zur Folge, der das Ödem zusätzlich mit intrazellulärer Flüssigkeit speist. Als weitere Folge ist eine interstitielle Druckerhöhung zu beobachten, der eine Vasokonstriktion der Kapillaren und damit verbunden ein gestörter Blutabfluss folgt (SZCZESNY, OLSZEWSKI, 2003). Die Schwellung verhindert eine adäquate Heilung und fördert das Entstehen von Infektionen (MAJEWSKI-SCHRAGE, SNYDER, 2016; THORDARSON et al., 1997). Anoxie und weiterer Zelltod sind die Konsequenz (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018; THORSSON et al., 1998).

Therapeutisch kommt die Kompressionstherapie zum Einsatz, um das unmittelbar posttraumatische Hämatom zu minimieren. Zahlreiche Studien untersuchen die Wirkung von unterschiedlichen Medikamenten. Bisweilen gibt es keine adäquate medikamentöse Therapie (KASSEROLLER, 1999; SZCZESNY, OLSZEWSKI, 2003; WAŚKO et al., 2016).

2.4. Regeneration bei Muskelkontusion im Tiermodell

Aufgrund der wenigen kontrollierten klinischen Studien zur Behandlung von Muskeltraumata, haben Tierversuche zu Muskelkontusionen dazu beigetragen, den Heilungsprozess bei Kontusionsverletzungen zu untersuchen. Dieser besteht aus Muskelreparatur, Regeneration und Bildung eines Narbengewebes (ANDERSON et al., 2001; FORCINA et al., 2020; JARVINEN et al., 2005).

Im Tiermodell können vier histologische Zonen unterschieden werden: die zentrale Zone, die Regenerationszone, die Überlebenszone sowie die den Schaden bedeckende, so genannte fibröse Kappe (HURME et al., 1991).

Im Zuge einer Muskelkontusion wird die Kontinuität zwischen Muskeln und Bindegewebe unterbrochen. Das sich nach der Kontusion gebildete, zwischen der Lücke der sich kontrahierten Muskelfasern befindliche Hämatom formt eine Höhle im geschädigten Muskel, welche mit Granulationsgewebe aufgefüllt wird. Diese Vorgänge finden in der zentralen Zone der Kontusionsstelle statt. Proximal und distal wird die zentrale Zone von der sogenannten Regenerationszone begrenzt (HURME et al., 1991;

JARVINEN, SORVARI, 1975). In den ersten Tagen findet die Infiltration des Fibrins bzw. Hämatompfropfes durch Entzündungszellen statt. Am Tag zwei enthält die zentrale Zone bereits Fibrinstränge. Im Verlauf des fünften Tages entsteht Granulationsgewebe aus Fibroblasten und Desmin-positiven Zellen. Neutrophile sind kaum mehr nachzuweisen (HURME et al., 1991). Die Zahl der Makrophagen hingegen steigt. Die zentrale Zone wird schmaler, die Bindegewebsmatrix dicker und ab Tag sieben sind keine Entzündungszellen, jedoch vermehrt Fibroblasten und Kollagen erkennbar. Die zuvor beschriebene Lücke ist fast vollständig kontrahiert (HURME et al., 1991).

Die Regenerationszone entspricht dem unbeschadeten Muskelanteil, von welchem die Defektsanierung ausgeht. Es entstehen Zylinder der Basallamina als Leitgerüst für die Satellitenzellen zur Generierung neuer Muskelfasern. Die Zylinder der Basallamina enthalten Makrophagen, die am Tag zwei bereits fast jegliche nekrotische Muskelanteile phagozytiert haben (HURME et al., 1991; JARVINEN et al., 2005). Nach drei bis vier Tagen beginnen sich Myofibrillen zu generieren und fusionieren. Es werden muskelspezifische Proteine gebildet und die reife Muskelfaser mit peripheren Nuklei entsteht. Die Basallamina bildet Zylinder, welche mit regenerierten Muskelzellen bis zur zentralen Zone aufgefüllt werden. Neue Fasern lagern sich parallel an gesunde Fasern an. Nach etwa sieben Tagen hat sich eine neue Basallamina konfiguriert und die Membranzylinder sind fast vollständig mit neuen Fasern aufgefüllt. Von den Myotuben ausgehend ragen Pseudopodien in das Granulationsgewebe (HURME et al., 1991).

Die Überlebenszone enthält den gesunden Anteil des Muskels und ist durch eine makrophagenfernhaltende Membran von den nekrotisierenden Teilen der Regenerationszone getrennt. Die Nekrosezone erstreckt sich von Kontraktionsband zu Kontraktionsband. Diese dienen als „fire doors“ und begrenzen die Nekrosezone in ihrer Ausbreitung (HURME et al., 1991). Nach 14 Tagen hat sich eine frische Bindegewebsnarbe gebildet. Das Bindegewebe besitzt die gleiche Ausrichtung wie die unbeschadeten Muskelfasern und eine deutlichere Querstreifung.

Im Tiermodell ist der Muskel nach ca. zwei Wochen weitestgehend geheilt. Bei jungen Mäusen regenerieren sich Muskelfasern, Fibroblasten sowie Endothelzellen innerhalb von 21 Tagen. Es ist unklar, ob oder inwiefern die Heilung im menschlichen Muskel abweicht. Oftmals wochenlang andauernde klinische Symptome stützen die Annahme eines längeren Heilungsprozesses (ALMEKINDERS, 1999; HARDY et al., 2016).

Das Verstehen des Heilungsprozesses ermöglicht das Entwickeln neuer biologischer Ansätze zur verbesserten Regeneration des Muskels nach Trauma sowie eine verbesserte Wiederherstellung der Funktionalität (BEINER, JOKL, 2001).

2.5. Muskelkontusionsmodelle

Um ein Muskeltrauma zu etablieren, können verschiedene Modelle angewendet werden. Hierbei kommen neben der Muskelkontusion myotoxische Substanzen wie Notexin oder Cardiotoxin, Chemikalien wie Bariumchlorid und physikalische Verfahren wie Frostverletzung, Denervierung oder Transplantation zum Einsatz (HARDY et al., 2016).

Häufig wird ein stumpfes, nicht durchdringendes Kontusionsmodell verwendet. Der Aufprall wird durch ein Metallgewicht erzeugt, das durch ein Führungsrohr fallen gelassen wird. Die auf den Muskelbauch einwirkende Gewichtskraft wird so übertragen und freigesetzt (AMBROSIO et al., 2010; CRISCO et al., 1996; PUNTEL et al., 2011; SOUZA, GOTTFRIED, 2013). Die einzelnen Studien, die ein Modell mit stumpfem Aufprall verwendet haben, unterscheiden sich vor Allem in der Auswahl der Gewichte sowie Größen der zur Kontusion benutzten Massen. Es zeigte sich, dass eine flache Form des Kontusionsgewichts eine gleichmäßige, reproduzierbare Muskelverletzung erzeugt und das Gewicht gleichmäßig auf die Aufprallfläche verteilt (SOUZA, GOTTFRIED, 2013).

Bei einem invasiveren Modell wird der zu untersuchende Muskelbauch chirurgisch freigelegt und anschließend gequetscht und so eine Verletzung erzeugt (GHALY, MARSH, 2010; SOUZA, GOTTFRIED, 2013; WINKLER et al., 2011).

Entsprechend der Häufigkeit der Lokalisation beim Menschen, wurden die Kontusionen auf die untere Extremität der Tiere gesetzt, wobei der M. gastrocnemius am häufigsten verwendet wird (CRISCO et al., 1996; JARVINEN et al., 2005; KARY, 2010; PUNTEL et al., 2011; RANTANEN et al., 1999; SHU et al., 2012; SOUZA, GOTTFRIED, 2013; THORSSON et al., 1998). Grund hierfür sind unter anderem seine oberflächliche Lage sowie die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Fasertypen (SOUZA, GOTTFRIED, 2013; ZIMOWSKA et al., 2009).

2.6. Muskelkontusionen

2.6.1. Allgemein

Die durch sportliche Aktivitäten ausgelösten Muskelverletzungen des Erwachsenen entstehen vor allem durch Kontusionen sowie Zerrungen und Muskelrisse (RIEL, 2012). Verletzungen der Skelettmuskulatur machen 10-55% der Sportverletzungen im Leistungs- und Freizeitbereich aus. Von diesen sind mehr als 90% aller sportbedingten Verletzungen Kontusionsverletzungen (HOTFIEL et al., 2016; JARVINEN et al., 2005). Die häufigsten Verletzungen finden sich Nahe der Sehnenverbindungen. In der Mehrzahl der Fälle umfasst die betroffene Muskulatur die Adduktorengruppe, die ischiokrurale

Muskulatur sowie den M. quadriceps femoris und M. gastrocnemius (HOTFIEL et al., 2016; PALERMI et al., 2021).

Eine Kontusion ist die Folge einer stumpfen Gewalteinwirkung, ausgelöst durch Kontaktsportarten sowie Schlag- oder Hiebverletzungen, als auch durch Stürze. Kontusionen weisen die beste Muskelregenerationsrate unter den Muskelverletzungen auf (HENNE-BRUNS, BARTH, 2012; JARVINEN et al., 2005). Bei der einwirkenden Kraft handelt es sich um eine schnelle Druckkraft (JARVINEN et al., 2005). Typischerweise wird der Muskel durch die auftretende Kraft auf den darunter liegenden Knochen gepresst (ANDERSON et al., 2001). Darüber hinaus können Kontusionen auch durch einen durchdringenden Schlag gegen einen Muskelbauch entstehen, was im Allgemeinen zu einem Hämatom innerhalb des Muskels führt (ALMEKINDERS, 1999; KARY, 2010). Meist sind Kontusionen im Rahmen von Sportverletzungen am Becken oder hüftnah am Oberschenkel lokalisiert (RIEL, 2012).

Der Schweregrad der Verletzung hängt vom Aufprallort, der Aktivität des beteiligten Muskels, dem Alter des Patienten und des Erschöpfungsgrades des selbigen ab (BEINER, JOKL, 2001). Im Falle eines entspannten Muskels befinden sich die Verletzungen knochennäher. Infolgedessen kann der Knochen miteinbezogen werden und die Aufprallreaktion verstärken. Kontrahierte Muskeln wirken dementsprechend als Schutzmechanismus (CRISCO et al., 1996; RIEL, 2012), da hier der Aufpralldruck durch die einzelnen Schichten des Muskels abgefangen wird, bis der Muskel gegen die Oberfläche des Knochens komprimiert wird (JARVINEN et al., 2005).

2.6.2. Einteilung

Muskelverletzungen werden in direkte und indirekte Schäden eingeteilt. Unter diesem Aspekt werden die Kontusionen zur direkten, akuten Verletzung gezählt (RIEL, 2012). Es werden drei Grade der Muskelverletzungen unterschieden: Der erste Grad beinhaltet die Zerrung/den Riss einer kleinen Anzahl von Fasern, was funktionell kaum spürbar ist. Die Faszie bleibt in diesem Zusammenhang intakt. Ganz im Unterschied zum zweiten Grad, bei welchem die Faszie gerissen und eine Muskellücke tastbar ist. Die Funktion sowie die Kontraktionsfähigkeit sind eingeschränkt. Der dritte Grad ist definiert durch einen kompletten Riss und Funktionsverlust (JARVINEN et al., 2005; RIEL, 2012). Infolge des Traumas zerreißt intramuskuläre Blutgefäße und Lymphbahnen. Folglich entsteht entweder epi- oder subfaszial bzw. intra- oder intermuskulär aber auch subperiostal und subkutan ein Hämatom oder/und Schwellungen. Der Grad der Muskelverletzung bestimmt das klinische Bild maßgeblich (JARVINEN et al., 2005; MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018). Bei einem intramuskulären Hämatom kommt es zur Extravasation des Blutes innerhalb einer intakten Muskelfaszie und infolgedessen zu einem erhöhten intramuskulären Druck. Dieser komprimiert und begrenzt das Hämatom. Im Gegensatz dazu entsteht bei gerissener Faszie ein intermuskuläres Hämatom, wobei sich das Blut über die gesamte Fläche ausbreiten kann. Es kommt zu keiner signifikanten intramuskulären Druckerhöhung (JARVINEN et al., 2005). Im Rahmen

von Hämatomen entstandene, schwerwiegende Folgen wären bspw. Nervenkompressionen und dadurch bedingt weitere Funktionsausfälle (ANDERSON et al., 2001).

2.6.3. Symptome

Die Symptome sind unterschiedlich und unspezifisch. Allgemein entstehen bewegungsabhängige Schmerzen und Einschränkungen im Bewegungsausmaß (JARVINEN et al., 2005). Hämatome führen zu Druckempfindlichkeit, Muskelkrämpfen und Nervenkompressionen (MÜLLER-WOHLFAHRT et al., 2018).

2.6.4. Diagnostik

Diagnostische Mittel sind neben der Anamnese und klinischen Untersuchung mit Kontraktionsprüfung heutzutage vor allem neuere Methoden wie Ultraschall und Kernspintomographie, die zunehmend an Bedeutung gewinnen. Sie ermöglichen das Abschätzen des Ausmaßes der Verletzung und können die Verletzungsstelle gegen andere Strukturen abgrenzen (ANDERSON et al., 2001; BEINER, JOKL, 2001; RIEL, 2012). In der Regel ist bei den meisten Verletzungen eine klinische Untersuchung ausreichend. Ist eine genauere Charakterisierung notwendig, kommt die Sonographie zum Einsatz. Sie ermöglicht das Darstellen und Abschätzen von Hämatomen sowie das Erkennen von Rupturen, Fibrosen und einer Myositis ossificans. Zur Diagnose eines Hämatoms liegt der optimale Zeitpunkt der Untersuchung zwischen zwei bis 48 Stunden. Zuvor ist die Bildung eines Hämatoms nicht möglich und nach 48 Stunden breitet sich das Hämatom des Muskels aus (PEETRONIS, 2002). Bei deutlicher Diskrepanz zwischen Symptomen und Diagnostik oder bei Verletzungen in Nähe der Leistengegend wird häufig die weiterführende Diagnostik mittels Magnetresonanztomographie (MRT) genutzt. Hierdurch können Hämatome, Ödeme und Läsionen sehr sensitiv diagnostiziert werden (HOTFIEL et al., 2016; JARVINEN et al., 2005).

2.6.5. Therapie der Kontusion

Der Großteil behandlungsbedürftiger Muskelkontusionen wird konservativ therapiert. Operationsindikationen bestehen selten und sind meist bei offenen Verletzungen oder großen Muskelbündelrissen indiziert (ANDERSON et al., 2001; JARVINEN et al., 2005; RIEL, 2012).

Ziele der konservativen Therapie sind neben Schmerzbekämpfung, Blutstillung und Entzündungshemmung die Beseitigung des Bewegungsverlustes sowie die Verbesserung der Kraft, Flexibilität, Ausdauer und Kondition bis zur Wiederaufnahme des Sports oder alltäglichen Belastungen (RIEL, 2012).

Die initiale Behandlung einer Kontusion richtet sich nach dem allgemeinen „RICE Prinzip“: „Rest, Ice, Compression, Elevation“ (DRAPER et al., 2020; JARVINEN et al., 2005). Allerdings fehlen große prospektiv randomisierte Studien, die eine Wirksamkeit des RICE-Schemas belegen. Es herrscht auch

Uneinigkeit zwischen den Autoren bezüglich Immobilisation oder Mobilisation in der Frühphase nach Verletzung (HOTFIEL et al., 2016).

Die frühe Anwendung einer Kryotherapie führt zu einer signifikanten Reduktion des Hämatoms sowie geringerer Entzündung und beschleunigter Regeneration. Das Anheben der verletzten Extremität über Herzniveau dient der Verringerung des hydrostatischen Drucks und damit einer Verringerung von interstitieller Flüssigkeit (JARVINEN et al., 2005). Eine Kompression des verletzten Muskels wirkt ebenfalls gegen die Bildung eines Hämatoms und die damit einhergehende Schwellung. Gehhilfen und Tape-Verbände zur Entlastung sowie eine kurze, frühzeitige Immobilisation stellen eine weitere Therapieoption dar (ANDERSON et al., 2001; RIEL, 2012). Letztere führt zu einem schnelleren und intensiveren Einwachsen von Kapillaren im Bereich des verletzten Muskels, was wiederum zu einer verbesserten Heilung und Regeneration führt. Weiter wurde gezeigt, dass ein ruhig gestellter Muskel eine geringere Bindegewebsnarbe aufweist, wodurch das Eindringen von Muskelfasern weniger behindert wird und sich die Muskelstümpfe weniger weit zurückziehen. Außerdem tritt eine geringere Anzahl an Rerupturen auf, da die Immobilisierung das Granulationsgewebe mit mehr Zugfestigkeit versorgt. Jedoch sollte die Dauer der Ruhephasen kurz gehalten werden, da eine aktive Mobilisierung eine schnellere Rückkehr der biomechanischen Stärke auf das Niveau des unverletzten Muskels erzielt. Daneben führt eine zu lange Immobilisation zur Muskelatrophie der gesunden Muskelfasern und sollte sich daher nur auf die akute Phase in den ersten Tagen nach der Verletzung beschränken (JARVINEN et al., 2005).

Die aktive Mobilisierung sollte in den ersten drei bis sieben Tagen nach der Verletzung zunächst vorsichtig begonnen werden, um zu verhindern, dass der verletzte Muskel sich zu sehr dehnt und die heilenden Muskelfasern auseinanderzieht (JARVINEN et al., 2005). Nach dieser sogenannten relativen Immobilisierung sollte die Rückkehr zur vollen Aktivität innerhalb der individuellen Schmerzgrenzen des Patienten stattfinden. Der optimale Zeitpunkt ist, sobald der normale Kraft- und Bewegungsumfang zurückerlangt wurden. Die durchschnittliche Dauer bis zum Erreichen dieses Fortschrittes beträgt drei Wochen (ANDERSON et al., 2001). Das Training wird bei Schmerzfreiheit des Patienten langsam gesteigert und zunächst ohne, später mit Last, begonnen. Übungen sollten im zuvor durch Wärme entspannten und gedehnten Muskel durchgeführt werden (JARVINEN et al., 2005).

Medikamentös dienen häufig Antiphlogistika und Analgetika als Mittel der Wahl (RIEL, 2012). Unter anderem wurde experimentell gezeigt, dass Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in der frühen Phase der Heilung zu einer Abnahme der Entzündungsreaktion führen, ohne den Heilungsprozess, die Muskelfaserregeneration oder die Satellitenzellen negativ zu beeinträchtigen. Die Zugfestigkeit und Kontraktionsfähigkeit werden unter der Therapie nicht eingeschränkt. Die Behandlung sollte sich allerdings nur auf die frühe Phase beziehen, da sie sonst die Regeneration verringert (JARVINEN et al., 2005; THORSSON et al., 1998). Im Rahmen der medikamentös bedingten Schmerzlinderung besteht

die Gefahr, dass der Patient seine Belastung zu früh steigert, wodurch Rerupturen entstehen (HOTFIEL et al., 2016).

Umgekehrt scheinen Kortikosteroide die Eliminierung des Hämatoms sowie des nekrotischen Gewebes zu verzögern. Abgesehen davon sei zu erwähnen, dass die Kortikosteroidbehandlung die biomechanische Kraft zu verringern scheint (HOTFIEL et al., 2016; JARVINEN et al., 2005). Studien, in denen ein anaboles Steroid verwendet wurde, zeigten, dass bei langfristiger Therapie leistungsfähigere Versuchstiere im Vergleich zur Kontrolltieren beobachtet wurden. Bei kurzzeitiger Therapie mit Kortikosteroiden zeigte sich ein positiver Effekt, jedoch wird langfristig die normale Muskelregenerationskaskade im Tiermodell gehemmt (BEINER et al., 1999).

Hochfrequenter Ultraschall (0,8-3 MHz) wies in experimentellen Studien einen positiven Effekt auf Schmerzlinderung, Perfusion, Inflammation und die Proliferationsphase, jedoch keinen positiven muskelheilungsfördernden Effekt auf (HOTFIEL et al., 2016; JARVINEN et al., 2005). Die hyperbare Sauerstofftherapie verursachte experimentell eine Beschleunigung in der Muskelregeneration, vornehmlich in der frühen Phase (JARVINEN et al., 2005). Die Therapie mit reaktiven Sauerstoffspezies erhöhte die Bildung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen. Unter anderem waren die Kollagenbildung, Angiogenese und die Zahl an Satellitenzellen erhöht (YAMAMOTO et al., 2020).

Auch wenn die Behandlung von Muskelverletzungen zu guten funktionellen Ergebnissen führt, können die Folgen einer fehlgeschlagenen Therapie dramatisch sein und einen wochen- oder monatelangen Ausfall des Patienten in seinen gewohnten Aktivitäten bedingen (JARVINEN et al., 2005). In diesem Sinne ist es nötig, die Behandlungsoptionen stets zu optimieren. Eine frühe Diagnosestellung sowie eine adäquate Therapie und ein idealer Zeitpunkt der Aufnahme der gewohnten sportlichen Betätigung sind Voraussetzung für einen bestmöglichen und unkomplizierten Heilungsprozess (HOTFIEL et al., 2016).

Jüngste Versuche zur Beschleunigung und Verbesserung der Muskelheilung beinhalten den Gebrauch von Wachstumsfaktoren, Gentherapie und Stammzelltherapie. Als eine weitere Therapieform werden Punktionen am Verletzungsort eingesetzt. Angewandt werden sie, um Hämatome zu entlasten. In gleicher Art und Weise können so auch Medikamente unterstützend injiziert werden. Neben Glukokortikoiden kommen weitere Substanzen wie Platelet-Rich-Plasma, Actovegin oder Traumeel S® (Traumeel) zum Einsatz.

Die Anwendung von Platelet-Rich-Plasma wurde in vielen Studien untersucht und kommt zunehmend klinisch zum Einsatz (ARUMUGAM et al., 2021; DALEY et al., 2021; WU et al., 2021). Die Thrombozyten des Platelet-Rich-Plasma werden autolog mittels Zentrifugation aus dem Blut des Patienten extrahiert und dem Patienten injiziert (ARUMUGAM et al., 2021; MORAES et al., 2013). Durch die

Wachstumsfaktoren aus den alpha-Granula der Thrombozyten sollen die Heilungsprozesse des Muskels gesteigert und unter anderem die Mitogenese und Angiogenese gefördert werden (DOS SANTOS et al., 2021; HUSSAIN et al., 2017; MARTINS et al., 2016; MORAES et al., 2013). Die Platelet-Rich-Plasma-Therapie moduliert oxidativen Schaden im Skelettmuskel (MARTINS et al., 2016). So kann mittels Platelet-Rich-Plasma-Injektion die Rückkehr zum Sport nach Muskelzerrung verkürzt und die Rezidivrate gesenkt werden (ARUMUGAM et al., 2021; TRUNZ et al., 2022).

Actovegin wird aus dem Blut von Kälbern gewonnen und anschließend deproteiniert. Es handelt sich dabei um ein Ultrafiltrat. Aufgrund der gegenwärtig fehlenden Datenlage können noch keine Aussagen bezüglich der Wirksamkeit, des Pathomechanismus und der Wirkung auf die Regeneration getroffen werden (HOTFIEL et al., 2016).

2.7 Traumeel S®

2.7.1. Allgemein

Einen weiteren Wirkstoff, welcher intramuskulär injiziert werden kann, stellt Traumeel S® (Heel GmbH, Baden-Baden, Deutschland) dar. Das Präparat zählt zu den homöopathischen Heilmitteln (GRECH, 2018; MCCAFFREY et al., 2007), ist allerdings in seiner Wirkungsweise bis dato nur in einzelnen Studien untersucht. Somit können bis zum heutigen Tag keine konkreten Aussagen über den Wirkmechanismus getroffen werden (POROZOV et al., 2004).

Dem Medikament werden eine Schmerzlinderung und eine Reduktion der Inflammation bei akuten Verletzungen zugeschrieben. Hierbei wurde das Medikament hinsichtlich der Wirksamkeit mit NSAIDs verglichen (EHLERT, MAJJHOO, 2019; SCHNEIDER, 2011).

Traumeel S® kann als Tabletten, Tropfen, Injektionslösungen, Salben oder Gel appliziert werden (GRECH, 2018; SCHNEIDER, 2011). In der hier vorliegenden Arbeit wurden Injektionslösungen verwendet.

2.7.2. Inhaltsstoffe

Die Inhaltsstoffe des Kombinationspräparates sind biologischen, pflanzlichen und mineralischen Ursprungs und werden seit Jahren therapeutisch verwendet und setzen sich wie folgt zusammen:

Inhaltsstoff	Konzentration pro 2,2ml Ampulle
Achillea millefolium (Schafgarbe)	0,0022µL
Aconitum napellus (Blauer Eisenhut)	0,0132µL
Arnica montana (Bergwohlverleih)	0,022µL
Atropa belladonna (schwarze Tollkirsche)	0,022µL
Bellis perennis (Gänseblümchen)	0,011µL
Calendula officinalis (Ringelblume)	0,022µL
Matricaria recuita (Echte Kamille)	0,0022µL
Echinacea angustifolia (Sonnenhut)	0,0055µL
Echinacea purpurea (Purpur-Sonnenhut)	0,0055µL
Hamamelis virginiana (Virginische Zaubernuss)	0,022µL
Calcium sulphide (Calciumsulfid)	0,0000022µL
Hypericum perforatum (Echtes Johanniskraut)	0,0066µL
Mercurius solubilis Hahnemanni	0,000001µL
Symphytum officinale (echter Beinwell)	0,0000022µL
Hilfsstoffe	0,9% NaCl

Tab. 1: Inhaltsstoffe Traumeel Copyright © Biologische Heilmittel Heel GmbH (GRECH, 2018; SCHNEIDER, 2011)

2.7.3. Nebenwirkung

Nebenwirkungen wie erhöhter Speichelfluss sowie allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock sind bekannt. Dies sei vor allem den Inhaltsstoffen Mercurius solubilis, Echinacea, und Arnica geschuldet (HEEL GMBH, 2016). Nebenwirkungen treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,0035% auf und zeigen sich fast ausschließlich nach der Verwendung von Injektionen. Es können Schmerzen, Schwellung und Rötung an der Injektionsstelle auftreten (SINGER et al., 2010). Des Weiteren wird auf eine „Erstverschlimmerung“ im Zuge der Anwendung homöopathischer Mittel hingewiesen (HEEL GMBH, 2016). Kontraindikationen der Anwendung sind Allergien gegen Inhaltsstoffe sowie Erkrankungen wie Tuberkulose, Kollagenosen, Multiple Sklerose, AIDS-Erkrankungen, HIV und Autoimmunerkrankungen (HEEL GMBH, 2016).

2.8. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung von Traumeel S® bei Muskelkontusionen im tierexperimentellen, murinen Modell zu untersuchen.

2.9. Fragestellung

Bislang ist nicht bekannt, wie Traumeel speziell nach einer Muskelkontusion in-vivo wirkt und in welcher Weise die Heilung beeinflusst wird.

Die Nullhypothese lautet:

„Die Heilung des Muskels der Maus nach Kontusion zeigt nach Injektion von Traumeel (Verum) keinen Unterschied gegenüber der Heilung ohne Traumeel (Kontrolle).“

3. Material und Methoden

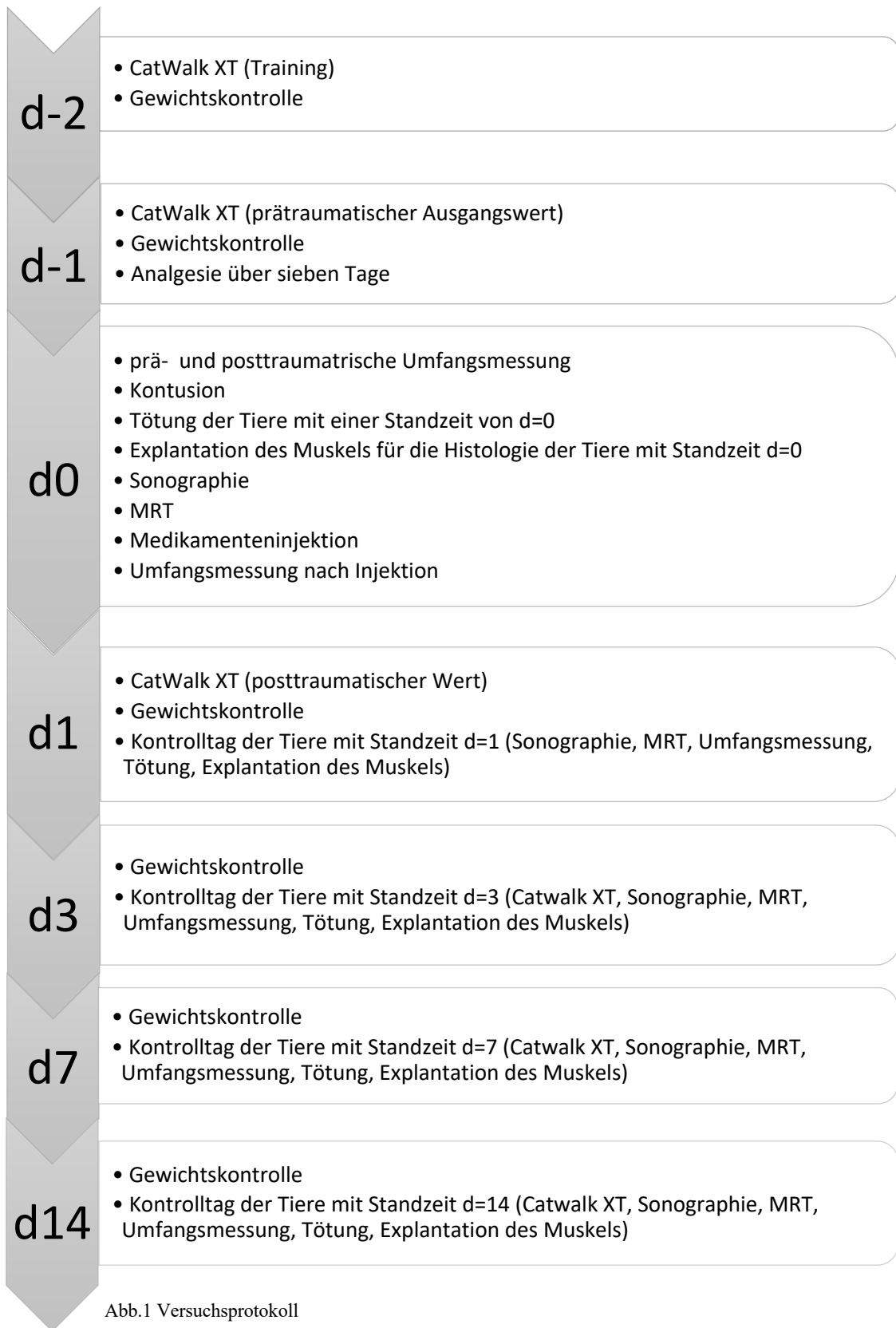
Alle Tierversuche wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Experimente erfolgten unter standardisierten Bedingungen. Hierbei wurde sich streng an die Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes gemäß §10 gehalten. Die Genehmigung erteilte das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz (Lebensmittel und Veterinärmedizin, Konrad-Zusestraße 11, 66115 Saarbrücken). Die Versuchsnummer der Studie lautete 37/2017.

3.1 Versuchsprotokoll

Die Arbeit umfasste insgesamt die Untersuchung von 60 Versuchstieren. Eine Gruppe von n=12 Mäusen wurde zufällig in Kontroll- und Interventionsgruppe eingeteilt und direkt am Tag des Traumas (d=0) getötet und histologisch untersucht. Weitere 48 Tiere wurden ebenfalls zufällig einer Kontrollgruppe und einer Experimentalgruppe mit jeweils n=24 Mäusen zugeteilt. Die Standzeiten dieser Mäuse betragen einen Tag, drei Tage, sieben Tage und 14 Tage. Entsprechend der Standzeit wurden die Mäuse der Versuchs- und Kontrollgruppe in Untergruppen mit je n=6 Mäusen eingeteilt. Die Versuchsgruppe erhielt am Tag des Traumas (d=0) intramuskulär eine Injektion mit 3µL Traumeel in den linken M. gastrocnemius. Entsprechend wurde die Kontrollgruppe mit 3µL 0,9% NaCl behandelt. Jeweils n=6 Tiere der Traumeel- und Kontroll-Gruppe wurden entsprechend ihrer Standzeit entweder an Tag eins, drei, sieben oder 14 euthanasiert und der Muskel für die histologische Untersuchung entnommen (Abbildung 1).

Zur Gewöhnung der Tiere an das CatWalk® XT (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) System fand an Tag d= -2 das Training statt.

Am Tag vor dem Trauma (d=-1 in der Abbildung 1) erfolgte erneut die Analyse des Gangbilds durch das CatWalk® XT (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) und die Gewichtskontrolle. Die Daten von d=-1 wurden für die Auswertung verwendet und spiegeln das präoperative, physiologische Gangbild der Mäuse wider.



3.1.1. Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene C57BL/6N-Tyrc-Brd/BrdCrCrl Mäuse mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $26,72 \pm 0,49$ g und einem mittleren Alter von $10,46 \pm 0,67$ Monaten aus der eigenen Zucht des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland). Ab Beginn der Versuche wurden die Tiere in Käfigen bis zu $n=3$ Tieren gehalten. Die Tierhaltung erfolgte bei einer Lufttemperatur von 22-24 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60%. Die Tiere hatten einen zwölf-stündigen Tag-/Nachtrhythmus und stets freien Zugang zu Futtermitteln (Altromin, Lage, Deutschland) als Standardlaborfutter sowie Trinkwasser ad libitum. Allgemeinzustand, Verhalten und Körpergewicht wurden während der Versuchsreihe ständig überwacht.

3.1.2. Intervention

3.1.2.1. Vorbereitung

Am Tag des Traumas ($d=0$ in Abbildung 1) wurde die linke Extremität der Mäuse über das Kontusionsfeld hinaus vom Unterschenkel über den Oberschenkel bis zur Inguinalregion mit einer elektrischen Schermaschine für Tiere (Isis GT420, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) rasiert und anschließend die übrige Behaarung mittels chemischer Depilation mit asid®-med Enthaarungscreme (ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Die Enthaarungscreme wurde nach zweimaligem Auftragen unter Zuhilfenahme von lauwarmem Wasser entfernt und das Operationsfeld anschließend getrocknet. So wurden optimale Bedingungen für die Sonographie, aber auch MRT- und Umfangsuntersuchungen geschaffen. Währenddessen wurde ein Wärmeverlust der Tiere durch das Bestrahlen mit Hilfe einer Wärmelampe (Sanitas, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) verhindert. Das Entfernen der Behaarung fand unter Kurznarkose mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) statt.

3.1.2.2. Anästhesie

Die Tiere befanden sich bis zum Eintreten der völligen Bewusstlosigkeit für etwa 60 Sekunden in einer Narkosebox mit Wärmeunterlage (ThermoLux®, Witte+Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland). Über einen Verdampfer (Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) flossen zur Einleitung 3,0-4,0% Isofluran mit einem Sauerstofffluss von 6l/min in die Box. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Kontusion und den Untersuchungen wurde mittels einer Maske eine Mischung aus 1,0-2,0% Isofluran und 98-99% reinem Sauerstoff mit einer Flussrate von 1,0l/min verwendet. Die Konzentration des Isoflurans wurde auf die Atemfrequenz der Tiere abgestimmt, welche zwischen 25-40 Atemzügen/min lag.

Um die Augen der Mäuse vor dem Austrocknen zu schützen, wurde während der Narkose eine feuchtigkeitsspendende Dexapanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen-und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) auf die Hornhaut aufgetragen. Bereits kurz nach der Narkose konnten die Mäuse wieder laufen, fressen und trinken und zeigten keine Veränderung in ihrem Schlaf-, Fress- und Putzverhalten.

Die beschriebene Isofluran-Narkose wurde bei sämtlichen Interventionen (MRT, Sonographie, Kontusion, Injektion) zur Anästhesie verwendet, immer unter Zuhilfenahme der Infrarot-Wärmelampe und Augensalbe. Außerdem erfolgte die kontinuierliche Analgesie durch die Gabe von 200mg/200ml (0,4-1mg/ml) Tramadolhydrochlorid-Tropfen (Tramal® 2,5mg/100ml, Grünethal GmbH, Aachen, Deutschland). Die Gabe von Tramadol (Opioid) wurde über sieben Tage postoperativ fortgeführt. Die Applikation erfolgte über die Gabe des Trinkwassers.

3.1.2.3. Kontusion

Nach erfolgreicher Umfangsmessung wurde die Maus für die anstehende Kontusionsverletzung vorbereitet. Die Maus lag auf dem eigens für die Versuchsreihe konstruierten Modell zur Erzeugung einer Kontusion (siehe Abbildung 3). Die linke untere Extremität der Maus wurde wie bei der Umfangsmessung positioniert und unter den Führungsstab aus Plexiglas platziert (siehe Abbildung 4). Mit Hilfe von Fixierpflaster wurde ein Verrutschen des Hinterlaufes durch den Aufprall verhindert. Die Öffnung des Führungsstabes lag auf dem linken M. gastrocnemius, sodass das Gewicht exakt auf den zu untersuchenden Muskel fiel (siehe Abbildung 3 und 4). Das Gewicht wurde angehoben und ragte über den Führungsstab. Die Fallhöhe betrug 15cm und das Gewicht wog 32g. Nach Kontrolle des vollständig erloschenen Zwischenzehenreflexes und der Vergewisserung einer gleichmäßigen und flachen Atmung als Zeichen eines optimalen Narkosestadiums, wurde das Gewicht fallen gelassen und so bei jeder Maus eine gezielte Kontusion des M. gastrocnemius erzeugt. Anschließend wurde die Integrität der Haut kontrolliert. Immer noch narkotisiert, wurde nach der Kontusion eine Umfangsmessung durchgeführt.

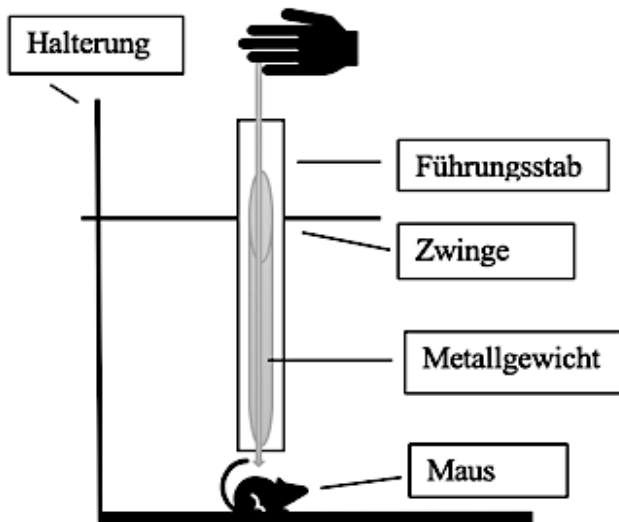


Abb. 3: Gerät zur Erzeugung einer Kontusion des Skelettmuskels



Abb. 4: Position der Maus unter dem Führungsstab und Narkosemaske

Nach der Erzeugung der Muskelkontusion erfolgte die Untersuchung des Muskels mittels hochauflösendem Ultraschallsystem und Magnetresonanztomographen. Die Untersuchungen fanden in Isofluran-Anästhesie unter Kontrolle der Herz- und Atemfrequenz statt. Ein Wärmeverlust wurde durch Wärmeunterlagen verhindert. Die Maus wurde mit Hilfe von Fixierpflaster (Leukotape classic®, BSN Medical, Hamburg, Deutschland) befestigt. Während der sonographischen Untersuchung wurde die Körpertemperatur rektal gemessen und konstant zwischen 36,5-38°C gehalten.

3.1.2.4. Injektionsbehandlung

Nach der Diagnostik mittels MRT und Sonographie erfolgte bei n=24 Tieren eine einmalige Injektion mit 3µL Traumeel S® (Heel GmbH, Baden-Baden, Deutschland) intramuskulär in das Kontusionsfeld (siehe Abbildung 5 und 6). Entsprechend erfolgte bei der Kontrollgruppe mit n=24 gleichsam eine Injektion mit 3µL NaCl 0,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Tiere waren wie bei der Erzeugung der Kontusion positioniert. Die Injektion erfolgte mit Hilfe einer 10µL Spritze (Hamilton™ 80343, Deutschland) und einer Einmalkanüle (Sterican®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in den linken M. gastrocnemius.



Abb. 5: Hämatom nach Kontusion verhindert die Perfusion



Abb. 6: Injektion in den M. gastrocnemius

Anschließend wurde erneut der Beinumfang gemessen. Danach wurden die Mäuse in ihre Käfige zurückgelegt. Um ein postoperatives Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere mit einer Wärmelampe (Sanitas, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) bestrahlt und erst nach Beendigung der Aufwachphase in die Versuchstierhaltung zurückgebracht.

3.1.2.5. Postoperative Kontrolle

Am ersten postoperativen Tag fand eine weitere Ganganalyse mittels CatWalk® XT (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) und Gewichtskontrolle für alle n=48 Tiere statt. Diese zeichnet das Gangbild der Mäuse post Trauma auf. Die Tiere, die der Gruppe mit einer Standzeit von einem Tag zugeordnet waren, hatten an d=1 gleichzeitig ihren Kontrolltag und erhielten weitere Untersuchungen. Die Gruppengröße umfasste n=6 Tiere für die Traumeel-Gruppe und n=6 für die Kontrollgruppe. Alle weiteren Tiere (je n=6) hatten entweder eine Standzeit von drei, sieben oder 14 Tagen und ihren Kontrolltag am entsprechenden Tag. Im Zuge des gewählten Untersuchungszeitpunktes (d=1, d=3, d=7 oder d=14) fand eine Ganganalyse, eine Sonographie- und MRT-Untersuchung sowie eine Umfangsmessung statt. Am Ende des jeweiligen Kontrolltages wurden die Mäuse getötet und anschließend der traumatisierte Muskel für die histologische Untersuchung entnommen.

3.1.3. Tötung der Tiere

Entsprechend der Gruppenzuteilung wurden die Tiere euthanasiert, um den *M. gastrocnemius* weiter zu untersuchen. Alle Tiere wurden mittels CO₂-Inhalation in der Inhalationskammer und anschließendem Genickbruch getötet.

3.1.4. Präparation des *M. gastrocnemius*

Zur weiteren histologischen Untersuchung wurden sowohl der untersuchte linke *M. gastrocnemius* als auch der gesunde kontralaterale *M. gastrocnemius* explantiert. Nach der Tötung wurden beide unteren Extremitäten zur Vorbereitung auf die Präparation mittels elektrischen Tierscherers (Isis GT420, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) rasiert und anschließend die übrige Behaarung mit Hilfe von asid®-med Enthaarungscreme (ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Nach gründlicher Reinigung mit isotoner NaCl-Lösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, B.Braun Melsungen AG) und Trocknung mittels Einmalkompressen (NOBAMED Paul Danz AG, Ruhr, Deutschland) wurden die Tiere in Bauchlage mittels Fixierpflaster (Leukotape classic®, BSN Medical, Hamburg, Deutschland) auf dem Operationstisch fixiert. Dazu wurde die entsprechende untere Extremität in Dorsalextension des Sprunggelenkes und Extension des Kniegelenkes sowie adduziertem Hüftgelenk positioniert. Der Präparationsbereich wurde mit einem Hautdesinfektionsmittel (Softasept®N, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Die Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Leica M651, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 16facher Vergrößerung. Dadurch wurde eine uneingeschränkte Sicht auf Muskel-, Fett- und Weichteilgewebe sichergestellt und die Schnitte präzise gesetzt, um keine weitere Verletzung des Muskels zu induzieren. Die Inzision der Haut erfolgte mit einer sterilen Skalpellklinge (Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) proximal der Achillessehne (siehe Abbildung 7 und 8). Der Hautschnitt wurde nach proximal weitergeführt und erstreckte sich bis oberhalb des Hüftgelenkes. Nach Eröffnen der Haut wurde die Faszie in 90° versetzt zum Hautschnitt gespreizt, sodass die Sicht auf die darunter liegende Muskulatur frei wurde. Nach stumpfer Präparation mit einer Mikropinzette und Entfernen von Fettgewebe, stellte sich der *M. gastrocnemius* in seiner gesamten Länge mit Ursprung und Ansatz dar. Mit Hilfe des Skalpells wurde die Achillessehne oberhalb des Calcaneus durchtrennt, der Muskel vorsichtig vom Knochen gelöst und anschließend von den Band- und Weichteilstrukturen getrennt. So konnte der Muskel in toto entnommen werden. Zur weiteren histologischen Untersuchung wurde die Achillessehne mit Prolene 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Einzelknopfnahrttechnik markiert. Anschließend wurde der Muskel in Formalinlösung (4%) konserviert. Analog erfolgte die Präparation der Gegenseite.

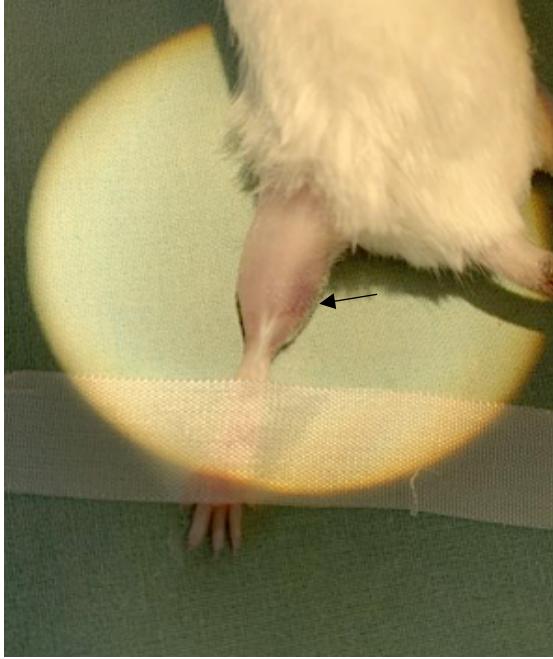


Abb. 7: Maus mit Standzeit d=1 und lateralem Hämatom

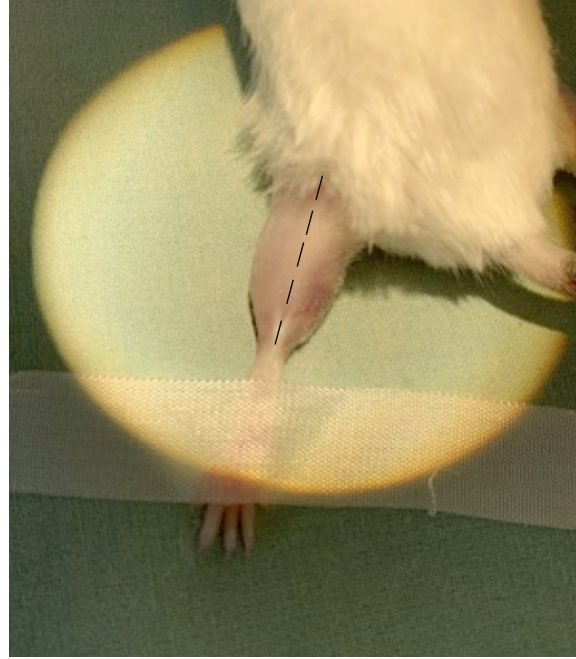


Abb. 8: Schnittführung

3.2. Zielkriterien und Auswertung

3.2.1. Ganganalyse

Um eine präzise Verhaltensanalyse zu erhalten und das Gangbild prä- und postoperativ sowie während des Heilungsprozesses zu erfassen, kam das CatWalk® XT-System (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) zum Einsatz. Es handelt sich dabei um ein videoassessiertes System, das lokomotorische Merkmale und kontusionsbedingte Anpassungen des Gangbildes und -musters, Bewegungsabläufe sowie schmerzinduziertes Schonverhalten quantitativ erfasst. Das System analysiert Schritte und den Gang von Mäusen oder Ratten, die sich im Versuchsetting in beide Richtungen innerhalb des Systems frei bewegen können (BASSO et al., 1995; HAMERS et al., 2006; HAMERS et al., 2001).

Das CatWalk® XT besteht aus einem Laufsteg (siehe Abbildung 9), welcher zu allen Seiten durch Wände begrenzt ist und einen Korridor bildet. Auf der linken Seite des Korridors befindet sich eine Box aus Plexiglas, in die die Versuchstiere gesetzt werden können und Zugang zum Laufsteg haben. Der Laufsteg besteht aus einer Glasplatte von 1,3m Länge und 4cm Breite, welche intern mit grünem und von der Decke mit rotem LED-Licht beleuchtet wird. Das grüne Licht wird innerhalb des Systems komplett reflektiert und illuminiert den Laufsteg (BOZKURT et al., 2008). Das Licht hat nur die Möglichkeit aus dem System zu entweichen, wenn eine den Laufsteg überquerende Maus oder Ratte mit einer Tatze die Glasplatte berührt und dadurch das Licht zerstreut. So erzeugte ein Kontakt der Pfote mit der Glasplatte ein Erleuchten der entsprechenden Fläche auf dem Laufsteg. Dies erzeugte einen Pfotenabdruck (siehe Abbildung 10), der, je nach Stärke der Berührung bzw. Gewicht der Tiere, variierte. Um optimale

Bedingungen zu schaffen, war der Versuchsraum unbeleuchtet und lärmgeschützt (ACHTERKAMP D, 2012).

Durch die firmeneigene „Illuminated Footprints“™ -Software war es möglich, die Pfotenabdrücke mit einer Hochgeschwindigkeits-Farb-Videokamera (GP 3360, Gevicam, USA) in Echtzeit über das Streulicht zu erfassen, welche unter dem Laufsteg in einem Abstand von 34cm positioniert war (CHEN et al., 2014). Die richtige Entfernung der Kamera zur Glasplatte ist nötig, damit die Kamera einen ausreichend großen Bereich der Glasplatte erfasst. Beispielsweise sollten 45cm des Laufsteges erfasst werden, um ein Aufzeichnen von 5-6 Schrittzyklen pro „Run“ bei Mäusen zu gewährleisten. Die Videokamera transformiert immer nur die Fläche eines ganz bestimmten Ausschnittes der Glasplatte auf dem Laufsteg in ein digitales Bild (ACHTERKAMP D, 2012).

Vor jedem Messsetting war es nötig, den Laufsteg zu kalibrieren und den Bildausschnitt auf der Mitte der Glasplatte festzulegen. Die zu analysierende Fläche betrug 20cmx10cm. Die im Versuchssetting festgelegten Daten und die Kalibrierung des Laufstegs wurden vor jedem Versuchstag kontrolliert, damit standardisierte, einheitliche Bedingungen geschaffen werden konnten. Die Videokamera erfasste das reflektierte Licht der Pfote, die die Glasplatte berührte, und generierte ein digitales Bild, das aus Pixeln und digitalen Helligkeitswerten besteht (ACHTERKAMP D, 2012).



Abb. 9: CatWalk System (A) und Maus (B) mit Pfotenreflexion und markierten Tatzen auf dem beleuchteten Laufsteg. Von oben kommend sieht man das rote Licht. LF= left front paw, RF= right front paw, RH = right hind paw, LH = left hind paw

Nach jedem Lauf erkannte und kategorisierte die Software Noldus CatWalk XT (Version 9.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) die Fußabdrücke automatisch. Ein Lauf wurde nur verwendet, wenn die festgelegten Kriterien (minimale Laufzeit=1 Sekunde, maximale Laufzeit=5 Sekunden, minimale Anzahl konformer Läufe= 5, maximale Geschwindigkeitsschwankung=60%) erfüllt wurden. Bei Nichterfüllen der Runkriterien erfolgte ein Ausschluss des Laufes. Alle Läufe, die die Kriterien erfüllten und von der Software als erfolgreich bewertet wurden, wurden anschließend manuell reevaluiert, um Fehlmarkierungen der Extremitäten und -messungen der Software zu beheben. Die Glasplatte wurde vor Beginn der Untersuchung mit Glasreiniger (Frosch Spiritus Glasreiniger, Werner&Mertz GmbH, Mainz, Deutschland) gereinigt und mit Microfasertüchern getrocknet.

Während der Untersuchung konnten die Tiere frei über den Laufsteg laufen und selbstständig wenden. Es erfolgte keine positive oder negative Verstärkung.

Zur Auswertung diente die Software CatWalk® XT (Version 10.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL). Die Auswertung untersuchte einzelne Pfotenabdrücke hinsichtlich Intensität, Fläche, Länge und Breite. Weiter wurde der Gang hinsichtlich Schrittabfolge, Schrittrhythmus, Schrittprofil, Schrittgeschwindigkeit, Standphase, Schwungphase und Schwunggeschwindigkeit analysiert (siehe Abbildung 10). So war es möglich, das Gangbild der Maus individuell zu beschreiben. Es wurde sowohl die rechte (RH = right hind paw) wie auch die linke Hinterpfote (LH = left hind paw) jeder Maus analysiert. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Parameter wurden in einer Tabelle zusammengefasst. Im Ergebnisteil wurde der Schwerpunkt auf die aussagekräftigen Parameter MaxContactArea, MaxContactMeanIntensity, PrintArea und DutyCycle gelegt.

Parameter	Erläuterung
<i>Stand</i>	Die Zeitdauer des Kontaktes der Pfote mit der Platte in Sekunden
<i>Max Contact Area</i>	Maximale Kontaktfläche der Pfote während eines Schrittes in cm ² (oder Print Area bei Max Contact at (s))
<i>Max Contact Mean Intensity</i>	Mittlerer Druck der Pfote beim Kontakt mit der Glasplatte, errechnet über die Lichtintensität (0 bis 255)
<i>Print Area</i>	Fläche des Pfotenabdruckes, Kontaktfläche der Pfote mit der Glasplatte während der Standphase in cm ²
<i>Swing</i>	Schwungzeit der Extremität ohne Kontakt mit der Glasplatte während der Vorwärtsphase in Sekunden
<i>Duty Cycle</i>	Dauer der Standphase als Prozentteil von „step-cycle“ Duty Cycle = (Stand/Stand*Swing) *100 in Prozent

Tab. 2: Ausgewählte Parameter in CatWalk® XT

Die Daten wurden mit Hilfe der Laufzeit, dem maximalen Kontakt, der Lichtintensität und des Fußabdrucks kalkuliert. Zur Auswertung wurden die Daten MaxContactArea, MaxContactMaxIntensity, MaxContactMeanIntensity sowie PrintArea in Prozent umgerechnet, wobei d=0 als Ausgangswert diente (entspricht 100%).



Abb. 10: A Fläche der Pfoten für Print Area in schwarz. B Stand (blau) und Swing (grün) im Schrittzklus

3.2.2. Sonographie und Photoakustik

Zur Darstellung der Perfusion, des Hämoglobingehalts und der Sauerstoffversorgung wurden Sonographie- und Photoakustik-Untersuchungen (Vevo 770 ®, Fujifilm, VisualSonics, Canada) der linken unteren Extremität beider Gruppen an den Operationstagen sowie den Kontrolltagen durchgeführt (n=24). Weiterhin wurden zur Kontrolle drei kontralaterale, gesunde Beine untersucht.

Die Untersuchung erfolgte in Bauchlage (siehe Abbildung 11). Nach Enthaarung (Enthaarungs-creme, ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) der unteren Extremität wurde ein vorgewärmtes, blasenfrees, klares Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) aufgetragen.

Um die anatomische Information mit hoher Auflösung zu erfassen, wurde die B-Mode-Bildgebung verwendet. Durch die kleine Größe der Muskulatur, ist eine 10fach höhere Auflösung als bei Ultraschalluntersuchungen des Menschen nötig (FOSTER et al., 2002). Daher besaß der Ultraschallkopf eine Frequenz von 40 MHz und eine Fokustiefe von 8-15mm. Das Sichtfeld war 14,08mm breit. Für die Bildgebung wird der Ultraschallkopf über einen motorisierten Antrieb linear über das Bildgebungsfeld bewegt. Mit Hilfe der Photoakustik-Bildgebung (PAI) ist es möglich, einen 3D-Atlas der Muskeloxygenierung mit einer Auflösung zu erstellen, welche der der Ultraschallbildgebung entspricht. PAI verwendet einen pulsierenden Laser, um eine lokalisierte thermoelastische Expansion von optischen Absorbern (hier Hämoglobin) zu induzieren. Dies erzeugt Schallwellen, die von einem Ultraschallwandler/-empfänger erfasst werden. Mit Hilfe des linearen Wandlers (FUJIFILM VisualSonics' LZ Series Transducers) LZ Transducer LZ550 (32-55 MHz) können dann Ultraschall- und photoakustische Bilder generiert werden (siehe Abbildung 11).

PAI mit mehreren Wellenlängen können die Sauerstoff- und Gesamthämoglobinkonzentration darstellen, ohne exogenes Kontrastmittel zu verwenden. Oxygeniertes und desoxygeniertes Hämoglobin weisen unterschiedliche Absorptionseigenschaften des Lichtes auf. Oxygeniertes Hämoglobin absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 850nm und Desoxyhämoglobin bei 750nm. Dadurch wirken sie als endogener Kontrast um Gewebebilder in-vivo darzustellen. Dies ermöglicht, zusätzlich zur anatomischen Darstellung des Muskels, eine Funktionsanalyse, da beide Hämoglobinformen getrennt gemessen werden können. Dazu wird Licht, das von einem Laser erzeugt wurde und für die photoakustische Abbildung der Sauerstoffsättigung erforderlich ist, durch in den Wandler integrierte Glasfaserbündel abgegeben. Mit Hilfe der unterschiedlichen Hämoglobin-Konzentrationen lässt sich die Sauerstoffsättigung berechnen (GERLING et al., 2014; MALLIDI et al., 2015; WILSON et al., 2014). Das System ermöglicht so die Abschätzung der räumlichen Verteilung der Sauerstoffsättigung im Blut und stellt diese zusammen mit den B-Mode-Bildern der umgebenden Anatomie dar (siehe Abbildung 12).

Die Energiefluktuationen von Impuls zu Impuls wurden überwacht und im Falle einer Abweichung von mehr als 25% fand eine Neukalibrierung statt. Die Parameter zur Erfassung der Daten (wie zum Beispiel (z.B.) die Verstärkung mit 18dB für Ultraschallbilder und 45dB für photoakustische Bilder) waren für

alle Bildgebungssitzungen konstant. Um eine homogene Lichtbeleuchtung durch den Laser zu ermöglichen, ist es nötig einen 9mm Abstand zwischen Muskel und Wandler einzuhalten, da die optischen Fasern das Licht von beiden Seiten des Wandlers emittieren und der Schnittpunkt beider Lichtwege in einer Tiefe von 9mm liegt (WILSON et al., 2014). Um zu gewährleisten, dass der Ultraschallkopf und das Gel den Muskel nicht komprimieren, wurde der Ultraschallkopf zunächst abgesenkt und anschließend wieder hochgezogen, sodass sich das Gel nur auf dem Sensor befand (siehe Abbildung 11).

Nachdem der M. gastrocnemius im Fokus zentriert war, wurde die 3D-Erfassung gestartet. Die Ultraschallsonde scannte die Mauhaut und nahm 2D-Bilder in regelmäßigen räumlichen 100 μ m -Intervallen mittels linearen Motors auf. Eine firmeneigene Software (Vevo770 V2.3.0, VisualSonics) ermöglichte eine schnelle 3D-Rekonstruktion der aufgenommenen 2D-Bilder. Aus den gewonnenen 2D-Querschnittsbildern wurden im B-Mode und mittels Photoakustik der M. gastrocnemius identifiziert und im Softwareprogramm markiert (ROI). Durch das Ausmessen des M. gastrocnemius und der volumetrischen Analysefunktionen der Software (Vevo Lab; FUJIFILM VisualSonics Inc.) aus mehreren markierten Muskelumfängen wurden die gewünschten Parameter bestimmt (siehe Abbildung 18). Mittels Gesamtvolumen kann das intramuskuläre Hämatom/Ödem (V mm³) dargestellt werden. Weitere Parameter sind Sauerstoffgehalt (SO₂ Av 3D %, SO₂ AvTotal %), Hämoglobingehalt (Hämoglobin Threshold (HbT) Av 3D, HbT 3D), Vaskularisierung (HbT/mm³), Herzfrequenz (HR bpm), Atemfrequenz (RR) sowie Temperatur (°C), die durch die Software in den Region of Interests (ROI) in jedem B-Scan ermittelt wurden. Das verwendete Vevo-System wurde von Needles et al. (2013) (NEEDLES et al., 2013) an in-vivo-Tiermodellen kalibriert und die Messung von Sauerstoffsättigung und HbT in Brustdrüsen- (WILSON et al., 2014) und Bauchspeicheldrüsenmodellen (GERLING et al., 2014) etabliert. In den hier vorliegenden Ergebnissen wird zum Sauerstoff- sowie Hämoglobingehalt Stellung genommen.

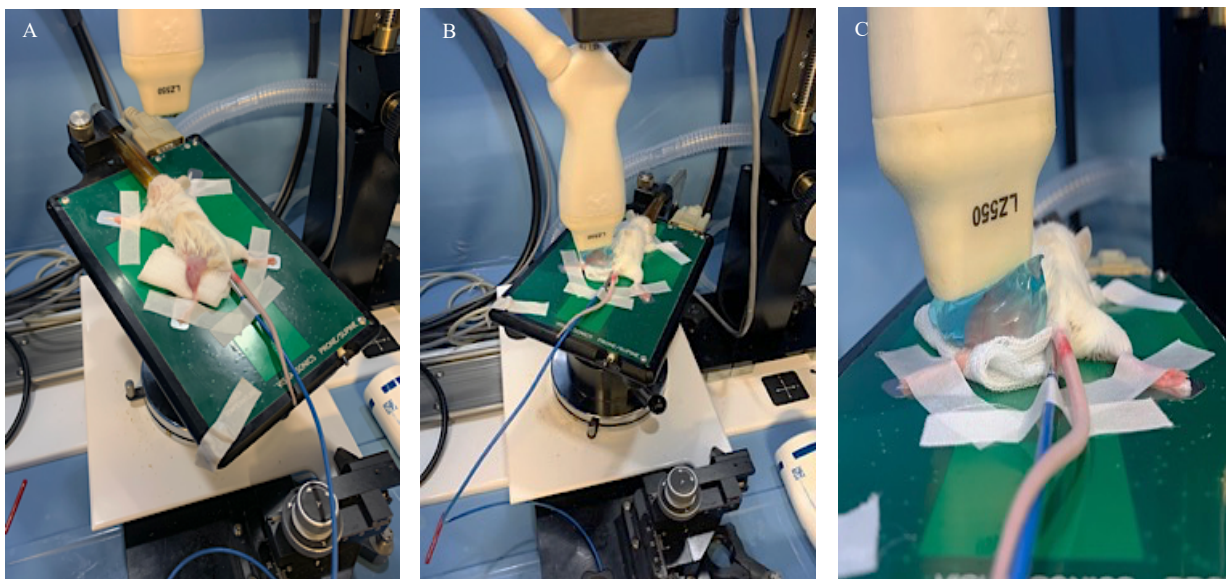


Abb. 11: Lagerung der Maus auf dem Untersuchungstisch (A), Absenken des LZ550 Wandlers auf den mit Gel bedeckten Muskel (B), Einhalten des 9mm Abstandes (C)

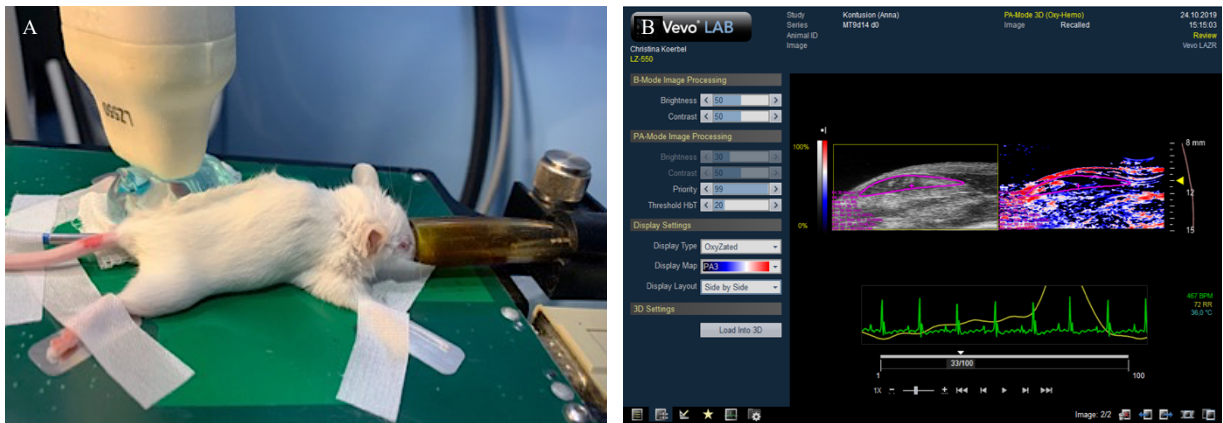


Abb. 12: Messung der Vitalparameter und Inhalationsnarkose über Maske (A), Auswertung und Markieren der ROI's der Sonografie-Bilder im Programm VevoLab (B)

3.2.3. Schiebelehre

Zur prä- und postoperativen Kontrolle der Größenzunahme erfolgte die Bestimmung der Durchmesser mittels digitalem Messschieber (0-150mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland). Hierzu wurde jeweils vor und nach der Kontusion, vor Injektion und nach Injektion vermessen (siehe Abbildung 13). Weiter erfolgte eine Vermessung des Umfangs des linken M. gastrocnemius nach bereits beschriebener Methode an den jeweiligen Kontrolltagen. Zur Auswertung wurden die Werte in Prozent des Ausgangswertes (nach Kontusion) umgerechnet, um die Größenveränderung der kontusionsbedingten Schwellung zu beurteilen.

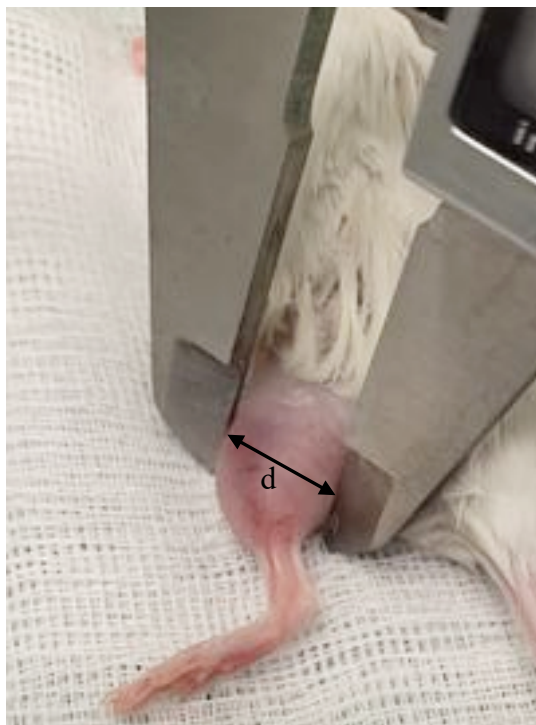


Abb. 13: Vermessung des Längsdurchmessers (d) des kontusionierten Beines mittels Messschieber

3.2.4. Magnetresonanztomographie

Zur Beurteilung von Skelettmuskelverletzungen wurde das MRT eingesetzt. Neben einer hochsensitiven Detektion von Ödemen und Blutungen in anatomischen Strukturen ist es durch den nicht invasiven Charakter der Untersuchungstechnik möglich, intraindividuelle Zeitverläufe nach Trauma zu bestimmen (WINKLER et al., 2011).

Die MRT-Untersuchungen wurden an einem Kleintier-MRT-Gerät mit Feldstärke von 9,4 Tesla durchgeführt und dabei eine 16-Kanal-Volumenspule (BioSpec 94/20 der Firma Bruker, Ettlingen, Deutschland, ParaVision 5.1 Software) verwendet.

Zur MRT-Messung wurden die Versuchstiere (n=48), jeweils nach erfolgter sonographischer Untersuchung, noch unter Narkose an Tag d=0 und entsprechendem Kontrolltag (d=1, d=3, d=7, d=14) in das MRT-Gerät verbracht. Die Lagerung im Magnetresonanztomographen erfolgte in Bauchlage auf einer Wärmedecke, um eine Unterkühlung der Tiere zu verhindern. Beide Hinterläufe der Mäuse wurden in Extension des Kniegelenkes und Adduktion des Hüftgelenkes gelagert und mit Fixierpflaster (Leukotape classic®, BSN Medical, Hamburg, Deutschland) fixiert. Die Beine wurden dabei standardisiert in einer eigens konstruierten Lagerungsvorrichtung eingebettet. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske aufrechterhalten. Die Atemfrequenz der Tiere wurde mittels Drucksensor (Graseby infant respiration sensor, Smith Medical Germany, Grasbrunn, Deutschland) gemessen. Der Sensor wurde links lateral an der Abdominalwand angebracht und befand sich zwischen Tier und Lagerungsschale. Mittels EKG-Elektroden (3M Red Dot neonatal monitoring electrodes, 3M Health Care, St. Paul, MN, USA) an der vorderen Pfote wurde die Herzfrequenz abgeleitet. Die gemessenen Vitalparameter wurden an einen separaten Computer übertragen und mit Hilfe einer speziellen Software (PC-SAM32, Sa Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA) überwacht.

Zur Überprüfung der optimalen, zentralen Lage der Mäuse im MRT-Gerät, wurden Übersichtsaufnahmen in x-, y- und z-Richtung angefertigt und die Ausrichtung optimal eingestellt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Shim-Sequenz das Magnetfeld im Bereich des Versuchstiers homogenisiert. Ebenfalls angepasst wurden Resonanzfrequenz und Amplitude des RF-Pulses.

Anschließend wurden die MRT-Datensätze in T2 Wichtung in axialer und sagittaler Orientierung akquiriert. Dazu wurde eine Turbo-Spin-Echo-Sequenz mit Fettsättigung und flip back Puls, mit einer Repetitionszeit TR von 4500ms und einer Echozeit von 41ms eingesetzt. Insgesamt wurden 16 Echos aufsummiert.

Mittels open Source Software Horos™ (Horos- Viewer v3.3.5, horosproject.com) wurden die axialen T2-gewichteten als DICOM-Dateien exportierten MRT-Bilder des M. gastrocnemius quantifiziert, ausgewertet und mit denen eines unverletzten Referenzmuskels verglichen. Die Datensätze wurden mittels MPR-Rekonstruktion zweidimensional in der Software dargestellt. Der Durchmesser und die Dicke der

linken und rechten Extremität wurden nach Kontrolle und Optimierung der Ausrichtung der MRT-Bilder vermessen. Hierzu wurde ein Abstand von 10mm zum Kniegelenk der Tiere eingehalten. Umfang und Dicke wurden mittels Umrandung und Vermessung mit den entsprechenden Software Tools bestimmt und in cm angegeben (siehe Abbildung 14). Zusätzlich wurde in den axialen Schnitten das intramuskuläre Ödem des M. gastrocnemius vermessen (siehe Abbildung 15). Dieses zeigte sich in den T2-gewichteten Datensätzen als hyperintens gefiederter Muskel und entspricht dem Läsionsbereich. Dazu wurden ebenfalls die MPR-Rekonstruktion verwendet und mittels Software-Tool das intramuskuläre Ödem in allen erzeugten Schnittbildern umrandet. Das Softwareprogramm ermittelte den Umfang (cm) sowie die Fläche (μm^2), die mittlere Signalintensität (Mean) und Standardabweichung (sDev) der Signalintensität. Die verwendete Schichtdicke der Schnittbilder betrug $0,9\mu\text{m}$. Die in jedem Schnittbild ermittelten Flächen wurden addiert und mit der Schichtdicke multipliziert, um das Gesamtvolumen (mm^3) des Muskelschadens des M. gastrocnemius zu erhalten. In den Ergebnissen werden die so erhaltenen Werte, unter Einbeziehung des Umfangs der Hinterläufe, als intramuskuläres Ödem bezeichnet.

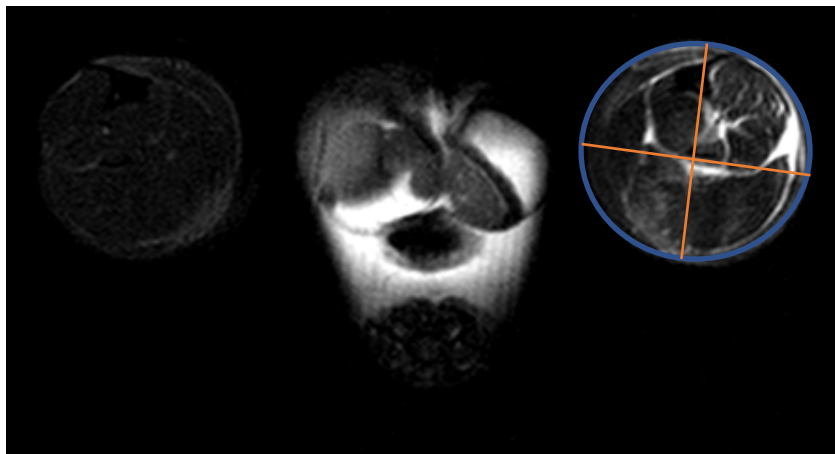


Abb. 14: Umfangsmessung und Dickenmessung in Horos

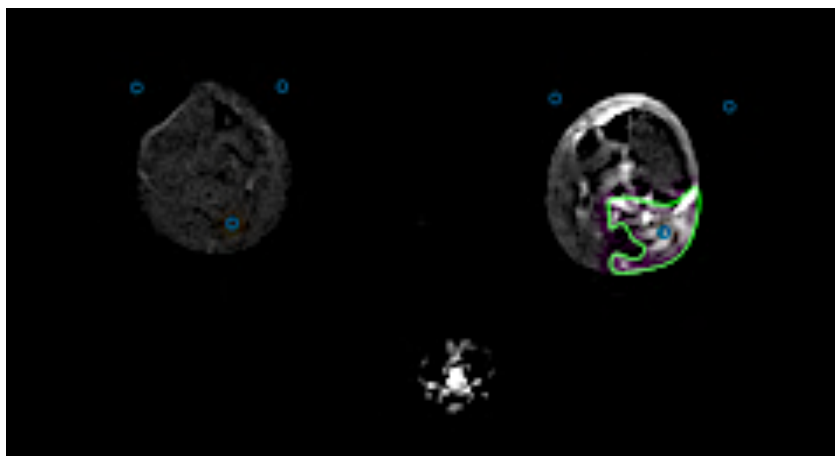


Abb. 15: Vermessen des intramuskulären Ödems in Horos

Die axialen Schnittbilder wurden mit Image J (NIH Image, National Institutes of Health, Bethesda, MD, <https://imagej.nih.gov/nih-image/>) ausgewertet und das Volumen des Gesamtödems (mm^3) für die

rechte und linke Extremität ermittelt (siehe Abbildung 16). Die DICOM Dateien hatten eine Schichtdicke von $0,4\mu\text{m}$ und eine Voxelgröße von $90\times 90\times 90\times 400\mu\text{m}$. Insgesamt wurden 36 Transversalbilder erstellt. Für jedes Bein wurde in 18 Bildern die Fläche mittels Image J in dem gewünschten umrandeten ROI ermittelt und mit der Schichtdicke multipliziert. Anschließend wurde die Summe der 18 Bilder für rechte und linke Extremität gebildet.

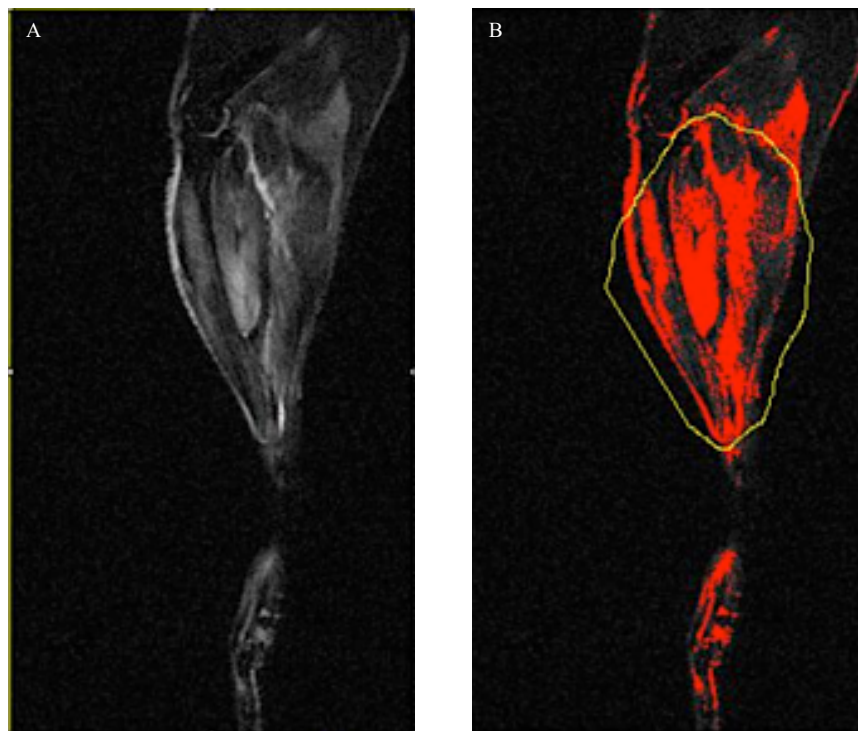


Abb. 16: Bearbeitung in Image J (A) des MRT-Bild, (B) Vermessung mittels ROI, vermessen wird nur die rote Fläche, die sich im grob umrandeten Muskel befindet

3.2.5. Histologie

3.2.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung lassen sich morphologische Gewebestrukturen erkennen und beurteilen. Das Prinzip der Färbung besteht darin, dass verschiedene Strukturen des Gewebes unterschiedlich gefärbt sind. So stellt „Hämatoxylin“ saure Molekülgruppen blau dar und der saure Farbstoff „Eosin“ markiert basische Strukturen rot. Ergebnis der Färbung ist, dass basophile Gewebestrukturen wie bspw. Zellkerne blau und eosinophile Zellstrukturen wie Zytoplasma, Plasmaproteine oder Kollagenfasern rot gefärbt werden (ULFIG, 2019).

Die Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll für HE-Färbungen. Der zuvor präparierte Skelettmuskel wurde im ersten Schritt bei 20°C für 24 Stunden in 4% Formalin fixiert. Anschließend erfolgte

die Entwässerung der entstandenen Organblöcke in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100%). Die Organblöcke wurden im Rahmen eines dreimaligen à dreiminütigen Waschschruttes in Xylol getaucht. Anschließend begann die Fixierung in flüssigem Paraffin. Die Präparate mussten dann in den eingebetteten Blöcken von ca. 60°C abkühlen, bis sie hart genug waren, um im Mikrotom (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) in Schnitte von 1µm geschnitten zu werden. Nach dem Aufbringen der Schnitte auf einen Objektträger, wurde ihnen mittels Xylol das Paraffin entfernt. Dann wurde der Schnitt in einer absteigenden Alkoholreihe (100-70%) in Wasser gelegt und vier Minuten in Hämatoxylin nach Böhmer gefärbt. Nach Spülen mit Aqua destillata (Aqua dest.), Differenzieren in Salzsäure (HCl) und erneutem Spülen mit Leitungswasser, erfolgte eine einminütige Färbung mit Eosin. Anschließend erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70-100%) und erneutes Spülen mit Xylol. Nach Eindecken in Xylolkit und Deckgläschen erfolgte die Mikroskopie (ULFIG, 2019).

Die Auswertung der Schnitte erfolgte bei 20-facher Vergrößerung in Auflichtmikroskopietechnik (BX-60, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Bilder wurden mit einer Kamera (DP73, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und Imaging Software (cellSens Dimension 1.6, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und anschließend analysiert. Es wurden zunächst Übersichtsaufnahmen in 1,25-facher, 5-facher und 10-facher Vergrößerung angefertigt und die Kontusionszone durch mäanderförmige Untersuchung des Schnittes aufgesucht. Die Auswertung erfolgte in 20-facher Vergrößerung (acht ROI's) in den durch Muskelverletzung charakteristischen Bereichen. Zur Beurteilung wurden die Zellkerne ausgezählt.

Diese stammten entweder von Immunzellen, Bindegewebszellen oder den Muskelfasern selbst, deren Zahl in der verletzten Stelle jedoch abnahm. Im Verletzungsbereich, der mit 10-facher Vergrößerung bestimmt worden war, wurden acht Bilder in 20-facher Vergrößerung angefertigt und die Zellkerne ausgezählt. Anschließend wurde der Mittelwert der Zellkerne pro Gesichtsfeld in 20-facher Vergrößerung berechnet (siehe Abbildung 17-19).

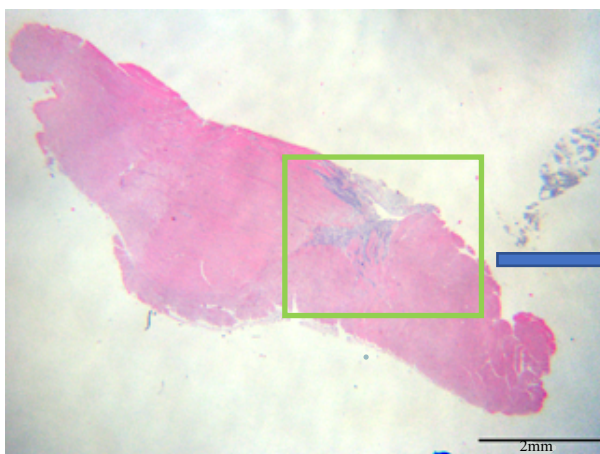


Abb. 17: 1,25x-fache Vergrößerung mit markierten Bereichen für die Aufnahmeorte der 5x-fachen Vergrößerung

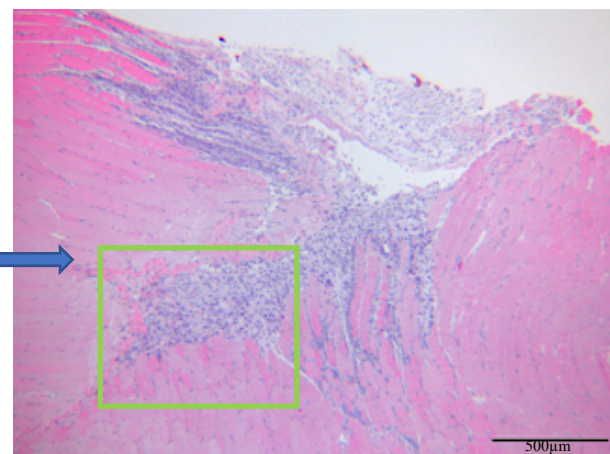


Abb. 18: 5x-fache Vergrößerung mit eingezeichneten Bereichen für die Aufnahmeorte der 10x-fache Vergrößerung

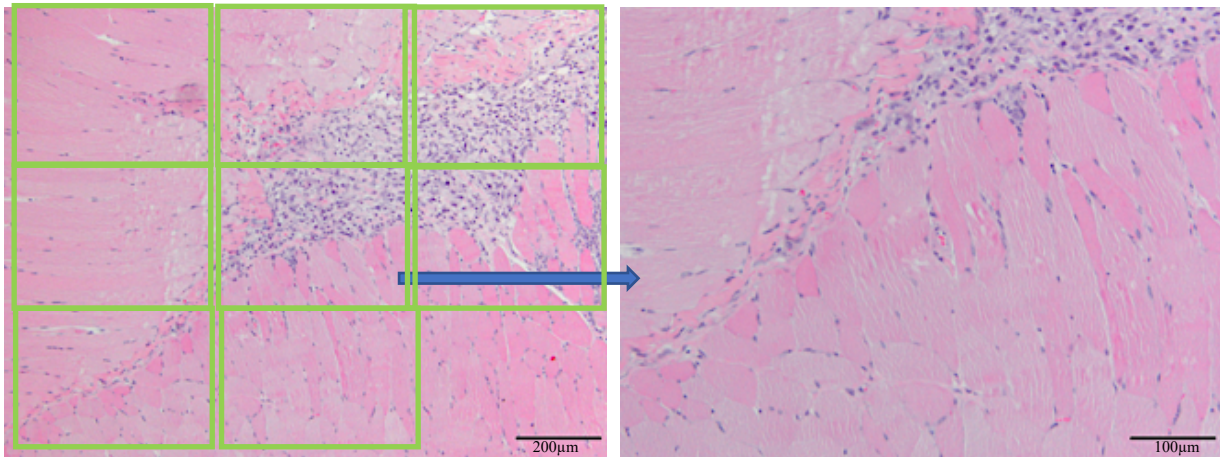


Abb. 19: 10x-fach Vergrößerung mit Aufnahmeorten (jeweils acht ROI's) für die 20x-fach Vergrößerung, die zur Auszählung genutzt wurde

3.2.5.2. Immunhistologische Färbung

Bei der Immunhistochemie macht man sich das Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze. Sie ist ein etabliertes Prozedere, um Antigene zu detektieren. Unterschiedliche Proteine in den Proben wirken als Antigene und werden durch aufgebrachte Antikörperlösungen überschichtet, inkubiert und sichtbar gemacht. Ein Antikörper, der an das Epitop des nachzuweisenden Antigens bindet, wird als Primärantikörper bezeichnet. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper direkt mit einer fluoreszierenden Verbindung oder einem Enzym gekoppelt, wohingegen bei der indirekten Methode ein Sekundärantikörper mit einem Farbstoff gekoppelt ist und sich gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers richtet. Markierte Antigene im Probenmaterial können dann lichtmikroskopisch oder fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden. Eine weitere Methode stellt die Enzym-Immunglobulin-Komplex-Methode dar. Primär- und Sekundärantikörper sind unmarkiert. Der Sekundärantikörper dient als eine Art Brückenantikörper, der die Verbindung zwischen Primärantikörper und einem Enzymkomplex herstellt, der in einem weiteren Schritt hinzugefügt wird. Durch Behandlung mit einem Enzymsubstrat entsteht eine Reaktion, deren Produkt farbig ist (ULFIG, 2019). In dieser Arbeit wurden die gesplante Caspase-3 (Cystein-Aspartylprotease) als Indikator für die Apoptose, die Myeloperoxidase (MPO) als Marker der Neutrophilen Leukozyten und CD68 (Cluster of Differentiation 68) als Makrophagenmarker untersucht. Zur Identifikation der Zellen wurde für die Färbungen ein Avidin-Biotin Komplex verwendet und die Zellen mit Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren.

3.2.5.2.1. Caspase-3-Färbung

Es handelt sich bei Caspase-3 um eine Effektorcaspase, die im Zuge der Apoptose aktiviert wird. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird fragmentiert und der programmierte Zelltod der Zelle initiiert (PORTER, JÄNICKE, 1999). Zellen, die sich im Apoptosezyklus befinden, wurden mit Hilfe des polyclonalen Kaninchen anti-cleaved Caspase-3 Antikörpers (1:100; New England Biolabs, Frankfurt, Germany) inkubiert und markiert. Als nächstes wurde der Primärkörper mit einem biotinylierten Ziege-

Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper markiert, welcher als Sekundärantikörper diente. Anschließend wurde das Präparat mit an Peroxidase gebundenem Streptavidin (Abcam, Milton, UK) inkubiert. Als Chromogen diente Amino Ethyl Carbazol (AEC) (Abcam, Milton, UK) und für die Gegenfärbung wurde Hämaulan nach Meyer verwendet. Die Auswertung erfolgte bei 20-facher Vergrößerung in Auflichtmikroskopietechnik (BX-60, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), wurde mit einer Kamera (DP73, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und Imaging Software (cellSens Dimension 1.6, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und anschließend analysiert. Es wurden Übersichtsaufnahmen in 1,25-facher, 5-facher und 10-facher Vergrößerung angefertigt (siehe Abbildung 20, 21). In 20-facher Vergrößerung wurde der Schnitt mäanderförmig untersucht. Zur Beurteilung wurden die in den Schnitten Caspase-3-positiven Zellen ausgezählt und anschließend der Mittelwert der Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld in 20-facher Vergrößerung berechnet (siehe Abbildung 20-21, acht ROI's). Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurden nur die positiven Zellen ausgewertet, welche sich im Muskelgewebe befanden. Nicht mitgezählt wurden Zellen im Bindegewebe oder Fettgewebe.

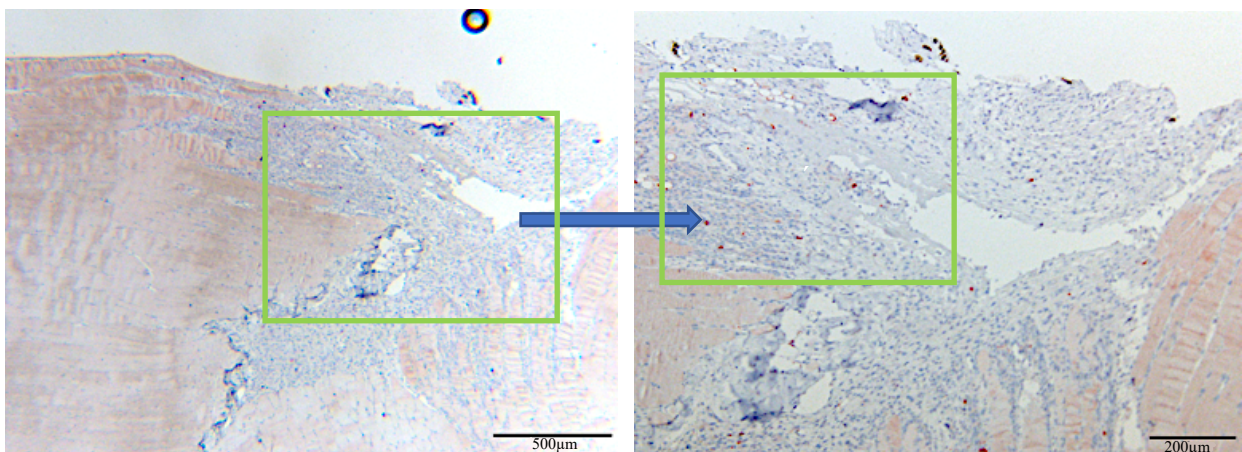


Abb. 20: Übersichtsaufnahmen angefertigt analog zum Verfahren bei HE-Färbung mit ROI (grüne Rechtecke)

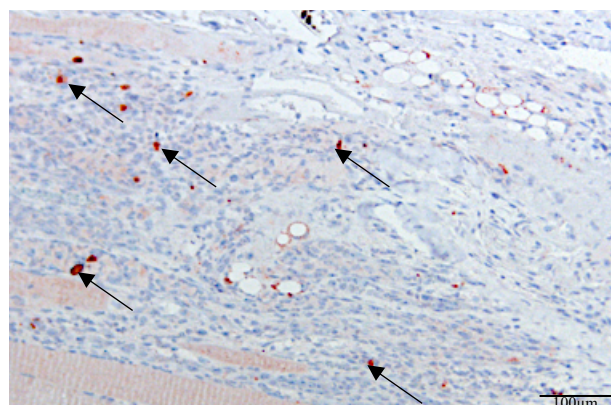


Abb. 21: Aufnahme in 20-facher Vergrößerung, positive Zellen mittels Pfeil beispielhaft markiert

3.2.5.2.2. Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidase ist ein lysosomales Enzym und kommt bei Zellen der myeloischen Zellreihe wie beispielsweise Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten vor (BAUM, 2019). MPO dient als Neutrophilenmarker. Die Proben wurden analog zum Vorgehen bei der Caspase-3 Färbung behandelt und mit polyklonalem Kaninchen-anti-MPO-Antikörper (Verdünnung: 1:100, Abcam, Milton, UK) inkubiert und markiert. Als Sekundärantikörper diente ebenfalls ein biotinmarkierter Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Abcam, Milton, UK). Anschließend wurde das Präparat mit an Peroxidase gebundenem Streptavidin (ready to use; Abcam) inkubiert. Das Chromogen (AEC, Abcam, Milton, UK) war äquivalent zu den anderen immunhistochemischen Färbungen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Meyer. Die Auswertung der MPO-positiven Färbung erfolgte auf gleiche Weise wie bei der anderen immunhistochemischen Färbung (Abbildung 22-23).

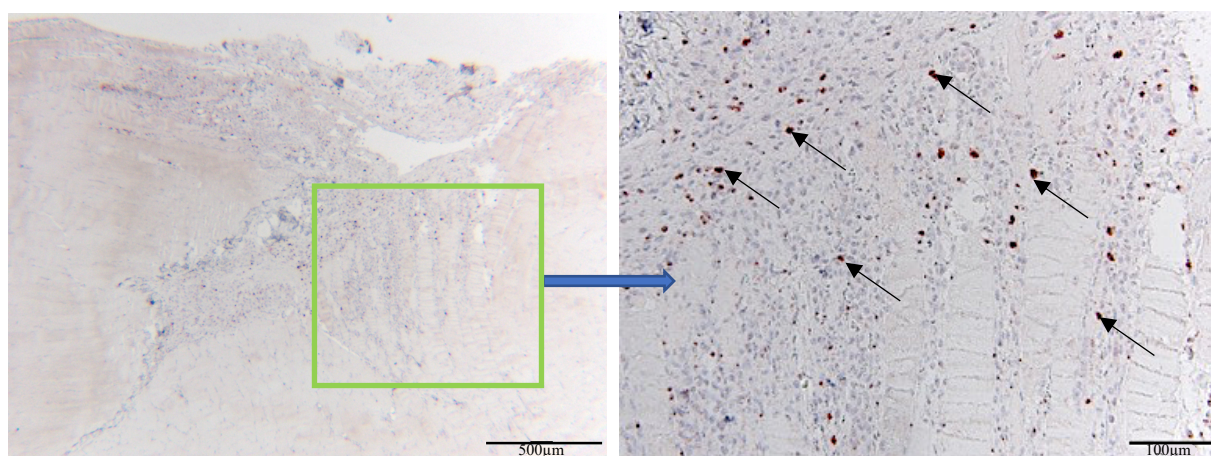


Abb. 22: MPO, 5x-fach Vergrößerung als Übersichtsaufnahme Abb. 23: 20x-fach Vergrößerung, Vorgehen analog zu den anderen Färbungen. Positive Zellen beispielhaft markiert

3.2.5.2.3. CD68

CD68, auch als ED1 bezeichnet, ist ein intrazelluläres Glykoprotein und befindet sich auf den Membranen von nicht residenten, eingewanderten Makrophagen. Es dient der Detektion aktivierter Makrophagen (DIJKSTRA et al., 1985). Makrophagen entstehen aus Monozyten und differenzieren sich in unterschiedliche reife Klassen (MANTOVANI et al., 2007). Eine Klasse bilden die klassisch aktivierten M1-Makrophagen, eine andere die alternativ aktivierten M2-Makrophagen (MOSSER, EDWARDS, 2008). Alle Makrophagen lassen sich mit Hilfe der CD68-Färbung markieren (MURRAY, WYNN, 2011). Das Färbevorgehen erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Färbungen. Primärantikörper war ein monoklonaler Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:200 Abcam, Milton, UK). Als Sekundärantikörper diente ebenfalls ein biotinmarkierter Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Abcam, Milton, UK). Die Auswertung der CD68-positiven Zellen erfolgte ebenfalls analog zu den anderen immunhistologischen Färbungen (siehe Abbildung 24).

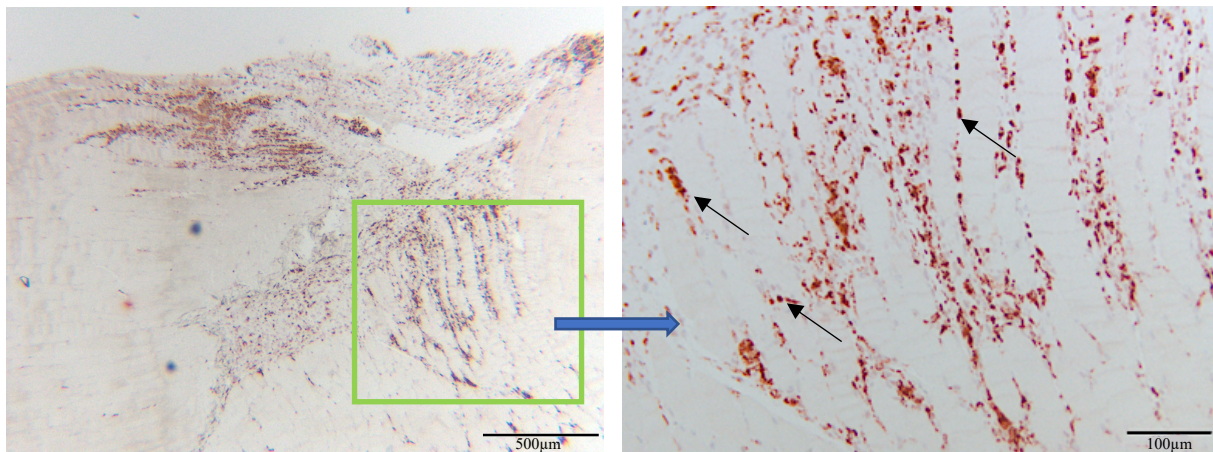


Abb. 24: Nach Anfertigung der Übersichtsaufnahmen der CD68 Färbung auf immer gleiche Weise wurden zum Auszählen 20-fach Aufnahmen aus der Kontusionsstelle erstellt. Zellen beispielhaft mittels Pfeil markiert

3.3. Statistik

Die erfassten Daten und Parameter wurden zur Auswertung in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) zusammengefasst, übertragen und digital abgespeichert. Alle Werte wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (MEAN \pm SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung und das Erstellen der Figures erfolgte mittels Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc. 2008, Erkrath, Deutschland). Zum Einsatz kam der einseitige „one way analysis of variance for multiple comparisons“ (ANOVA), um die einzelnen Gruppen untereinander zu verschiedenen Zeitpunkten bei Normalverteilung miteinander zu vergleichen. Bei Prozentwerten kam der „ANOVA on Ranks“ zum Einsatz. Außerdem kamen als post-hoc Test der „Student-Newman-Keuls-Test“, „Dunnet-Test“ und „Dunn’s-Test“ zur Anwendung. Um die linken Hinterläufe der Maus an den jeweiligen Versuchstagen zwischen beiden Gruppen miteinander zu vergleichen, kam ein „t-Test“ zur Anwendung. Die Ausgangswerte an d=0 wurden mittels „paired t-Test“ mit den Kontrolltagen verglichen. Bei Prozentwerten wurden der „Rangsummentest“ oder der „signed Rank-Test“ verwendet. Der p-Wert wurde als $p < 0,05$ definiert, um signifikante Unterschiede anzuzeigen. Alle Werte wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben (MEAN \pm SEM), sowohl zur statistischen Auswertung als auch zur graphischen Darstellung der erhobenen Daten. Die Daten sind im Anhang in tabellarischer Form dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Postinterventioneller Verlauf

Am ersten postoperativen Tag zeigten alle Mäuse ein diskretes Entlastungshinken des linken, verletzten Hinterlaufes. Die Tiere erholten sich und es konnte ein Übergang zurück zu ihren natürlichen Verhaltensgewohnheiten und physiologischen Bewegungsabläufen bis hin zur Vollbelastung beobachtet werden. Es konnten keine relevanten, schmerzinduzierten Veränderungen der restlichen äußeren Erscheinung festgestellt werden (MORTON, GRIFFITHS, 1985). Eine Fraktur der Tibia/Fibula im Rahmen der Kontusionsverletzung wurde nicht beobachtet. Eine vermehrte Gewichtsabnahme konnte nicht beobachtet werden.

4.2. Makroskopie

Im Zuge der Kontusion stellte sich bei den Versuchstieren am linken Hinterlauf ein Ödem und Hämatom, mit Maximum am ersten postoperativen Tag (siehe Abbildung 25) dar. Im Verlauf manifestierte sich eine langsame Resorption. Optisch ließen sich keine wesentlichen Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit ziehen. Am siebten und vierzehnten postoperativen Tag ließen sich makroskopisch keine Auffälligkeiten mehr erkennen. Die Mäuse wurden post mortem im Zuge der histologischen Explantation des M. gastrocnemius auf eventuelle Pathologien im Bereich der linken Hinterläufe untersucht. Bei keinem der Versuchstiere fanden sich Hinweise auf Weichteil- oder Knocheninfektionen.

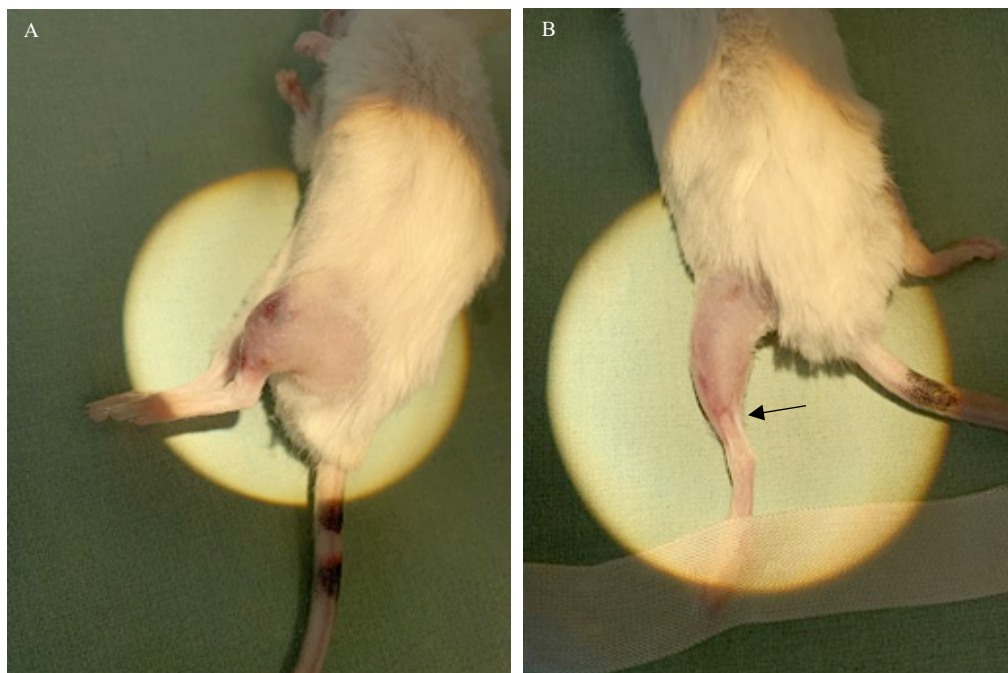


Abb. 25: Maus am ersten postoperativen Tag mit Hämatom an der Verletzungsstelle (A). Das gebildete Ödem komprimiert die Blutversorgung, was sich an der stark sichtbar gefüllten Gefäßgabelung (Pfeil) proximal der Achillessehne zeigt (B)

4.3. Ganganalyse

Der Parameter **Duty_Cycle** ($Duty\ Cycle = (Stand/Stand*Swing) *100$ in Prozent) gibt die Dauer der Standphase als Prozentteil eines Schrittzyklus bestehend aus Schwung- und Standphase wieder. Nachstehendes Diagramm (siehe Abbildung 26) zeigt den Parameter *Duty_Cycle* zu unterschiedlichen Messzeitpunkten (x-Achse). Dargestellt ist der Parameter *Duty_Cycle* als Anteil im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert (y-Achse).

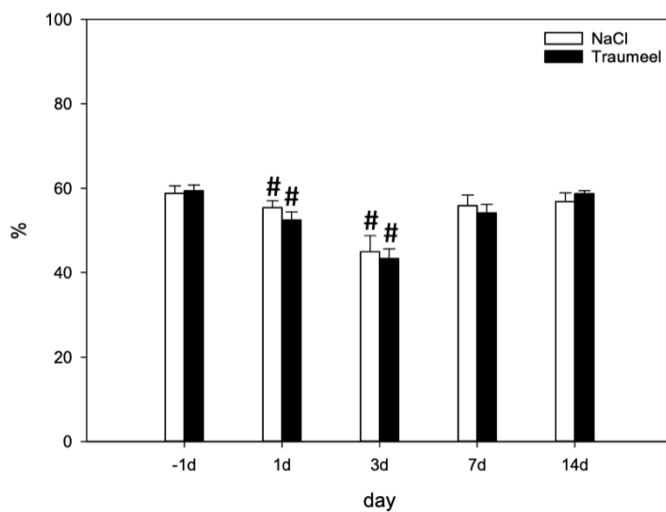


Abb. 26: Parameter *Duty_Cycle* relativ zum Ausgangswert an d=-1 für die Kontroll- und Interventionsgruppe. $p < 0,05$ # vs. d=-1

Beide Gruppen demonstrierten einen Rückgang der Standphase des linken Hinterlaufes und somit einen Rückgang der Prozentwerte im Parameter *Duty_Cycle*. Die Behandlung mit Traumeel zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl die Traumeel- als auch die Kontrollgruppe zeigten einen niedrigeren *Duty_Cycle*-Anteil an Tag eins und drei im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert ($p < 0,05$).

Der Parameter **Print_Area** stellt die Kontaktfläche der Pfote während der Standphase als Anteil des präoperativen Ausgangswertes an d=-1 dar. Entsprechend eines Schonverhaltens wird der verletzte Hinterlauf weniger beansprucht. Abbildung 27 zeigt die *Print_Area* zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (x-Achse) aufgetragen gegen den Anteil an dem präoperativen Ausgangswert.

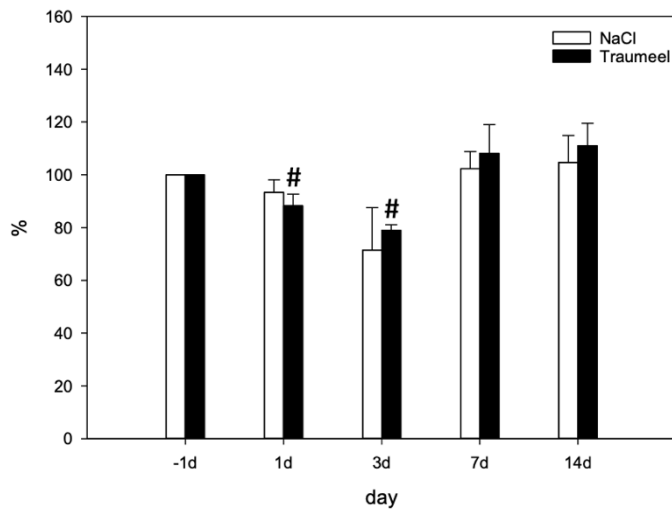


Abb. 27: Parameter *Print_Area* relativ zum Ausgangswert an d=-1 für die Kontroll- und Interventionsgruppe. $p < 0,05$ # vs. d=-1

Beim Vergleich der *Print_Area* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen. Interessant war, dass sich innerhalb der Interventionsgruppe im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Unterschied darstellte. Die Kontaktfläche war bei der Traumeel-Gruppe an den Tagen eins und drei signifikant zum Ausgangswert reduziert ($p < 0,05$).

Der Parameter *MaxContactArea* gibt die maximale Kontaktfläche der Pfote während eines Schrittes in cm^2 wieder und wurde in Prozent des Ausgangswertes von Tag d=-1 berechnet. Im Sinne einer Schonung nimmt die Kontaktfläche bei Verletzung ab. Nachfolgend ist die *MaxContactArea* in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt (siehe Abbildung 28).

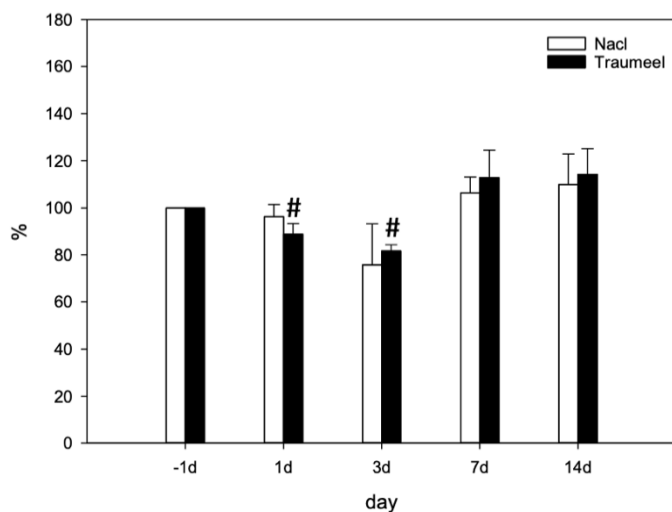


Abb. 28: Parameter *MaxContactArea* relativ zum Ausgangswert an d=-1 für die Kontroll- und Interventionsgruppe. $p < 0,05$ # vs. d=-1

Die Behandlung mit Traumeel erbrachte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hervorzuheben ist, dass die Interventionsgruppe an den Tagen eins und drei einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert zeigte.

Der Parameter *MaxContactMeanIntensity* gibt den mittleren Druck der Pfote auf der Glasplatte an. Der verletzte Hinterlauf wird weniger stark belastet und mit weniger Druck auf dem CatWalk aufgesetzt. Nachstehend wird der Verlauf über die Zeit (x-Achse) des Anteils am präoperativen Ausgangswert (y-Achse) graphisch dargestellt (siehe Abbildung 29).

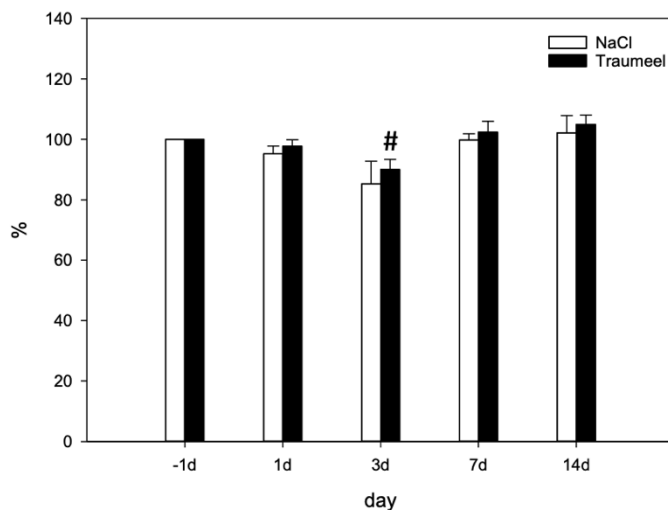


Abb. 29: Parameter *MaxContactMeanIntensity* relativ zum Ausgangswert an d=-1 für die Kontroll- und Interventionsgruppe. $p < 0,05$ # vs. d=-1

Gegenüber der Kontrollgruppe erwies sich die Behandlung mit Traumeel nicht signifikant unterschiedlich bezüglich des Parameters *MaxConactMeanIntensity*. Zu beachten ist, dass sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) innerhalb des zeitlichen Verlaufes in der Interventionsgruppe zeigte. Der Kontrolltag an Tag drei der mit Traumeel behandelten Tiere zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert.

4.4. Muskeldurchmesser

Folgendes Diagramm (siehe Abbildung 30) gibt den **Muskeldurchmesser** als Anteil des präoperativen Ausgangswertes zu den unterschiedlichen Kontrollzeitpunkten wieder.

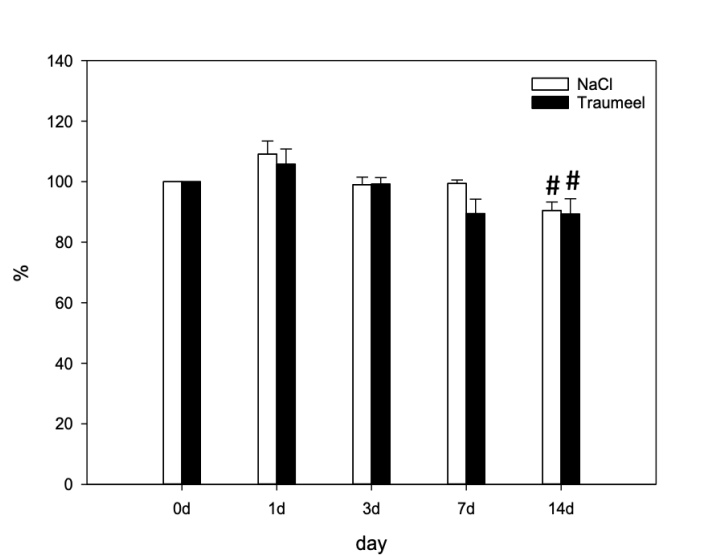


Abb. 30: Daten der Schiebelehre (Dicke) des linken Hinterlaufes Relativ zum Ausgangswert nach Kontusion an d=0 der Kontroll- und Interventionsgruppe. $p < 0,05$ # vs. d=0

Beide Gruppen zeigten zunächst eine Zunahme des Durchmessers ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings zeigte sich in beiden Gruppen an Tag 14 eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) des Durchmessers im Vergleich zum Ausgangswert (d=0) (siehe Abbildung 30).

4.5. Sonographie

4.5.1. Sauerstoffsättigung

Der **Sauerstoffgehalt** (%) SO₂ Av 3D wurde mittels Photoakustik Imaging (PAI) anhand des HbT im untersuchten Muskelbauch ermittelt. In folgenden Diagrammen sind die Werte des Sauerstoffgehaltes anteilig am präoperativen Ausgangswertes dargestellt (Abbildung 31, A-D).

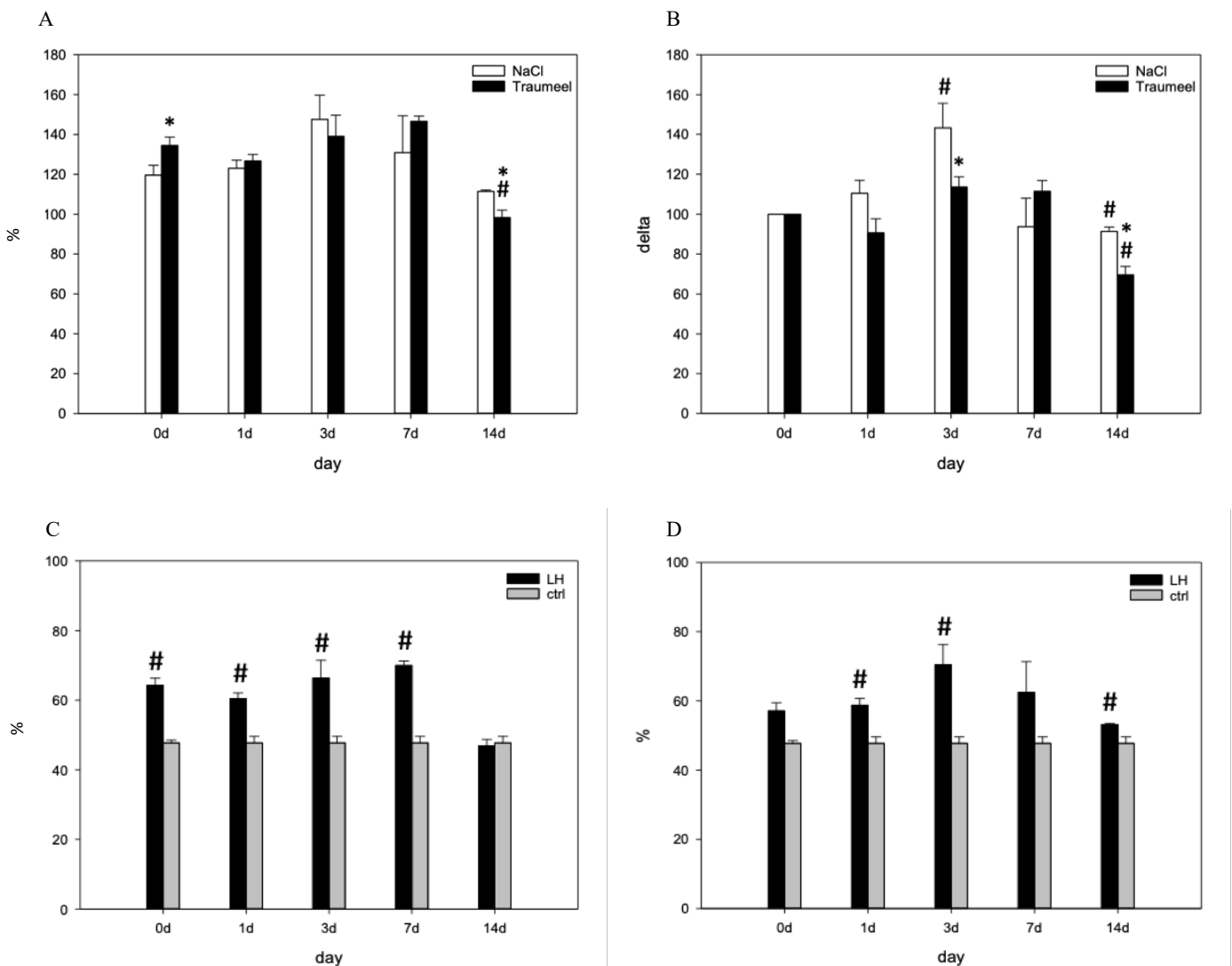


Abb. 31: A) Sauerstoffgehalt SO₂ Av 3D in Prozent des linken Hinterlaufes gemessen an RH der gleichen Mäuse (=100%) der Kontroll- und Interventionsgruppe sowie B) SO₂ Av 3D delta des linken Hinterlaufes gemessen an d=0 als Ausgangswert (=100%) und C) LH und RH der Traumeel Gruppe D) LH und RH der Kontrollgruppe. An den Tagen d=1, d=3, d=7, d=14. p<0,05 * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

Das Diagramm A) vergleicht den gesunden, rechten Hinterlauf der Maus mit dem linken, kontusio- nierten Hinterlauf und stellt die Abnahme des Sauerstoffgehaltes des verletzten Beines als Anteil am gesunden Hinterlauf dar. Der Sauerstoffgehalt wurde anhand des rechten Hinterlaufes als Ausgangs- wert mit 100% berechnet, um den Rückgang zum physiologischen Sauerstoffgehalt (in RH) beider

Gruppen darzustellen. Beim Vergleich beider Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an Tag $d=0$ und Tag 14. Interessanterweise präsentierte sich innerhalb der Interventionsgruppe ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Ausgangswert an Tag 14, wohingegen die Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied zeigte.

Das Diagramm B) vergleicht die linken Hinterläufe im zeitlichen Verlauf als Anteil am präoperativen Ausgangswert. Die Behandlung mit Traumeel zeigte an den Tagen drei und 14 einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl die Traumeel-Gruppe als auch die Kontrollgruppe waren an Tag drei und 14 statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert ($p < 0,05$).

Die Diagramme C) und D) stellen die Abnahme des Sauerstoffgehaltes nach Kontusion beider Gruppen im Vergleich zum Sauerstoffgehalt von rechten Hinterläufen gesunder Kontrollmäuse (ctrl) dar. In der Interventionsgruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) an $d=0$, $d=1$, $d=3$ und $d=7$ zwischen LH und ctrl, wohingegen die Kontrollgruppe an den Tagen eins, drei und 14 signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) waren.

4.5.2. Hämoglobin Threshold

Mittels der Sonographie und Photoakustik (PAI) gelang es, den Hämoglobingehalt als **Hämoglobin Threshold** zu bestimmen. Nachfolgende Diagramme (siehe Abbildung 32 A-D) stellen den Hämoglobingehalt im zeitlichen Verlauf dar.

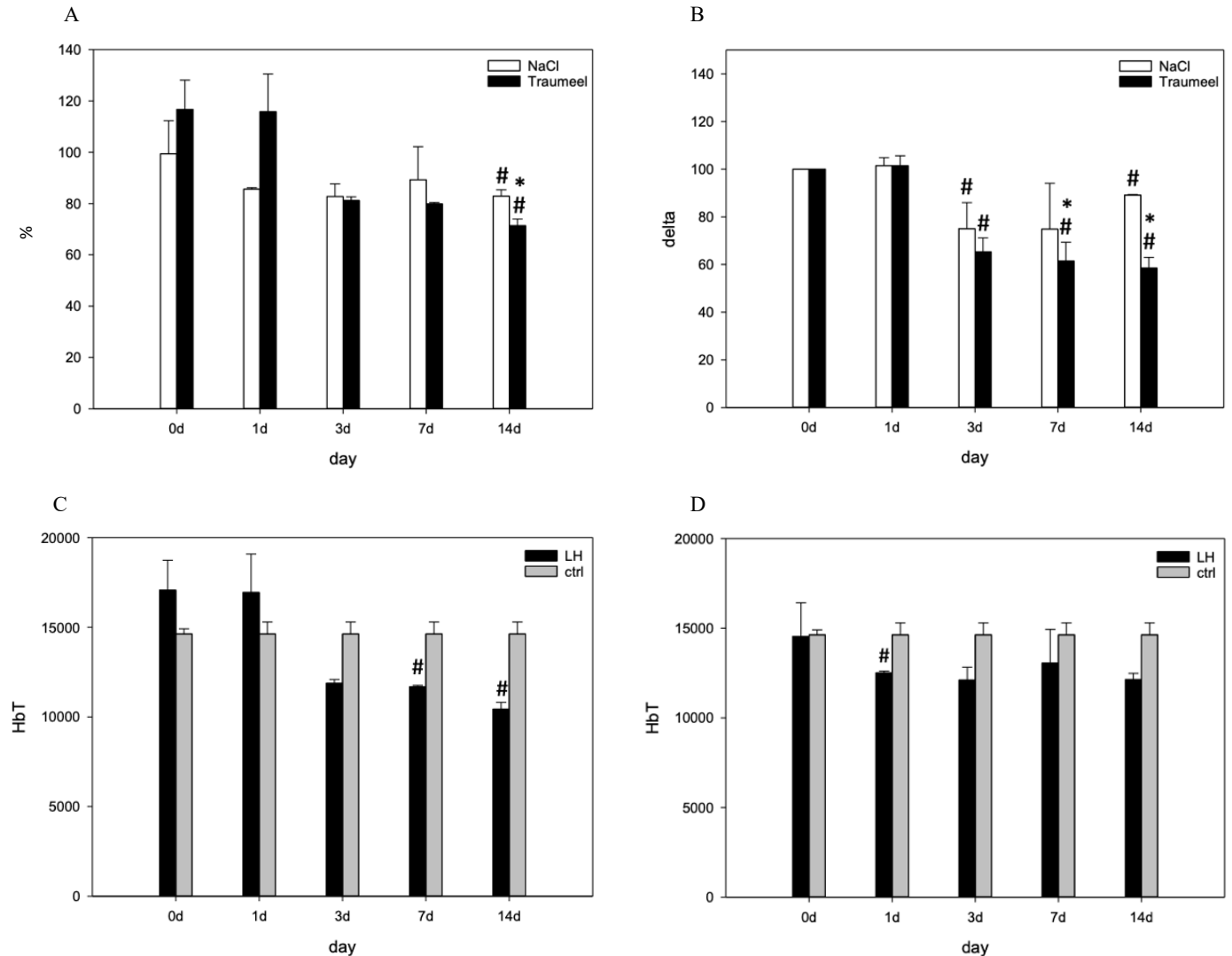


Abb. 32: A) HbT Av 3D in Prozent des linken Hinterlaufes gemessen an RH der gleichen Mäuse (=100%) der Kontroll- und Interventionsgruppe sowie B) HbT Av 3D delta des linken Hinterlaufes gemessen an d=0 als Ausgangswert (=100%) und C) LH und RH der Traumeel-Gruppe D) LH und RH der Kontrollgruppe. An den Tagen d=1, d=3, d=7, d=14. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

Das Diagramm A) vergleicht den gesunden, rechten Hinterlauf der Maus mit dem linken, kontusionierten Hinterlauf und stellt die Abnahme des Hämoglobingehaltes des verletzten Beines als Anteil am gesunden Hinterlauf dar. Zwischen beiden Gruppen ergab sich an Tag 14 ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Sowohl die Kontroll- als auch die Interventionsgruppe waren an Tag 14 statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu d=0.

Das Diagramm B) vergleicht die linken Hinterläufe im zeitlichen Verlauf als Anteil am präoperativen Ausgangswert. Zwischen beiden Gruppen waren die Tage sieben und 14 statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Tag d=3, 7 und 14 präsentierten in der Interventionsgruppe statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu d=0. In der Kontrollgruppe waren die Tage drei und 14 statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu d=0.

Die Diagramme C) und D) stellen den zeitlichen Verlauf des Hämoglobingehaltes nach Kontusion bei der Gruppen im Vergleich zum Hämoglobingehalt von rechten Hinterläufen gesunder Kontrollmäuse dar. Der Parameter HbT präsentierte sowohl innerhalb der Interventionsgruppe an d=7 und d=14 signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) als auch innerhalb der Kontrollgruppe zwischen LH und RH an d=1.

Die Abbildung 33 zeigt exemplarisch die sonographische Darstellung des Muskelbauches am Tag der Kontusion sowie am Kontrolltag d=1. Die Bilder A und C verdeutlichen die Kontrollgruppe, wohingegen die Bilder B und D die Traumeel-Gruppe zeigen. Es ist jeweils der B-Mode dargestellt. Zusätzlich erkennt man die Darstellung der PAI. Hierbei ist die Muskeloxygenierung zu sehen (rot= 100%, blau= 0%). Zwischen dem Tag der Kontusion und dem Kontrolltag sind kaum Unterschiede zu erkennen.

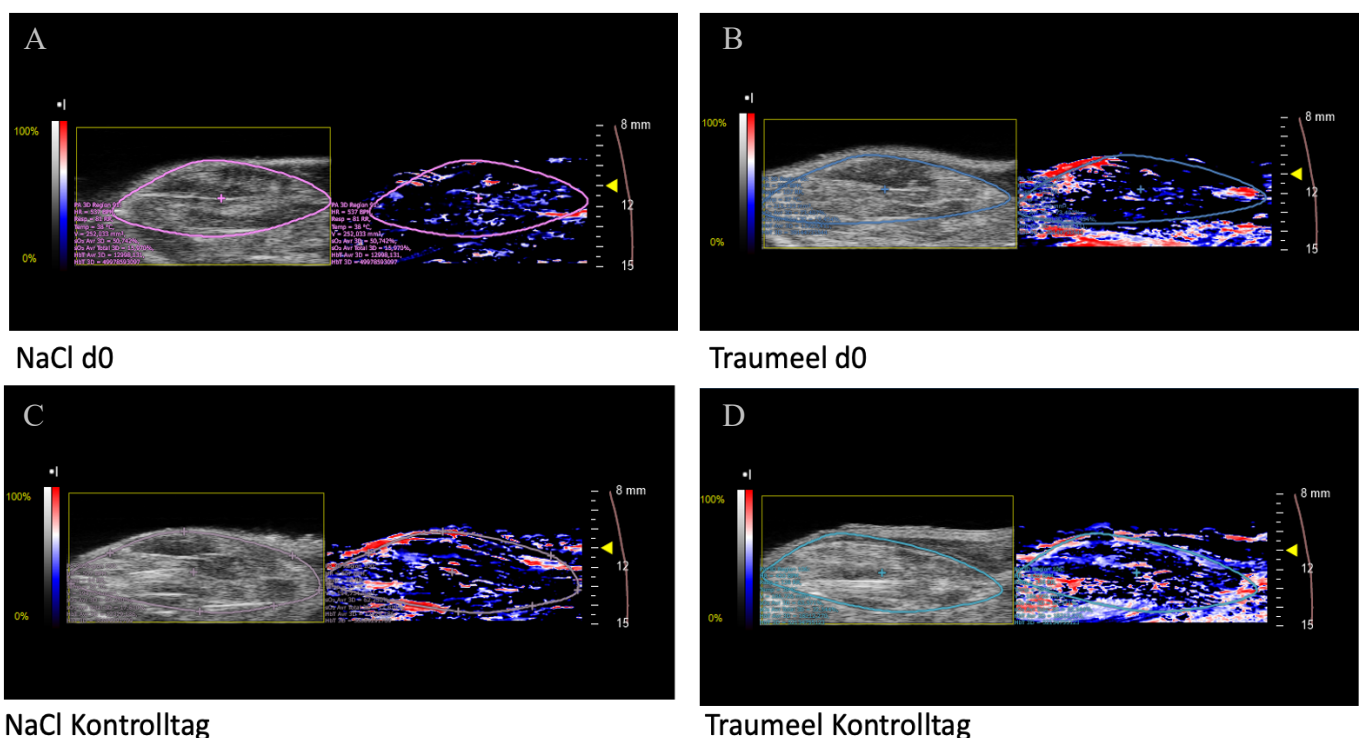


Abb. 33: Kontrollgruppe (A, C) sowie Interventionsgruppe (B, D) jeweils direkt nach Kontusion (A, B) sowie am Kontrolltag nach d=1 Standzeit (C, D). Zu erkennen ist der farblich markierte M. gastrocnemius. Links im Bild ist der B-Mode dargestellt, rechts im Bild das PAI mit Muskeloxygenierung von 0% (blau) bis 100% (rot). Auffällig ist der vermehrte oxygenierte Anteil des Muskels

Die Abbildung 34 zeigt exemplarisch die sonographische Darstellung des Muskelbauches am Tag der Kontusion sowie am Kontrolltag d=3. Gleichermäßen zeigen die Bilder A und C die Kontrollgruppe, wohingegen die Bilder B und D die Traumeel-Gruppe zeigen. Es ist jeweils der B-Mode dargestellt. Zusätzlich erkennt man die Darstellung der PAI. Hierbei ist die Muskeloxygenierung dargestellt (rot = 100%, blau= 0%). Zwischen Tag null und Tag drei lassen sich bereits leichte Unterschiede erkennen.

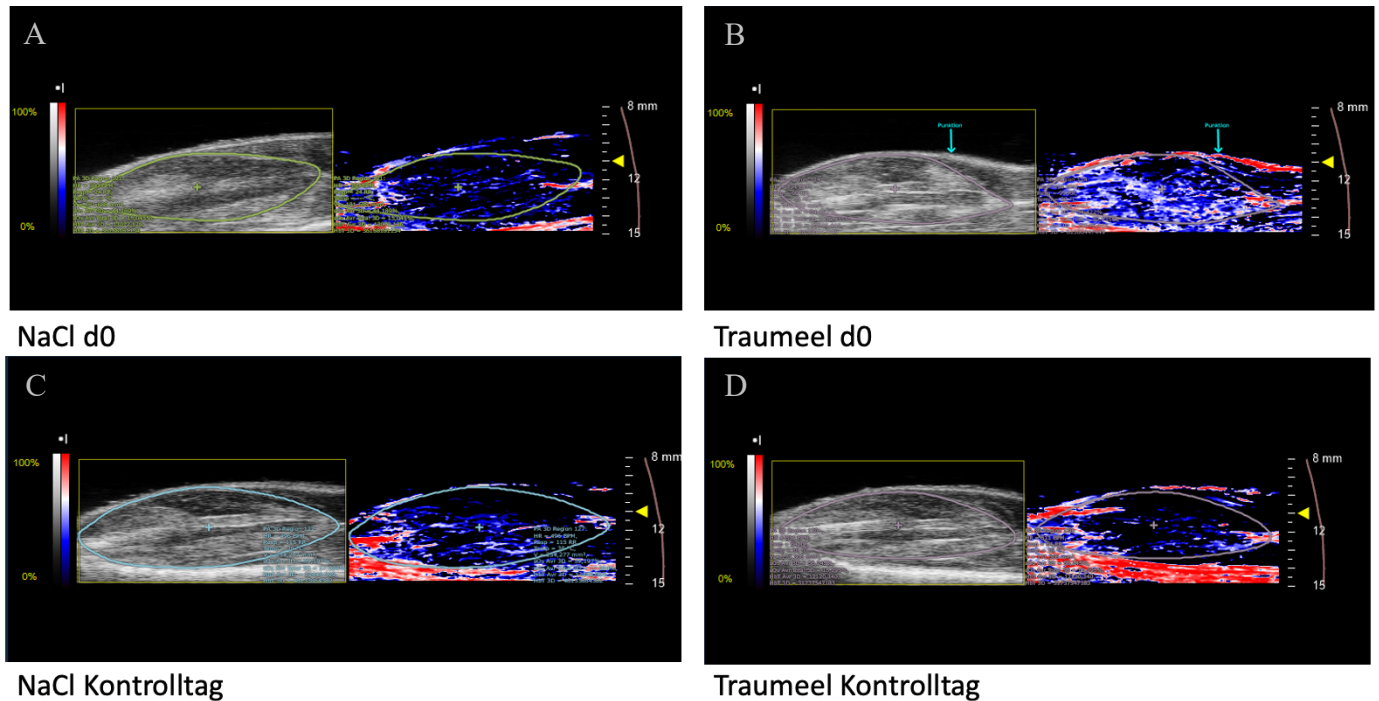
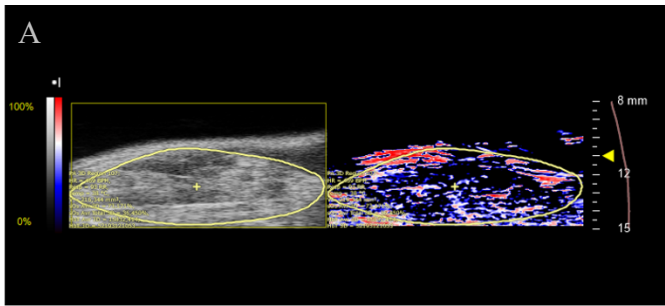
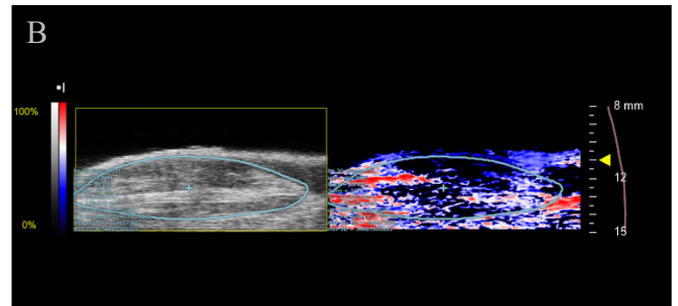


Abb. 34: Kontrollgruppe (A, C) sowie Interventionsgruppe (B, D) jeweils direkt nach Kontusion (A, B) sowie am Kontrolltag nach d=3 Standzeit (C, D). Zu erkennen ist der farbig markierte M. gastrocnemius. Links im Bild ist der B-Mode dargestellt, rechts im Bild das PAI mit Muskeloxygenierung von 0% (blau) bis 100% (rot). Im rechten Bild ist der Punktionskanal markiert, der durch die Injektion mit Traumeel entstanden ist. Auch hier ist noch ein relativ hoher Oxygenierungsgehalt erkennbar

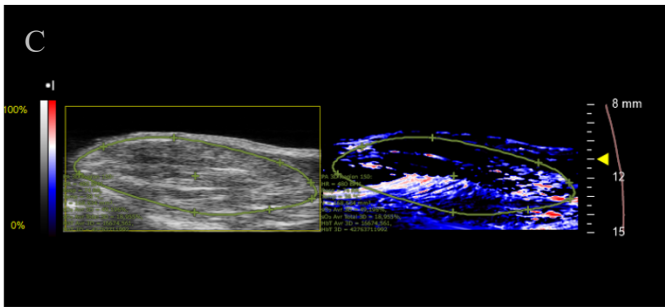
Die Abbildung 35 zeigt exemplarisch die sonographische Darstellung des Muskelbauches am Tag der Kontusion sowie am Kontrolltag d=7. Gleichermäßen zeigen die Bilder A und C die Kontrollgruppe, wohingegen die Bilder B und D die Traumeel-Gruppe zeigen. Es ist jeweils der B-Mode dargestellt. Zusätzlich erkennt man die Darstellung der PAI. Hierbei ist die Muskeloxygenierung dargestellt (rot = 100%, blau= 0%). Zwischen Tag null und Tag sieben lassen sich, vor allem in der PAI, Unterschiede erkennen.



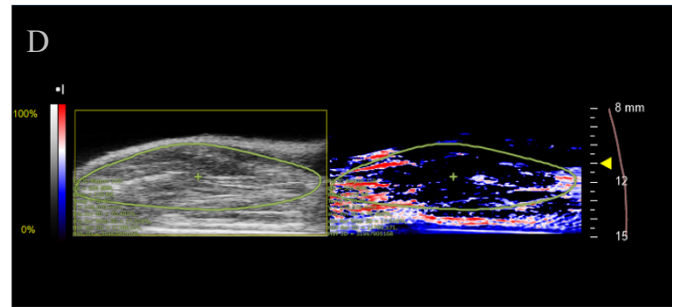
NaCl d0



Traumeel d0



NaCl Kontrolltag



Traumeel Kontrolltag

Abb. 35: Kontrollgruppe (A, C) sowie Interventionsgruppe (B, D) jeweils direkt nach Kontusion (A, B) sowie am Kontrolltag nach d=7 Standzeit (C,D). Zu erkennen ist der farbig markierte M. gastrocnemius. Links im Bild ist der B-Mode dargestellt, rechts im Bild das PAI mit Muskeloxygenierung von 0% (blau) bis 100% (rot). Es zeigen sich weniger oxygenierte Bereiche im Vergleich zum Operationstag

Die Abbildung 36 zeigt exemplarisch die sonographische Darstellung des Muskelbauches am Tag der Kontusion sowie am Kontrolltag d=14. Gleichmaßen zeigen die Bilder A und C die Kontrollgruppe, wohingegen die Bilder B und D die Traumeel-Gruppe zeigen. Es ist jeweils der B-Mode dargestellt. Zusätzlich erkennt man die Darstellung der PAI. Hierbei ist die Muskeloxygenierung dargestellt (rot = 100%, blau= 0%). Zwischen Tag null und Tag vierzehn lassen sich Unterschiede sowohl in der PAI als auch im B-Mode erkennen. Beide Gruppen zeigen anfänglich eine echoarme, oberflächlich gelegene Raumforderung, die sich an Tag 14 weitestgehend abgebaut hat.

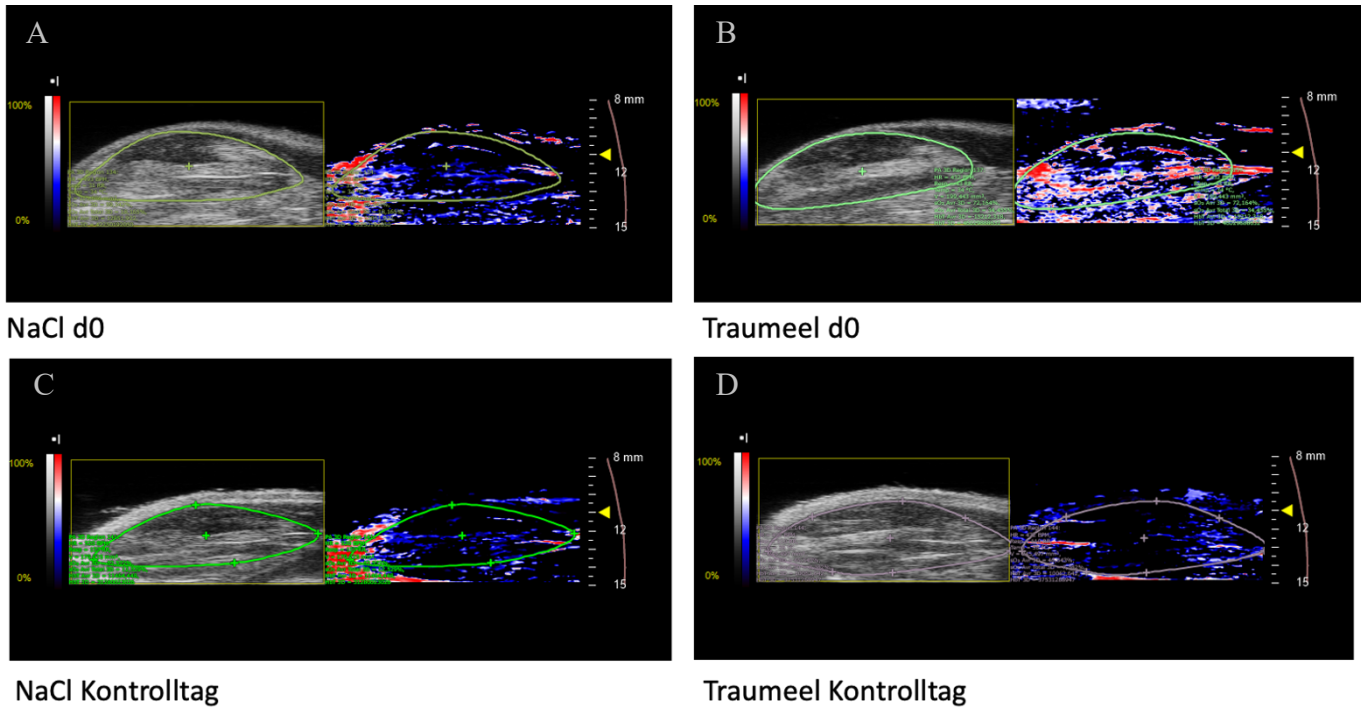


Abb. 36: Kontrollgruppe (A, C) sowie Interventionsgruppe (B, D) jeweils direkt nach Kontusion (A, B) sowie am Kontrolltag nach d=14 Standzeit (C, D). Zu erkennen ist der farbig markierte M. gastrocnemius. Links im Bild ist der B-Mode dargestellt, rechts im Bild das PAI mit Muskeloxygenierung von 0% (blau) bis 100% (rot). Es zeigen sich weniger oxygenierte Bereiche im Vergleich zum Operationstag

4.6. MRT

Mittels MRT gelang es, die **Ödem**resorption zu unterschiedlichen Zeitpunkten darzustellen. Nachfolgendes Diagramm (siehe Abbildung 37) gibt die Ödemresorption zu den unterschiedlichen Standpunkten als Anteil zum präoperativen Ausgangswert wieder.

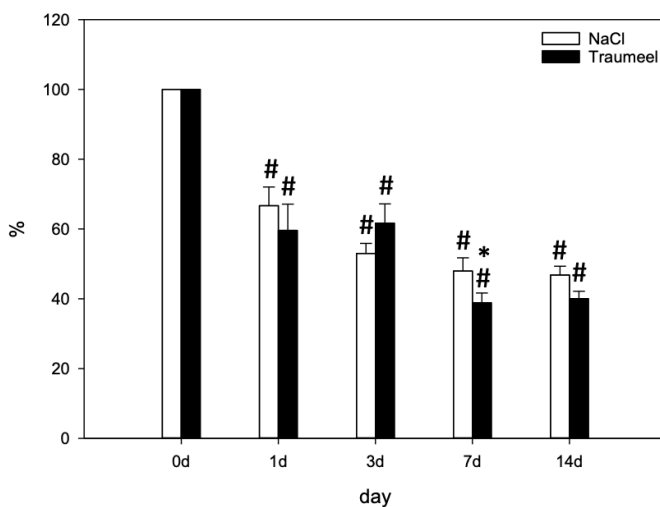


Abb. 37: Ödem relativ zum Ausgangswert der Kontroll- sowie Interventionsgruppe an d=0 an den Tagen d=1, d=3, d=7, d=14. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

Die MRT-Untersuchung lässt eine kontinuierliche Verringerung des Ödems ab dem ersten Tag nach der Intervention in beiden Gruppen erkennen. Die Behandlung mit Traumeel war an Tag sieben statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl die Traumeel-Gruppe als auch die Kontrollgruppe zeigten eine signifikant unterschiedliche ($p < 0,05$) Ödemgröße im Vergleich zum Ausgangswert zu allen Untersuchungszeitpunkten.

Daneben wurde die Resorption des **intramuskulären Ödems** zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (siehe Abbildung 38).

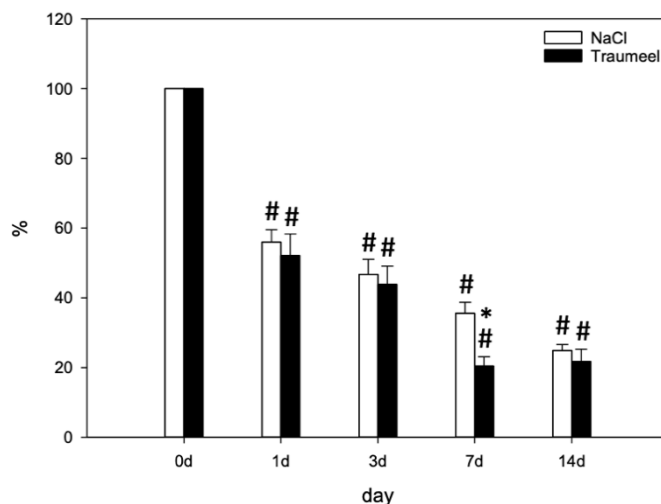


Abb. 38: Intramuskuläres Ödem (%) des linken Hinterlaufes der Kontroll- und Interventionsgruppe an den Tagen d=0, d=1, d=3, d=7, d=14. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

Beim Vergleich des intramuskulären Ödems zeigten sich ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen beiden Gruppen an Tag sieben. Es zeigten sich zudem signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Traumeel und d=0 an den Tagen d=1, 3, 7 und 14 sowie zwischen Kontrollgruppe und d=0 an Tag d=1, 3, 7 und 14.

Des Weiteren wurde der **Umfang** des Muskels im MRT zu den unterschiedlichen Kontrollzeitpunkten gemessen. Nachfolgendes Diagramm (siehe Abbildung 39) zeigt den Umfang des Muskels als Anteil des präoperativen Ausgangswertes zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

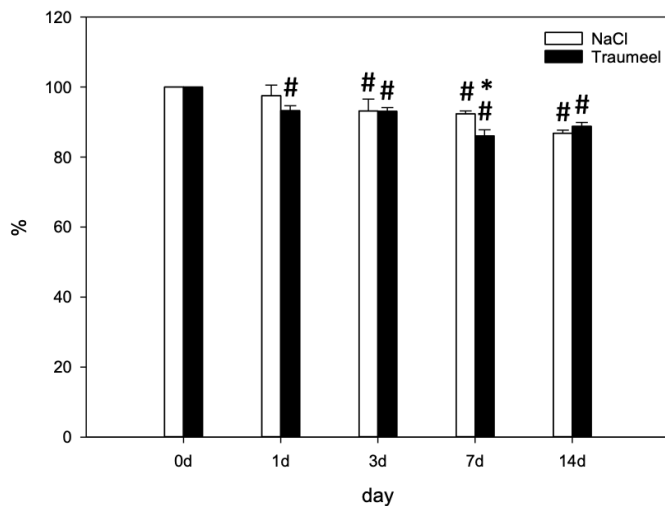
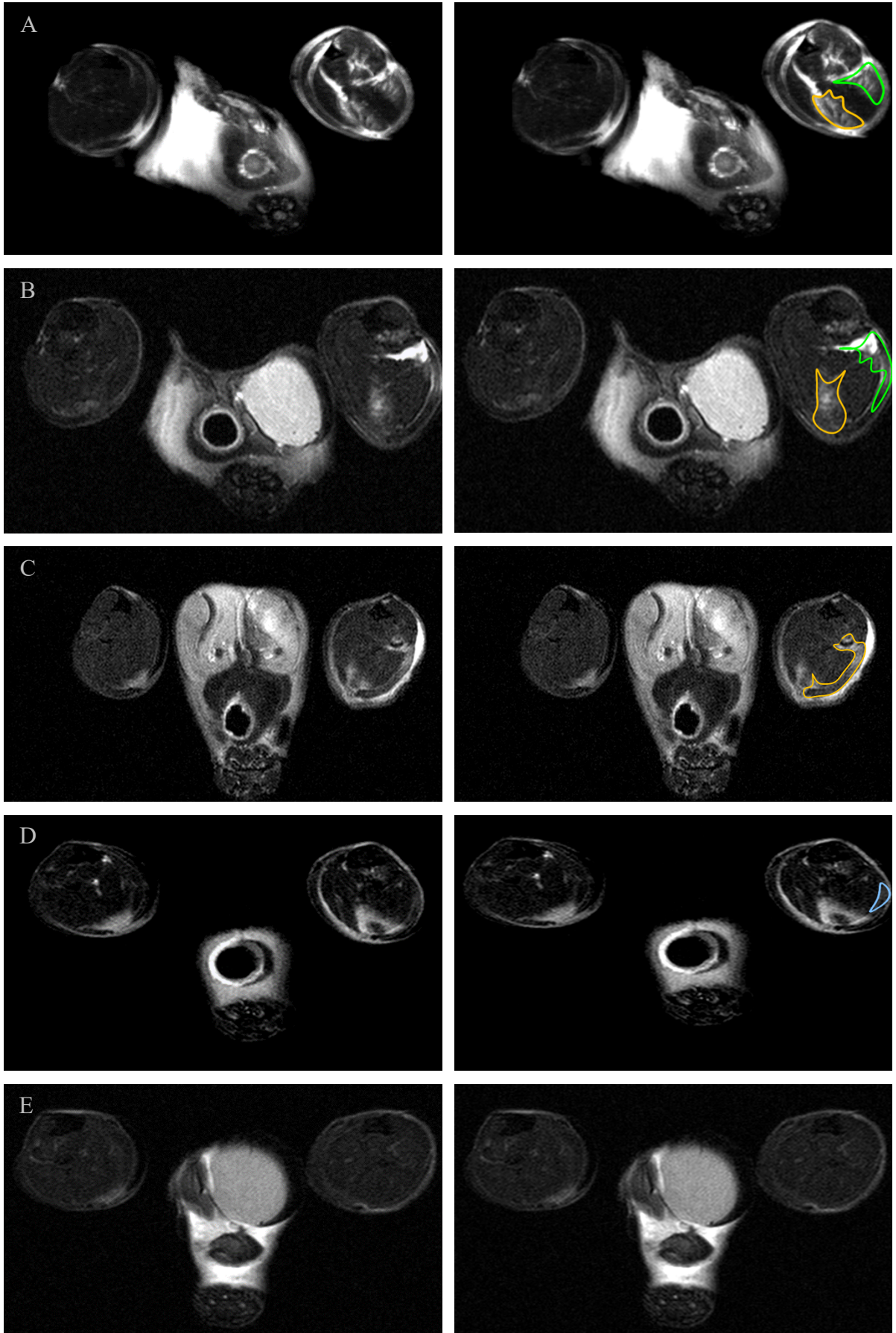


Abb. 39: Umfang relativ zum Ausgangswert der Interventions- sowie Kontrollgruppe an d=0 und an den Tagen d=1, d=3, d=7, d=14. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

Die Umfangsmessung erfolgte ebenfalls mittels MRT und wurde in Prozent des Ausgangswertes an d=0 umgerechnet (siehe Abbildung 39, Tabelle 4). Zwischen beiden Gruppen gab es einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) an d=7. Beide Gruppen zeigten einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert an den Tagen d=3, 7 und 14. Interessanterweise zeigte Traumeel bereits an Tag eins einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert.

Um die Ergebnisse zu visualisieren, wurden exemplarisch Transversalbilder ausgewählt (siehe Abbildung 40). Zu sehen sind jeweils die Operationstage an d=0 mit dem posttraumatischen intramuskulären Ödem. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Tag eins bis Tag 14. Das rechte Bild zeigt jeweils die markierten, hyperintensiven ROI's, bei denen die Kontusionsstelle zu erkennen ist. A-E zeigt die MRT-Bilder der Kontrollgruppe, wohingegen F-J die Bilder der Traumeel-Gruppe zeigt. Bei den Gruppen mit einer Standzeit von einem Tag ist die kontusionierte Stelle noch stark hyperintens. Der markierte Bereich der Verletzung hat sich kaum verkleinert. Optisch ist zwischen Interventions- und Kontrollgruppe kein Unterschied zu erkennen. Auch an Tag drei unterscheiden sich die Gruppen kaum. Der Kontusionsbereich ist etwas kleiner. Ab Tag d=7 ist in der Traumeel-Gruppe am Kontrolltag keine Kontusionsstelle mehr erkennbar. Bei der Kontrollgruppe ist erst ab dem vierzehnten Tag keine Verletzung mehr zu sehen.



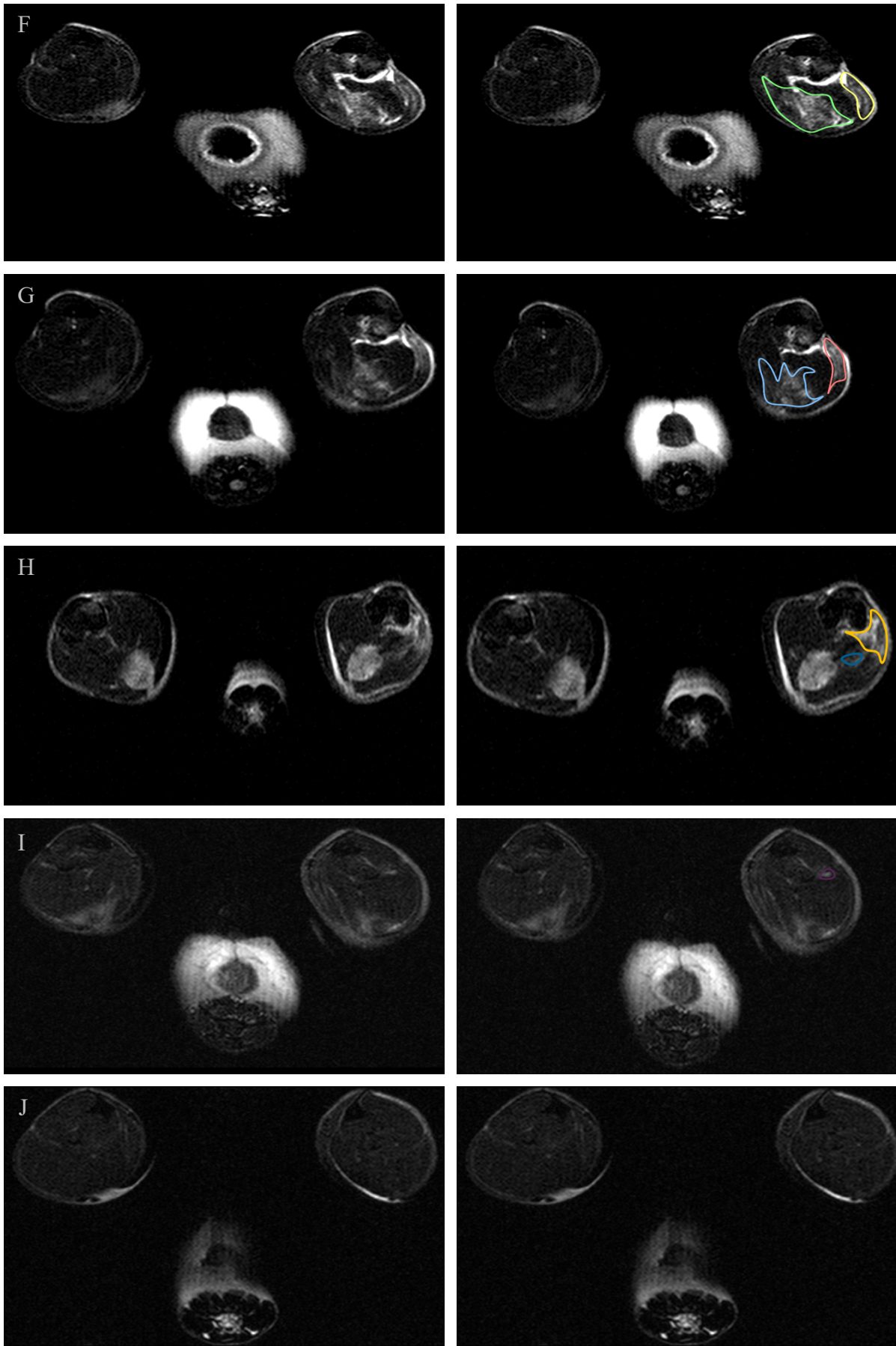


Abb. 40: Axiales MRT-Bild der Kontrollgruppe (A-E) und Interventionsgruppe (F-J) jeweils am Operationstag (A und F) sowie Kontrolltag mit einer Standzeit von d=1 (B und G), d=3 (C und H), d=7 (D und I) und d=14 (E und J). Im rechten Bildbereich sind die hyperintensiven ROI's markiert, bei denen die Kontusionsstelle zu erkennen ist

4.7. Histologie

Mittels Histologie gelang es, die Entzündungsreaktion wie auch die beteiligten inflammatorischen Zellen näher zu untersuchen.

4.7.1. HE

Mit Hilfe der **HE-Färbung** gelang es die beschädigten Muskelschnitte histologisch zu analysieren, Nekrosen darzustellen und Zellkerne, Muskelfasern sowie Erythrozyten zu beurteilen. Nachfolgendes Diagramm (siehe Abbildung 41) zeigt die Zellzahl pro Gesichtsfeld der HE-Färbung zu unterschiedlichen Standzeiten. Abbildung 41-44 demonstriert exemplarisch Muskelschnitte der HE-Färbung beider Gruppen an d=0 und Schnitte der Kontrollgruppe sowie Interventionsgruppe an den Kontrolltagen.

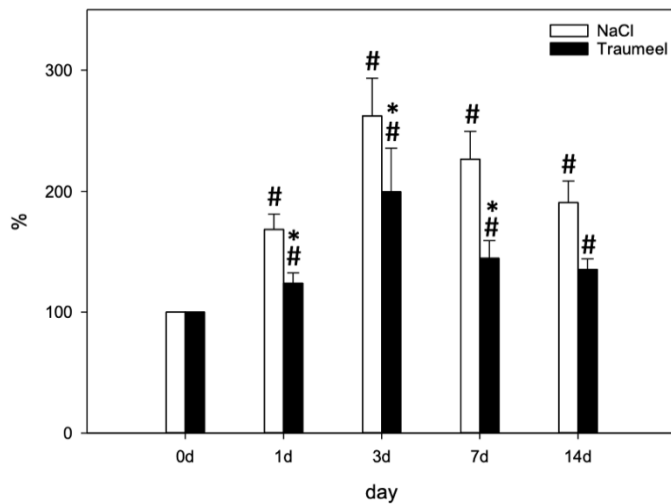


Abb. 41: Zellzahl in Zellen/Gesichtsfeld der HE-Färbung der linken Hinterläufe der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe Relativ zum Ausgangswert an d=0. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

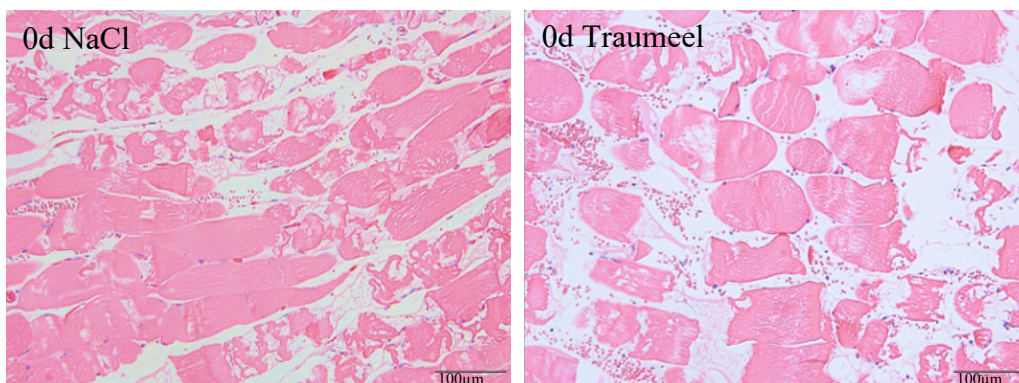


Abb. 42: Tag 0d der Kontroll- und Interventionsgruppe. HE-Färbung

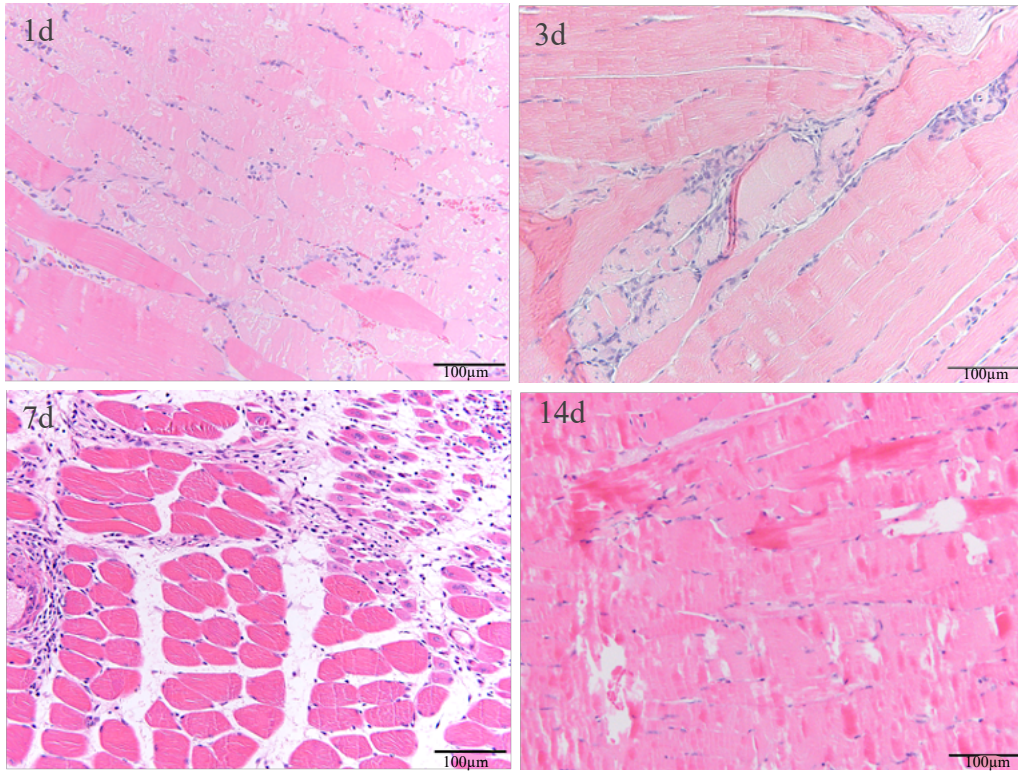


Abb. 43: Kontrollgruppe HE-Färbung an den Tagen, 1d, 3d, 7d und 14d

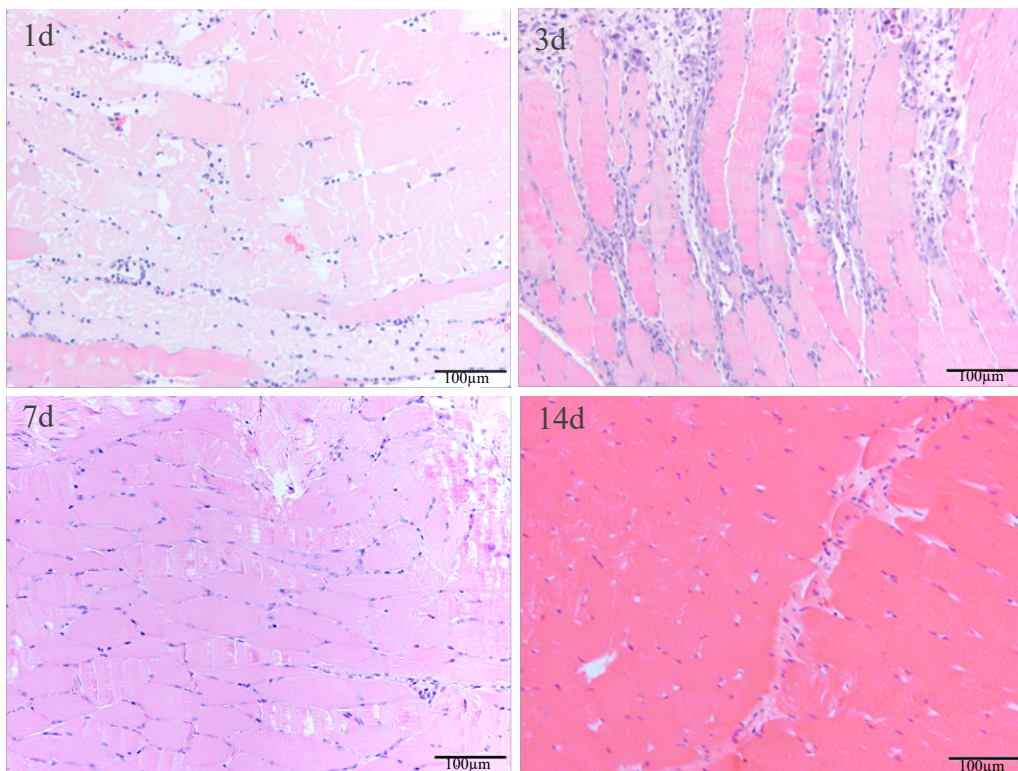


Abb. 44: Interventionsgruppe HE-Färbung an den Tagen 1d, 3d, 7d und 14d

Die quantitative Analyse mit Hilfe der HE-Färbung (siehe Abbildung 44) präsentierte an den Tagen d=1, d=3 und d=7 statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen beiden Gruppen. Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen d=0 und allen Kontrolltagen bei beiden Gruppen.

Abbildung 42-43 demonstriert exemplarisch Muskelschnitte beider Gruppen an d=0 und Schnitte der Kontrollgruppe an den Kontrolltagen. Direkt nach Kontusion sind Zelltrümmer zu erkennen. Die Muskelfasern sind zerstört. Es zeigt sich eine Vielzahl an Erythrozyten zwischen den destruierten Myozyten sowie im gesamten Muskelschnitt. Der interzelluläre Abstand ist erweitert. Das Synzytium ist zerstört. Am Tag eins sind vor allem Nekrosen zu erkennen. Die Inflammationsreaktion beginnt ab Tag eins und hat am Tag drei ihren Höhepunkt mit Makrophagen und Regeneration der Myoblasten.

Durch die Anoxie und mechanische Schädigung kommt es zur Nekrose und zum Untergang von Muskelzellen. Die Zellen wirken balloniert. Ihre Zellkerne sind schwer zu erkennen. Zwischen den Muskelzellen sind basophile Zellkerne zu identifizieren. Die Erythrozyten sind beinahe komplett verschwunden. Lediglich vereinzelt finden sich noch destruierte Myozyten. Der Zellzwischenraum ist immer noch vergrößert. Am dritten Tag ist der Zellzwischenraum wieder schmaler. Die basophilen Zellkerne sind zwischen den Muskelzellen konzentriert. Auch am Tag sieben ist die Kontusionszone durch die hohe Anzahl an basophilen Zellkernen gut zu erkennen. Teilweise sind die Zellzwischenräume mit bindegewebigem Ersatzgewebe aufgefüllt. Am Tag 14 ist keine Kontusionszone mehr zu unterscheiden. Vereinzelt lassen sich zentrale Zellkerne ausmachen. Die Zellzwischenräume sind kaum festzustellen. Das Synzytium ist weitestgehend wiederhergestellt.

In den Beispielbildern der Traumeel-Gruppe (Abbildung 42 und 44) unterscheidet sich der Tag null kaum von der Aufnahme der Kontrollgruppe. Am ersten Tag sind gleichermaßen vergrößerte Muskelzellen und erweiterte Zellzwischenräume zu erkennen. Das Synzytium ist unterbrochen und wird von basophilen Zellen bewandert. Ab Tag drei ist die Läsionsstelle gut durch die Konzentration von basophilen Zellkernen zu unterscheiden, die in die verletzte Stelle eingewandert sind. In den Schnitten von Tieren mit sieben Tagen Standzeit sind kaum noch basophile Zellen zu identifizieren. Der erweiterte Zellzwischenraum ist verkleinert. Am Tag 14 ist das Synzytium wiederhergestellt.

Das Trauma nebst im MRT dargestellten Kontusionsherden sind histologisch verifizierbar und die in einschlägiger Literatur beschriebenen histologischen Veränderungen sind in den angefertigten mikroskopischen Aufnahmen gut erkennbar.

4.7.2. CD68

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung **CD68** gelang es, die Zellen weiter zu spezifizieren und die Makrophagen darzustellen. Abbildung 45 zeigt die Zellzahl in Zellen pro Gesichtsfeld der CD68 positiven Zellen zu unterschiedlichen Standzeiten. Weiter sind exemplarisch Muskelschnitte gewählt, um den postinterventionellen Verlauf zu skizzieren (siehe Abbildung 46-48)

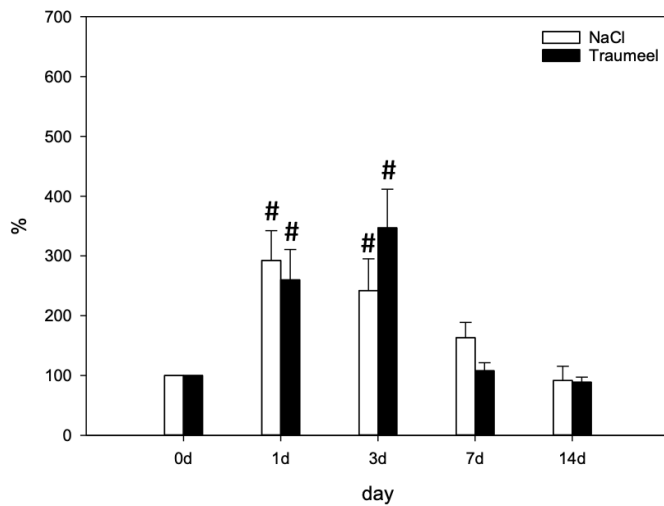


Abb. 45: Zellzahl in Zellen/ Gesichtsfeld der CD68 Färbung der linken Hinterläufe der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ zum Ausgangswert an d=0. $p < 0,05$ # vs. d=0

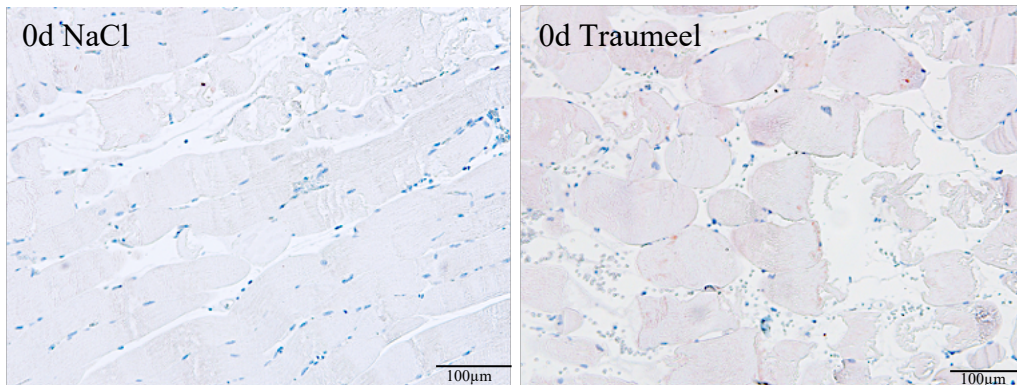


Abb. 46: Tag 0d der Kontroll- und Interventionsgruppe. CD68

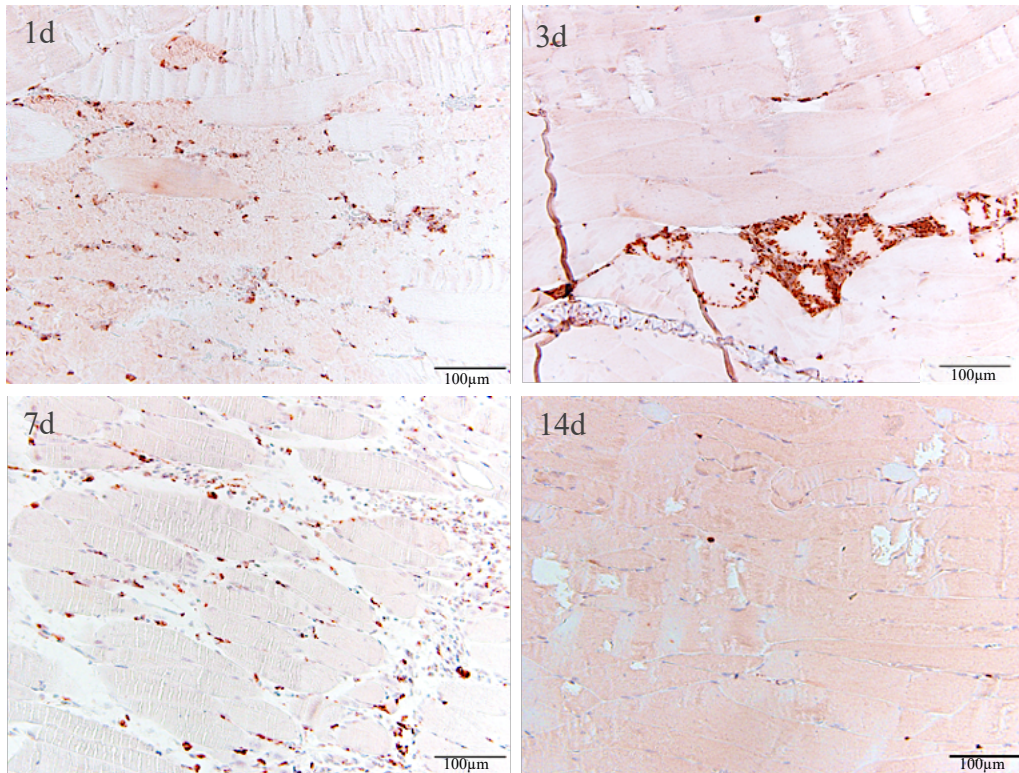


Abb. 47: Kontrollgruppe CD68 Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

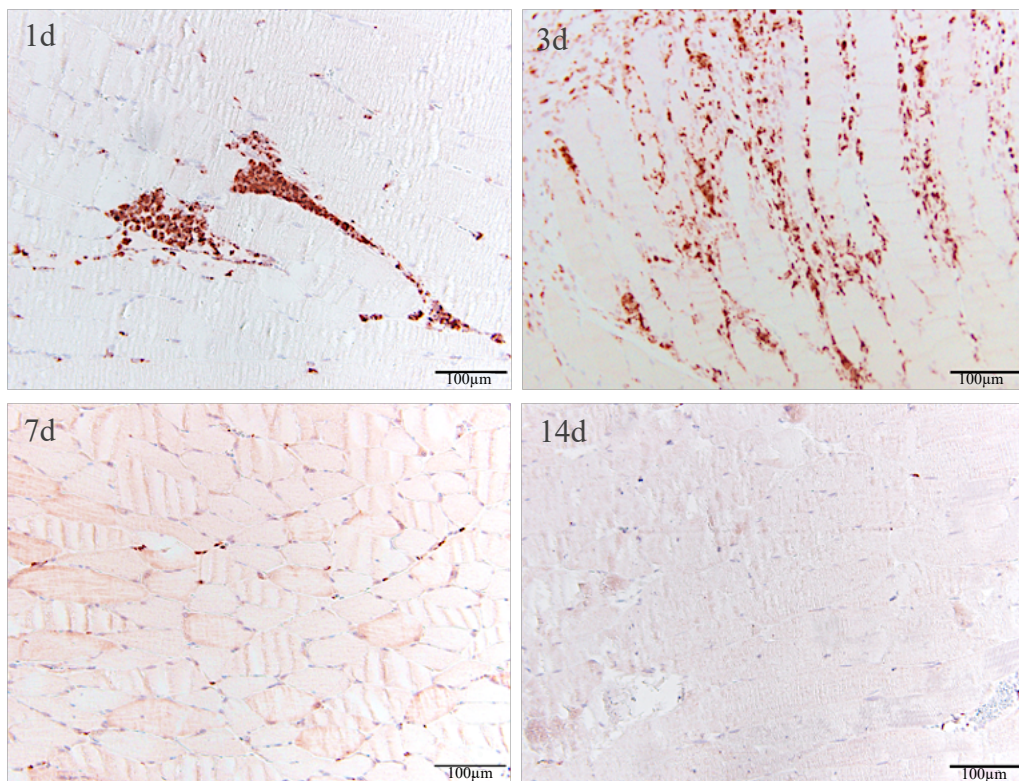


Abb. 48: Interventionsgruppe CD68 Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

Vergleicht man Muskelschnitte der verletzten Hinterläufe der Kontrollgruppe mittels CD68-Färbung (siehe Abbildung 45) miteinander, so erkennt man keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Die Behandlung mit Traumeel sowie die Injektion mit NaCl zeigten einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu $d=0$ an den Tagen eins und drei. Interessanterweise präsentierte Traumeel jedoch an Tag drei eine höhere Zellzahl.

Abbildung 46-48 zeigt exemplarisch die bereits in der HE-Färbung dargestellten Ausschnitte der Muskelschnitte in der CD68-Färbung. Tag null zeigt vereinzelt CD68 positive Zellen sowie die bereits in HE-Färbung erkenntlichen Degenerationsprozesse. Man erkennt ebenfalls die ballonierten Zellen sowie erweiterte Zellzwischenräume im Kontusionsherd an Tag eins.

Mittels CD68-Färbung ist es möglich, die Zellen als Makrophagen, die beginnen in die Verletzungszone einzuwandern, zu identifizieren. An Tag drei nach Kontusion konzentrieren sich die Makrophagen in den Muskelschnitten der Kontrollgruppe (Abbildung 47) an der Verletzungszone und umgeben einzelne Muskelzellen, um mit der Phagozytose zu starten. Tag sieben zeigt noch erweiterte Zellzwischenräume, die teilweise von Makrophagen besiedelt sind, teils mit Bindegewebe gefüllt. An Tag 14 sind kaum CD68 gefärbte Zellen zu erkennen.

Auch in den Beispielabbildungen der Präparate der Interventionsgruppe (Abbildung 48) kommt der Kontusionsherd analog zu den HE-Färbungen mit ballonierten, teils nekrotischen Zellen, die von CD68 positiven Zellen besiedelt worden sind, zum Ausdruck. Das histologische Bild an Tag drei demonstriert einprägsam, wie stark die Makrophagen in den Kontusionsherd eingewandert sind. Die Muskelzellen werden phagozytiert und von CD68 positiven Zellen überwuchert. An Tag sieben und 14 sind auch in den als Beispiel gewählten Bildern kaum positive Zellen auszumachen.

4.7.3. Caspase-3

Mit Hilfe der **Caspase-3** Färbung gelingt es, die apoptotischen Zellen darzustellen. Folgend ist in Abbildung 49 die Zellzahl pro Gesichtsfeld der Caspase-3 positiven Zellen zu unterschiedlichen Standzeiten dargestellt. Ebenso finden sich, exemplarisch dargestellt, die Muskelschnitte beider Gruppen in der Abbildung 50-52.

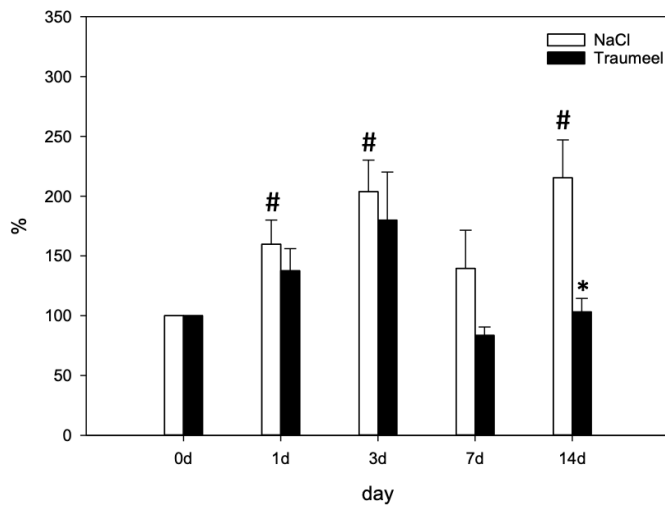


Abb. 49: Zellzahl in Zellen/ Gesichtsfeld der Caspase-3 Färbung der linken Hinterläufe der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ zum Ausgangswert an d=0. $p < 0,05$ * vs. Kontrollgruppe, # vs. d=0

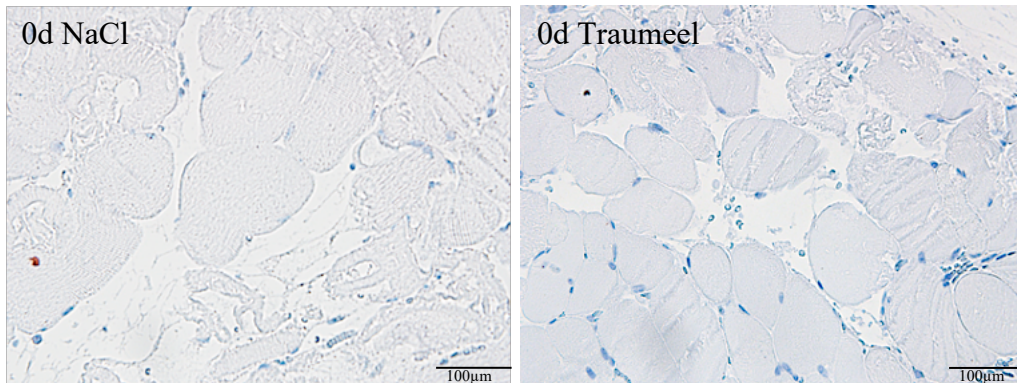


Abb. 50: Tag 0d der Kontroll- und Interventionsgruppe. Caspase-3 Färbung

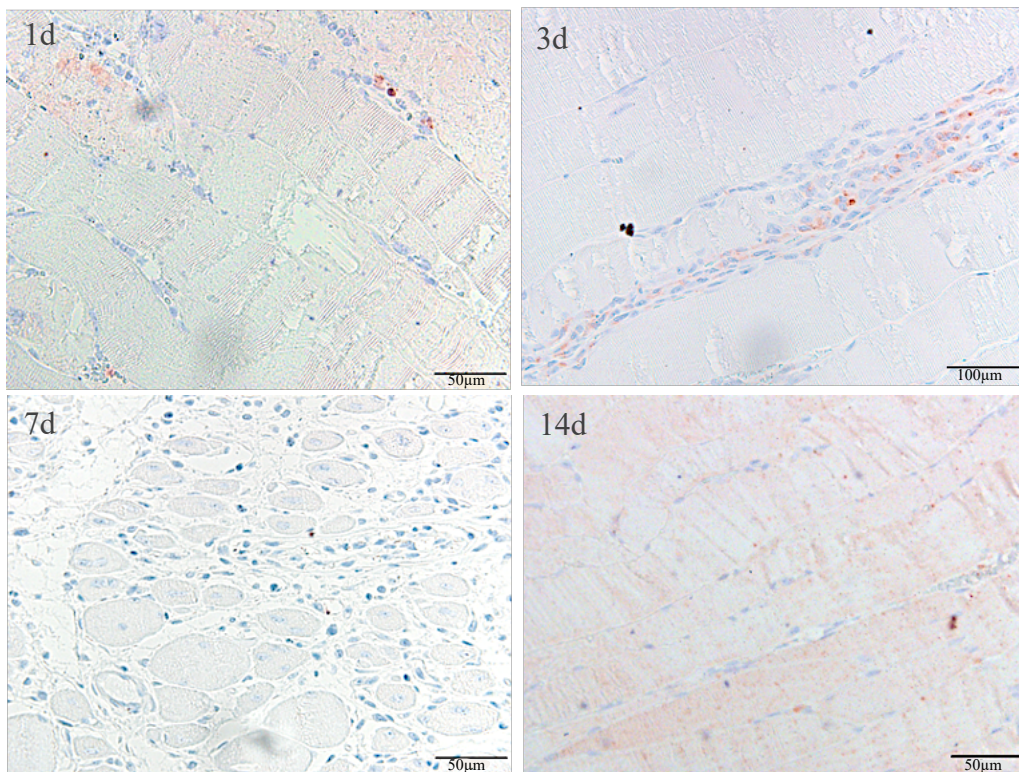


Abb. 51: Kontrollgruppe Caspase-3 Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

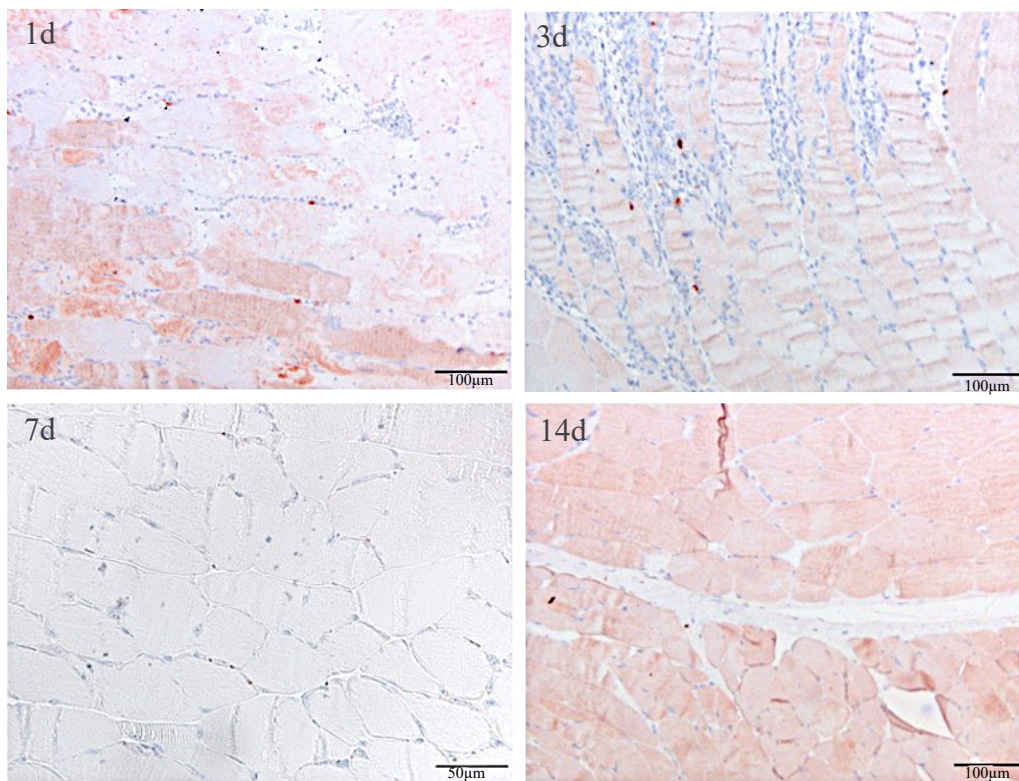


Abb. 52: Interventionsgruppe Caspase-3 Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

Die Behandlung mit Traumeel zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag $d=14$. Innerhalb der Traumeel-Gruppe zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu $d=0$. Interessanterweise ergab sich innerhalb der Kontrollgruppe für $d=1$, $d=3$ und $d=14$ ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zum Interventionstag an $d=0$.

Abbildung 50 zeigt exemplarische Ausschnitte der Präparate der Kontrollgruppe und Interventionsgruppe. In Abbildung 51 sind Beispielbilder der Präparate der Kontrollgruppe zu sehen. Während an Tag $d=0$, $d=1$ und $d=7$ kaum Caspase-3 positive Zellen zu erkennen sind, so präsentieren sich an Tag $d=3$ und $d=14$ gelegentlich positive Zellen, die bei Schnitten von Versuchstieren mit einer Standzeit von $d=3$ gruppiert zu erkennen sind. In der Abbildung 52 kann man an Tag eins, besonders aber an Tag drei eine Vielzahl von Caspase 3 positiven Zellen identifizieren. Die beispielhaft gewählten Ausschnitte der Muskelpräparate an Tag null, sieben und 14 lassen nur schwer ein positives Signal feststellen.

4.7.4. MPO

Mit Hilfe der **MPO**-Färbung war es möglich die Neutrophilen darzustellen. Abbildung 53 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. Zu sehen ist die Zellzahl pro Gesichtsfeld aufgetragen gegen die unterschiedlichen Standzeiten der Versuchstiere. Abbildung 54-56 zeigt die dazu passenden Beispielbilder der histologischen Muskelschnitte der Kontroll- und Interventionsgruppe.

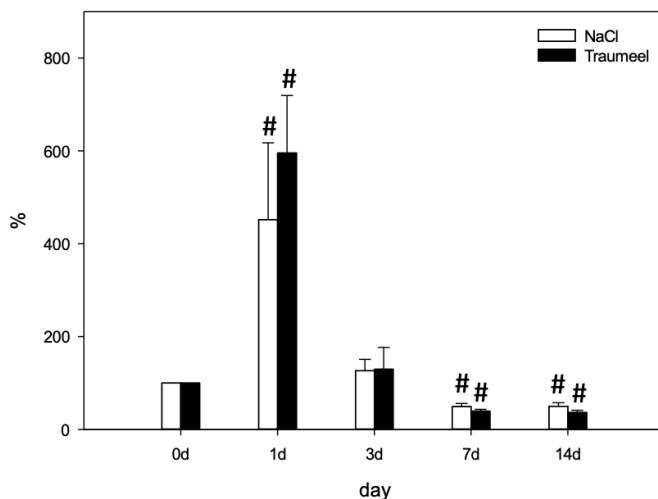


Abb. 53: Zellzahl in Zellen/ Gesichtsfeld der MPO-Färbung der linken Hinterläufe der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ zum Ausgangswert an $d=0$. $p < 0,05$ # vs. $d=0$

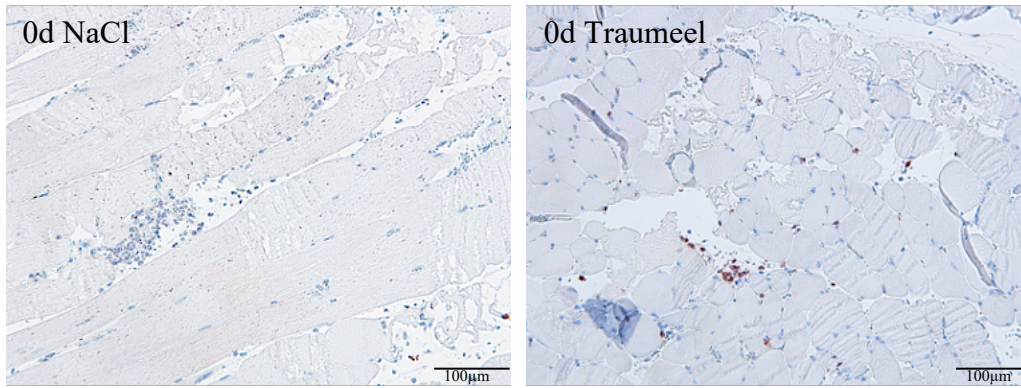


Abb. 54: Tag 0d der Kontroll-und Interventionsgruppe. MPO-Färbung

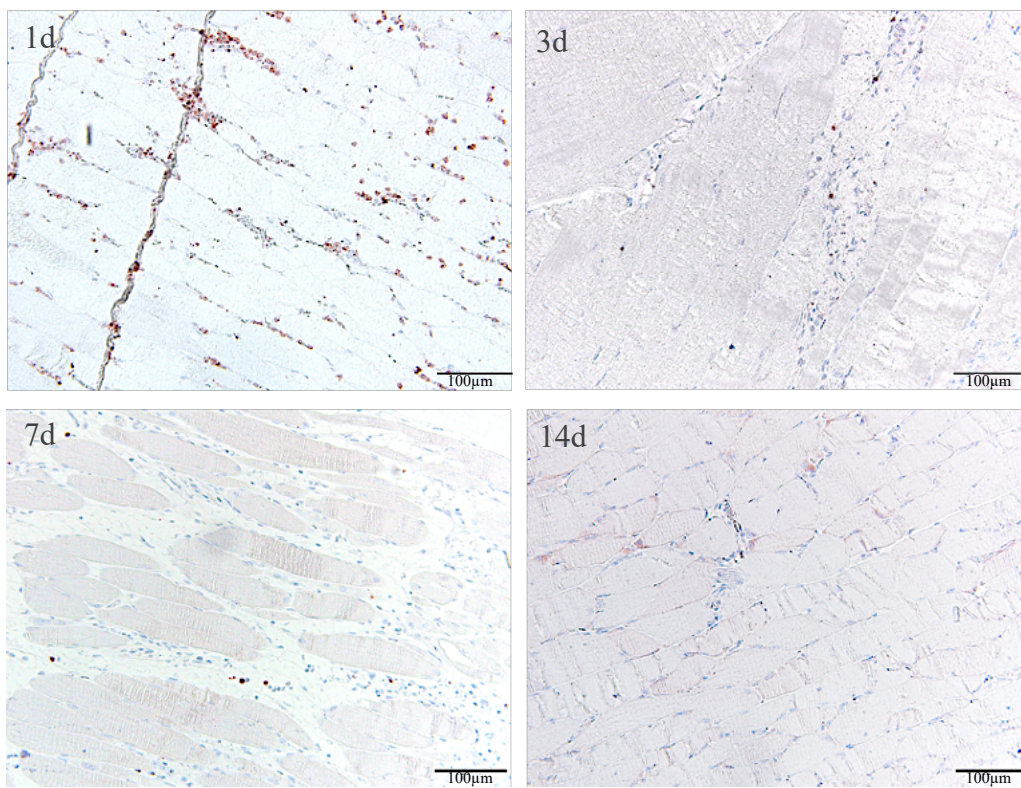


Abb. 55: Kontrollgruppe MPO-Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

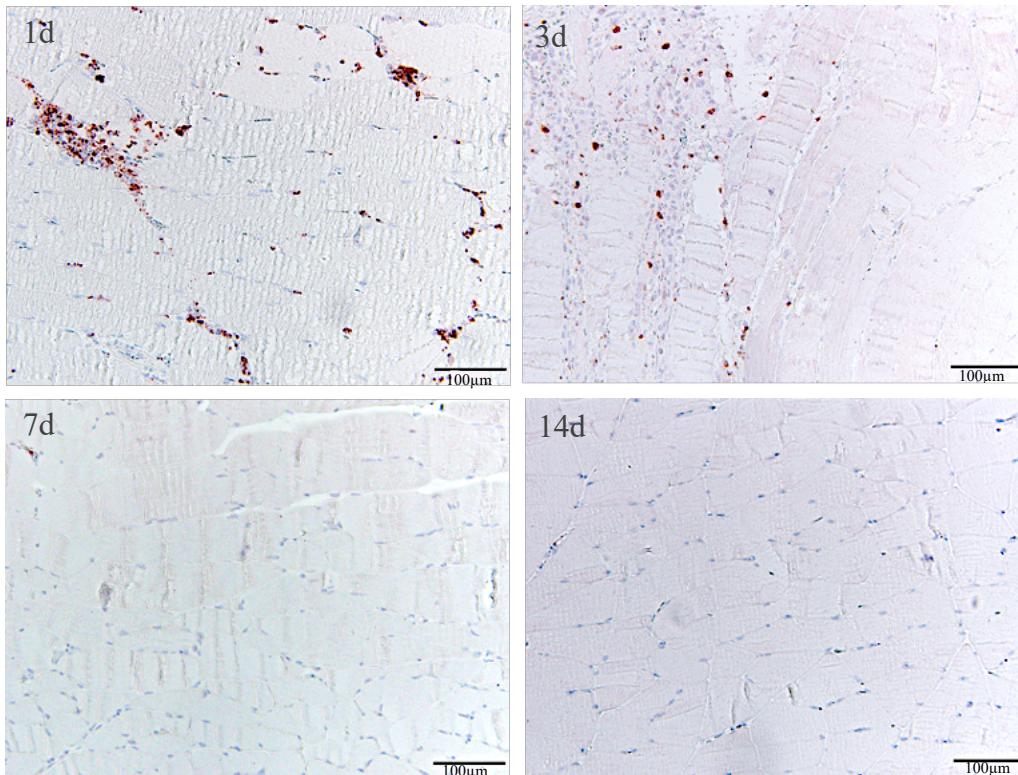


Abb. 56: Interventionsgruppe MPO-Färbung an den Tagen 0d, 1d, 3d, 7d und 14d

Beim Vergleich der MPO positiven Zellen (siehe Abbildung 53) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Beide Gruppen wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) an Tag eins, sieben und 14 im Vergleich zu $d=0$ auf.

Abbildung 54 zeigt Kontroll- und Interventionsgruppe an Tag null. Betrachtet man die mikroskopisch angefertigten Bildausschnitte in Abbildung 54 und 55, so stellt man vor allem am ersten Tag ein stark positives Signal in der MPO-Färbung fest. An den Tagen $d=0, 3, 7, 14$ waren kaum positiv markierte Zellen zu erkennen. Analog zur Kontrollgruppe lassen sich in der Interventionsgruppe in Abbildung 56 nur im Bildausschnitt von $d=1$ MPO positive Zellen gut erkennen.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

Diese Arbeit analysierte die Wirkung von Traumeel mit nur einer definierten Dosis und Injektion. Somit kann keine Aussage über die Effekte höherer Dosierung oder wiederholter Gabe gemacht werden, welche zum Teil im klinischen Alltag eingesetzt werden (BELIKAN et al., 2020; HOTFIEL et al., 2018b).

5.1.1. Kontusionsmodell

Verschiedene Studien befassen sich mit Modellen zur Muskelregeneration, welche sich durch unterschiedliche Verletzungsmodelle zum Teil erheblich unterscheiden. Da eine typische Sportverletzung untersucht werden sollte, wurde das am nächsten an der klinischen Fragestellung stehende Kontusionsmodell verwendet (FUKADA et al., 2010; MAHDY, 2018). Andere Modelle wie chemische (Lokalanästhetika, Toxine und diverse chemische Stoffe) oder ischämische Modelle (FORCINA et al., 2020) wären zur Beantwortung der Fragestellung nicht passend gewesen.

Bei allen Kontusionsmodellen wird das Gewebe energetisch komprimiert. Hierbei wird zwischen Modellen mit Fallgewichten und Quetschungen durch Zangen unterschieden. Wobei sich bei der Quetschung die Art der erzeugten Läsion stark von der Kontaktverletzung im Sport unterscheidet (JÄRVINEN, SORVARI, 1975; MCBRIER et al., 2009). Crisco et al. (1994) beschrieben ein Fallgewicht, welches über dem M. gastrocnemius platziert wurde, um eine lokale Kontusion an der Ratte auszulösen (CRISCO et al., 1996; CRISCO et al., 1994). Das Modell wurde bereits für mehrere Studien in der Literatur angewandt (MARKERT et al., 2005; MCBRIER et al., 2007; MERRICK, 2002; WILKIN et al., 2004). Nachteil dieses Modells ist die Etablierung unterschiedlicher Schweregrade der Verletzung (MCBRIER et al., 2009). Durch Veränderung der Fallhöhe können verschiedene Schweregrade erreicht werden (DANTAS et al., 2017; MCBRIER et al., 2009). Entsprechend der an der Ratte beschriebenen Modelle wurde das Kontusionmodell dieser Studie für die Maus modifiziert.

5.1.2. Ganganalyse

Die ersten wissenschaftlichen Publikationen zum Verständnis der Physiologie und Biomechanik der Fortbewegung finden sich bereits 1779 (Vincent und Goiffon, 1779) (BATKA et al., 2014). Dabei kann anhand des Bewegungsmusters das Stadium der Rehabilitation und der Krankheitsprogression abgeleitet werden (BATKA et al., 2014; BRAUN et al., 2019; UNGER et al., 2021). Es ist zulässig, die Ergebnisse der Ganganalyse von Nagetier auf den Menschen zu übertragen. Dadurch ist die Untersuchung der Lokomotion von Nagern mittlerweile eine etablierte Methode, insbesondere im Bereich neurologischer Erkrankungen (BATKA et al., 2014; PITZER et al., 2021). Für die Ganganalyse können unterschiedliche Methoden verwendet werden. Video- und Reaktionskraftanalysen, Laufbänder verbunden mit

Hochgeschwindigkeits-Videokameras und die Analyse von Pfotenabdrücken können als Analysemethode dienen (CLARKE, STILL, 1999, 2001; HERBIN et al., 2004; HISTING et al., 2010; WILLIAMS et al., 1993). Auch röntgenbasierte Methoden wurden beschrieben, welche aber aufgrund der Invasivität lediglich im Bereich von Frakturheilungsstudien angewandt wurden (HISTING et al., 2010).

Die genauesten Ergebnisse liefert die automatisierte Ganganalyse, wozu in der Literatur entsprechend zunehmend automatisierte Analysegeräte wie das CatWalk XT eingesetzt werden. Der Fokus lag bis dato auf Rückenmarks- und Hirnverletzungen, Parkinson, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose, Multiple Sklerose, Schädel-Hirn-Trauma, periphere Lähmungen/Traumata und Arthritis (GERBER et al., 2012; HAMERS et al., 2006; HEROLD et al., 2016; LIU et al., 2022; MASOCHA, PARVATHY, 2009; MORITZ et al., 2019; NEUMANN et al., 2009; VANDEPUTTE et al., 2010; WALTER et al., 2020; WALTER et al., 2022).

Die ausgewerteten Parameter variieren diesbezüglich zwischen den Studien zum Teil erheblich. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erlangen, wurden in dieser Studie die am häufigsten in der Literatur verwendeten Parameter verwendet, welche passend zu den dynamischen und anatomischen Faktoren waren (KAPPOS et al., 2017).

Um den Einfluss äußerer und individueller Faktoren wie Alter, Körpergewicht, Geschlecht, Mausstamm, Geschwindigkeit, Fehlmessungen und Training zu minimieren, wurden Mäuse des gleichen Mausstamms, des gleichen Geschlechts, Alters und Körpergewichts, wie in der Literatur empfohlen, verwendet (CLARKE, STILL, 1999; MACHADO et al., 2015; MOCK et al., 2018; NEUMANN et al., 2009; WOOLEY et al., 2005; WOOLEY et al., 2009). Das Ganganalysesystem wurde, gemäß den Vorgaben des Herstellers, mit einer maximalen Variation von 60% zwischen den einzelnen Läufen eingestellt. Durch den Ausschluss abweichender Läufe resultiert eine hohe Standardisierung der Datenqualität (CENDELÍN et al., 2010).

Um die Datenqualität und Standardisierung weiter zu erhöhen, diskutieren verschiedene Arbeitsgruppen den Einsatz von Trainingsläufen und Konditionierung (z.B. mittels Schokolinsen) (BÄRMANN et al., 2021; GARRICK et al., 2021; HEINZEL et al., 2020). Wie in vorangegangenen Studien erfolgten ein Trainingslauf sowie ein weiterer Lauf vor dem Trauma, um eine negative Assoziation der Maus zwischen Trauma und CatWalk XT zu verhindern (FRITZ et al., 2022). Hierbei konnte auch ohne Konditionierung ein hohes Level der Standardisierung erreicht werden.

Verletzungen des M. gastrocnemius können durch Veränderungen der Stand- und Schwungphase sowie durch Änderungen des Fußabdrucks erfasst werden (GABRIEL et al., 2007; GRILLNER, 1975; IWATA et al., 2010; NINAGAWA et al., 2013; SAKUMA et al., 2016; VIEIRA et al., 2016; VRINTEN,

HAMERS, 2003). Die hierzu verwendeten Parameter *Stand*, *Swing* und dem daraus resultierenden *Duty_Cycle* sind somit valide Parameter um den Heilungsprozess nach der Verletzung analysieren zu können (FEEHAN, ZADINA, 2019). Hinzu kommt, dass Mäuse nach einer Verletzung vermehrt den kontralateralen Hinterlauf nutzen, was sich in einer kürzeren Schwungzeit und erhöhten Standzeit zeigt (MARICELLI et al., 2016).

Des Weiteren wurden die Parameter Abdruckkraft und Abdruckfläche zur Analyse des Gangbildes verwendet (GABRIEL et al., 2007; NINAGAWA et al., 2013). Zu unterscheiden sind dabei die funktionellen Einschränkungen durch die Verletzung gegenüber den schmerzassoziierten Veränderungen, welche ebenfalls das Gangbild verändern können (LEPICARD et al., 2006; LIN et al., 2010; MASOCHA, PARVATHY, 2009; VRINTEN, HAMERS, 2003). Um diesen Einfluss zu minimieren, erfolgte die Analgesie der Tiere über den gesamten Zeitraum mittels Tramal, sodass der Einflussfaktor reduziert werden konnte. Es zeigte sich eine Laufbereitschaft aller Mäuse über den gesamten Analysezeitraum.

5.1.3. Sonographie und Photoakustik

Die Sonographie nach Muskelverletzungen gilt derzeit als Goldstandard im klinischen Einsatz (KIEB et al., 2010). Die Sensitivität ist hierbei im akuten Stadium ähnlich der des MRTs. Allerdings nimmt diese im Heilungsverlauf stetig ab, sodass eine genaue Beurteilung im weiteren Verlauf oft schwierig ist (GIBBS et al., 2004; KOULOURIS, CONNELL, 2005). Leineweber et al. (2015) zeigten nach Muskelkontusionen die größten pathologischen Veränderungen einen Tag post Intervention mit Hämatomen und Unterbrechungen der Fasern, während in den folgenden Tagen Anzeichen von Entzündungen und Faserschäden weiter nachweisbar waren (LEINEWEBER, GAO, 2015).

Durch die zusätzliche photoakustische Bildgebung (PAI) ist es möglich, ohne invasive Diagnostik die Perfusion und Sauerstoffversorgung zu überwachen und auf die übrigen Untersuchungsergebnisse zu beziehen. Die PAI hat eine hohe Sensitivität in der Detektion von kleinen Blutgefäßen, der Neovaskularisierung, der Hypoxie und der Ischämie, die in diesem Umfang bei Ultraschall-Doppler-Bildern nicht gegeben ist. Durch die gleichzeitige Darstellung mittels Ultraschall, lassen sich die Bilder zudem anatomisch auswerten und die Markierung mittels ROI optimal durchführen (ANDERSON et al., 2013; CHOI et al., 2018; GUO et al., 2009; HÖCKEL, VAUPEL, 2001; ISHIHARA et al., 2016; PARK et al., 2017; TARUTTIS et al., 2016; WEIDNER, 1993).

Hochuli et al. (2019) zeigten in ihrer Studie, dass die Verwendung von Wellenlängen zwischen 500nm und 1000nm zu ungenauen Schätzungen der Oxygenierung führte und dass eine sorgfältige Auswahl von Wellenlängen im Bereich von 620nm bis 920nm genauere Oxygenierungswerte liefern kann (HOCHULI et al., 2019). Die Ergebnisse der Sauerstoffsättigung sollten vor diesem Hintergrund kri-

tisch betrachtet werden und in den Gesamtkontext der Erkenntnisse gestellt werden. Hier wurden Wellenlängen von 750nm bis 850nm verwendet, entsprechend den Wellenlängen des oxygenierten und desoxygenierten Hämoglobins. Viele Strukturen des Muskels erscheinen linear oder länglich, weshalb der lineare Schallkopf am besten geeignet ist (HASHIMOTO et al., 1999) und deshalb in der vorliegenden Studie Anwendung fand. Die Sonographie und PAI zeigten eine hohe Inter- und Intraobserver-Variabilität (BARBERIE et al., 1998; HAYASHI et al., 2012). Um die Intraobserver-Reliabilität zu reduzieren, wurde die Auswertung der Bildgebung nach vier Wochen erneut kontrolliert.

5.1.4. MRT

Eine noch höhere Sensitivität für Muskelverletzungen als die Sonographie bietet das MRT (HOTFIELD et al., 2018a; KIEB et al., 2010). Hierbei kommen vor allem T2-gewichtete-Sequenzen des MRTs zum Einsatz, welche Ödeme und Hämatome als hyperintense Veränderungen des Muskels gut darstellen können (FLECKENSTEIN et al., 1989; HAYASHI et al., 2012; REIMERS et al., 1994; SHINTANI, SHIIGAI, 1993; WISHNIA et al., 2001).

Durch das MRT können zudem Volumen und Umfang der Extremität gemessen werden, was zum einen der Beurteilung des Verletzungsgrades als auch der Beurteilung des Heilungsprozesses dient und der in der Literatur verwendeten Parameter in dieser Studie entsprechend angewandt wurde (MCBRIER et al., 2009).

5.1.5. Schiebelehre

Die Bestimmung des Durchmessers der verletzten Extremität erfolgte analog zu vorangegangenen Studien (FRUEH et al., 2016). Der mögliche systemische Fehler der unterschiedlichen Messhöhe war in allen Gruppen gleich vorhanden, sodass dies keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Der mit Hilfe der Schiebelehre erfasste Durchmesser der linken Hinterläufe zeigte übereinstimmende Ergebnisse.

5.1.6. Histologie

Die Histologie ist eine geeignete Methode zur Beurteilung von Pathologien. Wir konnten die vorbeschriebenen Phasen der Nekrose- Entzündungs- und Regenerationsprozesse reproduzieren (JARVINEN et al., 2005; MAROTTA et al., 2007; SAKUMA et al., 2016). Allerdings hat die Histologie aufgrund der Notwendigkeit wiederholter Probenentnahmen eine zu begrenzte Kapazität, um als Längsschnittmessung genutzt werden zu können (CHRZANOWSKI et al., 2016). Zudem können verschiedene Störfaktoren die Immunreaktion sowie die Regenerationsfähigkeit und damit das histologische Bild beeinflussen. Diese sind beispielsweise Hormone, Stamm, Alter, Stressoren, Kortikosteroide sowie das Geschlecht (BROOKS, FAULKNER, 1994; KOH et al., 2003; MORAN et al., 2007; SCHNEIDER, TIIDUS, 2007; TIIDUS, BOMBARDIER, 1999; TIIDUS et al., 2001; VISWANATHAN, DHABHAR,

2005). Durch den Vergleich der Muskelpräparate von verletztem und gesundem Hinterlauf konnte ein Einfluss dieser Störfaktoren ausgeschlossen werden.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Das eingesetzte Kontusionsmodell führte bei allen Tieren zum Trauma, wobei sich das Volumen und die Umfangszunahme in allen untersuchten Gruppen ohne signifikante Unterschiede zeigte, sodass das eingesetzte Modell als standardisiert bezeichnet werden kann. Des Weiteren kam es nach dem Trauma nicht zu einem starken Gewichtsverlust der Tiere, sodass die Ausfallquote bei 1,64% lag.

Der Wirkung von Traumeel wird in der Literatur meist der Einfluss auf die Entzündungsreaktion zugeschrieben, welche dann den Regenerationsprozess beschleunigen soll. Es zeigte sich zum Teil eine Zunahme an Immunzellen (BELIKAN et al., 2020; BIRNESSER et al., 2004; KAZIMIRSKII et al., 2021; MUDERS et al., 2016; MUDERS et al., 2017; SCHNEIDER, 2011).

Schneider et al. schrieben den Inhaltsstoffen unterschiedliche Orte des Wirkmechanismus in Bezug auf die Entzündungsreaktion zu (SCHNEIDER, 2011). Hierbei konnte eine positive Wirkung für die Wundheilung, Ödembildung und Analgesie nachgewiesen werden (LUSSIGNOLI et al., 1999; SCHNEIDER, 2011). Arnica montana, Hamamelis virginiana, Achille millefolium, Aconitum napellus, Atropa belladonna und Mercurius solubilis reduzieren die Ödembildung. Außerdem konnten Effekte auf Zytokine zur Inhibition des Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells (NF-κB) und der damit verbundenen inflammatorischen Genexpression nachgewiesen werden (LI, VERMA, 2002; LUSSIGNOLI et al., 1999; LYSS et al., 1998; SCHNEIDER, 2011). Die eher proinflammatorisch wirkenden Inhaltsstoffe Calendula officinalis, Echinacea purpura und Matricaria recutita führten gleichzeitig zu erhöhten Leukozytenzahlen im Gewebe (GRECH, 2018).

Entsprechend der Wirkung ist somit von einer Modifikation der Inflammationsphasen in der Bildgebung und in der Ganganalyse auszugehen. Hierbei zeigten die Sonographie und das MRT entsprechende Veränderungen, die bei Muskeltraumata üblicherweise auftreten. Muskelkontusionen führen zur Okklusion der Gefäße, interstitiellen Blutungen, Ödemen und Entzündungen im Muskel. Beschriebene Prozesse äußern sich als erhöhte Signalintensität in der T2-Wichtung (BOHNDORF, KILCOYNE, 2002). Im akuten Stadium (bis achtundvierzig Stunden post Trauma) stellen sich Hämatome in der T1-Wichtung isointens dar. Im subakuten Stadium (bis zu dreißig Tagen post Trauma) präsentieren sich Hämatome in T2-Wichtungen aufgrund des Methämoglobins hyperintens (ZACCAGNINI et al., 2015). In der Traumeel-Gruppe war bereits ab Tag sieben kein Signalanstieg mehr nachzuweisen. Weiter zeigte sich eine kontinuierliche Verringerung des Ödems bis Tag 14 in beiden Gruppen. Das tendenziell größere Ödem der Traumeel-Gruppe, vor allem am dritten Tag post Trauma, könnte hierbei durch eine gesteigerte Inflammationsreaktion erklärt werden.

Die akute Entzündungsreaktion bewirkt neben vermehrter Konzentration an Zytokinen und erhöhter Zahl an Neutrophilen auch eine Steigerung der Gefäßpermeabilität, dadurch bildet sich vermehrt extrazelluläre Flüssigkeit, die Ödeme und Hypoxie verursachen (NOURSHARGH et al., 2010; PILLON et al., 2013; STRAUSS et al., 1983). Außerdem erhöht sich der interstitielle Druck, der die Perfusion behindern kann (JÄRVINEN et al., 2013; OYAIZU et al., 2018; TIDBALL, 2005). Hierzu passend sind auch die Ergebnisse der Photoakustikuntersuchung. Hier zeigte sich zunächst ein erhöhter HbT-Wert gegenüber der gesunden, kontralateralen, hinteren Extremität, wobei die Traumeel-Gruppe bereits an Tag eins höhere Werte als die Kontrollgruppe aufwies. An Tag sieben nahm der HbT-Gehalt in der Traumeel-Gruppe bereits signifikant gegenüber Tag eins und der Kontrollgruppe ab, während die Kontrollgruppe einen gesteigerten Wert zeigte. Hierbei waren insbesondere Unterschiede des desoxygenierten Hämoglobins nachweisbar, während der SO_2 -Gehalt weiter erhöht war.

Eine Erklärung hierfür ist, dass es durch die Gefäßokklusion nach der Kontusion und aufgrund des Hämatoms zur Minderperfusion kommt. Als autoregulative Reaktion auf die resultierende Minderperfusion kommt es dann zu einer reaktiven Hyperämie, was sich in der Regel durch erhöhte HbT-Werte zeigt (YANG et al., 2020). Der im Verlauf gesteigerte SO_2 -Wert in der Traumeel-Gruppe ist hinweisend für ein beschleunigtes Abräumen des Debris durch Makrophagen und das dadurch reduzierte Hämatom, was in der Kontrollgruppe erst nach Tag drei und somit langsamer stattfand. Hierzu passend zeigte sich auch der signifikante Unterschied des Umfangs und Durchmessers in der MRT und der Messung des Durchmessers mit der Schiebelehre zwischen beiden Gruppen an Tag sieben, wenn die Degenerations- und Regenerationsprozesse abgeschlossen waren.

Passend dazu war die Zellzahl in der HE-Färbung im Präparat des kontusionierten *M. gastrocnemius* der Kontrollgruppe gegenüber der Traumeel-Gruppe an Tag drei erhöht. Hierbei zeigte sich vor allem an Tag eins nach Kontusion eine zelluläre Schwellung, fokale Nekrosen und interstitielles Ödem, wie in der Literatur bei ähnlichen Studien beschriebenen histologischen Untersuchungen (CHEN et al., 2017; SAKUMA et al., 2016). In der immunhistologischen Analyse zeigte sich die Zahl der CD68 positiven Makrophagen an Tag eins und drei in der Traumeel-Gruppe stärker erhöht als in der Kontrollgruppe. Deren Anzahl nahm in der Traumeel-Gruppe bereits an Tag sieben weitestgehend ab, während die Kontrollgruppe weiterhin eine erhöhte Makrophagenzahl zeigte.

Makrophagen sind im Entzündungsgeschehen und der Regeneration ein wichtiger Faktor (KOIKE et al., 2022; MIYAKAWA et al., 2020; TIDBALL, 2005). Sie dienen zunächst der Aufrechterhaltung der durch die geschädigten Zellen und Neutrophilen initiierten Inflammationsreaktion (SMITH et al., 2008). Makrophagen zeigten ihr Maximum in einer Studie zu Muskelkontusionen von Zheng et al. (2019) wie in dieser Studie an Tag drei (ZHENG et al., 2019). Eine verstärkte Invasion mit M1-Makrophagen unmittelbar nach Trauma fördert über Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) die

Regeneration und kann die Fibrosierung vermindern (MARTINS et al., 2020). GM-CSF stimuliert sowohl die Makrophagen des proinflammatorischen Typs, Neutrophile, als auch die Neoangiogenese und endotheliale Vorläuferzellen für die Vaskulogenese (MARTINS et al., 2020; MCCOURT et al., 2001; TAKAHASHI et al., 1999). Ein frühzeitiger und starker Makrophagenshift zu M2-Makrophagen kann die Funktion der Satelittenzellen stören und führt dann zu einer verstärkten Adipogenese (LUKJANENKO et al., 2013; MAHDY, 2018). Durch die NADPH-Oxidase der Neutrophilen und Makrophagen kann es außerdem zu einem Anstieg freier Sauerstoffradikale (ROS) kommen (LIU et al., 2018).

ROS fördern die Entzündungsreaktion, die Detritus-Beseitigung und Regeneration, welche unter anderem durch Neoangiogenese unterstützt wird (KORTHUIS et al., 1988; KOZAKOWSKA et al., 2015; LIU et al., 2018; MAULIK, 2002; SMITH et al., 1989). Dies bestätigte sich auch in dieser Studie durch eine signifikant gesteigerte Aktivität neutrophiler Granulozyten, welche durch die MPO-Färbung an Tag eins in beiden Gruppen nachweisbar waren und an Tag drei wieder auf das Ausgangslevel zurückging. Der in anderen Studien teilweise nachweisbare Effekt neutrophiler Granulozyten, welche durch die Ausschüttung von Zytokinen und Erzeugung freier Sauerstoffradikale zur Schädigung von Myotuben führten, konnte hier nicht nachgewiesen werden (CANNON, ST PIERRE, 1998; PIZZA et al., 2001; ROSENBERG, GALLIN, 1993; SAXTON et al., 2003).

Die in der Traumeel-Gruppe signifikant erhöhte Makrophagen-Anzahl führte zu einem schnelleren Abtransport des Debris und in der Folge zu einer signifikant geringeren Anzahl apoptotischer Zellen in der Traumeel-Gruppe. Eine erhöhte Apoptoserate hemmt die Regeneration (STRATOS et al., 2010), wobei die Hemmung des programmierten Zelltods, der durch die Caspase vermittelt wird, wiederum zur besseren Regeneration und Verstärkung der Zuckungskraft führt (STRATOS et al., 2012). Schlussfolgernd erfolgt eine verlangsamte Muskelregeneration bei gleichzeitig langsamer ausgeprägter Phagozytose (GROUNDS, 1987; TEIXEIRA et al., 2003; ZACKS, SHEFF, 1982).

In der Traumeel-Gruppe zeigte sich eine geringe Anzahl an nachweisbaren Caspase-3 positiven Zellen an Tag drei. Stratos et al. zeigten in einer Muskelkontusionsstudie der Ratte ähnliche Effekte nach der Behandlung mit Melatonin (STRATOS et al., 2012).

Die mittels MRT durchgeführte Umfangsmessung des linken M. gastrocnemius präsentierte ab Tag sieben signifikante Unterschiede gemäß einer stärkeren Umfangsreduktion. Das intramuskuläre Ödem zeigte sich in der Traumeel-Gruppe an allen Untersuchungstagen unterhalb der Werte der Kontrollgruppe. Insbesondere an Tag sieben, bei abgeschlossenem Degenerations- und Regenerationsprozess, zeigte Traumeel bessere Ergebnisse. Der höhere Wert der Sauerstoffsättigung sieben Tage post Trauma bei den Traumeel-Tieren bei gleichzeitig erniedrigtem intramuskulärem Ödem könnte auf eine bessere Perfusion durch wegfallende Kompression durch das Ödem zurückzuführen sein oder aber durch bessere Perfusion aufgrund von Neoangiogenese. Obwohl diese Ergebnisse auf einen positiven Effekt des

Traumeels auf die Muskelheilung hindeuten, zeigte die Ganganalyse beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Dennoch konnten zwischen der Basismessung und den posttraumatischen Untersuchungstagen Veränderungen nachgewiesen werden, wobei die Tiere bereits an Tag sieben die Rückkehr zum physiologischen Gangbild zeigten, welche anhand des *Duty_Cycles* abgebildet werden kann. Ähnliche Beobachtung konnte auch in vergleichbaren Studien nachgewiesen werden (SAKUMA et al., 2016). Auch die Belastbarkeit und Abdruckkraft der verletzten Extremität, welche mittels *Print_Area*, *MaxContactArea* und *MaxContactMeanIntensity* bestimmt wurden, erwiesen sich nach dem Trauma in beiden Gruppen als signifikant vermindert, mit einer deutlichen Reduktion der Belastung an Tag drei post interventionem. Beide Gruppen zeigten jedoch an Tag sieben keine signifikanten Unterschiede mehr zum Basiswert. Die Abdruckkraft war insbesondere an Tag drei nach dem Trauma reduziert nachweisbar. Insgesamt zeigte die Intervention einen messbaren Effekt auf das Gangbild, ohne eine Verbesserung oder Beschleunigung des funktionellen Outcomes durch die Behandlung mit Traumeel.

Studien, die ebenfalls natürliche Therapeutika in ähnlichen Kontusionsmodellen verwendeten, konnten eine beschleunigte Heilung, eine Depletion der Neutrophilen, eine reduzierte sekundäre Schädigung und einen früheren Switch der Makrophagenphänotypen beobachten. Die Entzündungsreaktion erwies sich als früher beendet (GEORGE et al., 2015; KAZIMIRSKII et al., 2021; KRUGER et al., 2014; MYBURGH et al., 2012). Die hier vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen überein. Trotz aller Ergebnisse der unterschiedlichen Studien ist fraglich, ob die Wirkstoffe des Homöopathikums eine therapeutische Wirkung erzielen können. Zu bedenken ist, dass Traumeel nur sehr geringe Konzentrationen seiner einzelnen Komponenten enthält. Die Quecksilberkonzentration (*Mercurius solubilis Hahnemanni*) ist zum Beispiel niedriger als die im Trinkwasser in Deutschland enthaltene Menge (POROZOV et al., 2004). In anderen Studien konnte allerdings eine Modulation der Genexpression während der Wundheilung durch Traumeel nachgewiesen werden, welche die Signalwege von TGF- β , Zytokinen, Entzündung, Wundkontraktion sowie Kollagene und Enzyme der EZM beinhaltete (ST LAURENT et al., 2017).

6. Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, inwieweit Traumeel bei Muskelkontusionen am Mausmodell nach einmaliger Applikation wirkt. Mit Hilfe der verwendeten, nicht invasiven Bildgebung und Ganganalyse konnte die Muskelheilung im Verlauf quantitativ analysiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Applikation des Therapeutikums eine Wirkung auf Ödemresorption, Apoptose, Sauerstoff- und Hämoglobingehalt im kontusionierten Muskel hat. In Zusammenschau aller Ergebnisse war die Behandlung mit Traumeel der Kontrollgruppe nur in Teilen überlegen.

7. Literaturverzeichnis

1. Achterkamp D dKR, Zimmermann P (2012) Reference Manual Catwalk XT 10.0. Noldus. Wageningen: pp. 9 ff.
2. Almekinders LC (1999) Anti-Inflammatory Treatment of Muscular Injuries in Sport. *Sports Medicine* 28:383-388
3. Ambrosio F, Ferrari RJ, Distefano G, Plassmeyer JM, Carvell GE, Deasy BM, Boninger ML, Fitzgerald GK, Huard J (2010) The Synergistic Effect of Treadmill Running on Stem-Cell Transplantation to Heal Injured Skeletal Muscle. *Tissue Engineering Part A* 16:839-849
4. Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK (2013) Management of patients with peripheral artery disease (compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA guideline recommendations): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 127:1425-1443
5. Anderson K, Strickland SM, Warren R (2001) Hip and groin injuries in athletes. *Am J Sports Med* 29:521-533
6. Arumugam S, Prakash A, Janani G, Vignesh M, Anjanavannan MM, Perumal S, Alwar T (2021) Platelet-Rich Plasma (PRP) Injection in Sports Injuries. *Indian J Orthop* 55:484-491
7. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D (2017). Anatomie. In *Duale Reihe (Thieme)*, pp. 81-89.
8. Barberie JE, Wong AD, Cooperberg PL, Carson BW (1998) Extended field-of-view sonography in musculoskeletal disorders. *AJR Am J Roentgenol* 171:751-757
9. Bärmann J, Walter HL, Pikhovych A, Endepols H, Fink GR, Rueger MA, Schroeter M (2021) An analysis of the CatWalk XT and a composite score to assess neurofunctional deficits after photothrombosis in mice. *Neurosci Lett* 751:135811
10. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21
11. Batka RJ, Brown TJ, McMillan KP, Meadows RM, Jones KJ, Haulcomb MM (2014) The need for speed in rodent locomotion analyses. *Anat Rec (Hoboken)* 297:1839-1864
12. Baum H (2019). Myeloperoxidase. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Gressner AM, T Arndt, eds. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 1704-1705.
13. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E (2017). Physiologie. In *Duale Reihe (Stuttgart, Thieme)*, pp. 67-78.
14. Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM (1999) The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* 27:2-9

15. Beiner JM, Jokl P (2001) Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 9:227-237
16. Belikan P, Nauth L, Färber LC, Abel F, Langendorf E, Drees P, Rommens PM, Ritz U, Mattyasovszky SG (2020) Intramuscular Injection of Combined Calf Blood Compound (CFC) and Homeopathic Drug Tr14 Accelerates Muscle Regeneration In Vivo. *Int J Mol Sci* 21
17. Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA (2013) Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO reports* 14:1062-1072
18. Birnesser H, Oberbaum M, Klein P, Weiser M (2004) The homeopathic preparation Traumeel® S compared with NSAIDS for symptomatic treatment of epicondylitis. *Journal of Musculoskeletal Research* 08:119-128
19. Bohndorf K, Kilcoyne RF (2002) Traumatic injuries: imaging of peripheral musculoskeletal injuries. *Eur Radiol* 12:1605-1616
20. Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N (2008) CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *173:91-98*
21. Braun BJ, Osche D, Rollmann M, Orth M, Mörsdorf P, Histing T, Pohlemann T, Herath SC (2019) Increased therapy demand and impending loss of previous residence status after proximal femur fractures can be determined by continuous gait analysis - A clinical feasibility study. *Injury* 50:1329-1332
22. Brooks SV, Faulkner JA (1994) Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 26:432-439
23. Calvi M, Curti M, Mazzoni S, Genesio L, Tavana R, Callegari L, Genovese EA (2022) Paramagnetic contrast medium in high-level athletes with lower limb muscle injuries: can it make the return to sport safer reducing the recurrence rate? *La radiologia medica* 127:507-517
24. Cannon JG, St Pierre BA (1998) Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* 179:159-167
25. Carlson BM (1973) The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am J Anat* 137:119-149
26. Cendelín J, Voller J, Vozeh F (2010) Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behav Brain Res* 210:8-15
27. Chen L, Ma H, Liu H, Shou K, Zheng X, Fan Q, Yu A, Hu X (2017) Quantitative photoacoustic imaging for early detection of muscle ischemia injury. *Am J Transl Res* 9:2255-2265
28. Chen Y-J, Cheng F-C, Sheu M-L, Su H-L, Chen C-J, Sheehan J, Pan H-C (2014) Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 11:62
29. Choi W, Park EY, Jeon S, Kim C (2018) Clinical photoacoustic imaging platforms. *Biomed Eng Lett* 8:139-155

30. Chrzanowski SM, Batra A, Lee-McMullen B, Vohra RS, Forbes SC, Jiang H, Vandenborne K, Walter GA (2016) Near-Infrared Optical Imaging Noninvasively Detects Acutely Damaged Muscle. *Am J Pathol* 186:2692-2700
31. Clarke KA, Still J (1999) Gait analysis in the mouse. *Physiol Behav* 66:723-729
32. Clarke KA, Still J (2001) Development and consistency of gait in the mouse. *Physiol Behav* 73:159-164
33. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994) A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 22:702-710
34. Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P (1996) Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *Journal of Biomechanics* 29:1291-1296
35. Daley P, Menu P, Louguet B, Crenn V, Dauty M, Fouasson-Chailloux A (2021) Interest of platelet rich plasma in Achilles tendon rupture management: a systematic review. *The Physician and Sportsmedicine*:1-8
36. Dantas MGB, Damasceno CMD, Barros VRP, Menezes ES, Fontoura HS, Lima RS, Carvalho FO, Almeida J (2017) Creation of a contusion injury method for skeletal muscle in rats with differing impacts. *Acta Cir Bras* 32:369-375
37. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599
38. Dos Santos RG, Santos GS, Alkass N, Chiesa TL, Azzini GO, da Fonseca LF, Dos Santos AF, Rodrigues BL, Mosaner T, Lana JF (2021) The regenerative mechanisms of platelet-rich plasma: A review. *Cytokine* 144:155560
39. Draper DO, Wells A, Wilk K (2020) Efficacy of Sustained Acoustic Medicine as an Add-on to Traditional Therapy in Treating Sport-related Injuries : Case Reports. *Global journal of orthopedics research* 2:545
40. Ehlert D, Majjhoo A (2019) Traumeel® Epidural Injection: A Viable Alternative to Corticosteroids - A Five-Patient Case Study. *Cureus* 11:e6196-e6196
41. Feehan AK, Zadina JE (2019) Morphine immunomodulation prolongs inflammatory and postoperative pain while the novel analgesic ZH853 accelerates recovery and protects against latent sensitization. *J Neuroinflammation* 16:100
42. Fleckenstein JL, Peshock RM, Lewis SF, Haller RG (1989) Magnetic resonance imaging of muscle injury and atrophy in glycolytic myopathies. *Muscle & Nerve* 12:849-855
43. Földi M (2015) Das Lymphödem: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. *Vasomed* 5:255-260
44. Forcina L, Cosentino M, Musarò A (2020) Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells* 9

45. Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, Harasiewicz KA, Starkoski BG, Zan L, Knapik DA, Adamson SL (2002) A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *28:1165-1172*
46. Fritz T, Schäfer J, Scheuer C, Stutz J, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, Laschke MW, Klein M, Orth M (2022) Macrophage-activating lipoprotein (MALP)-2 impairs the healing of partial tendon injuries in mice. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 239:151818*
47. Frueh FS, Körbel C, Gassert L, Müller A, Gousopoulos E, Lindenblatt N, Giovanoli P, Laschke MW, Menger MD (2016) High-resolution 3D volumetry versus conventional measuring techniques for the assessment of experimental lymphedema in the mouse hindlimb. *Scientific Reports 6:34673*
48. Fukada S-i, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda Si, Tsujikawa K, Yamamoto H (2010) Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. *The American Journal of Pathology 176:2414-2424*
49. Gabriel AF, Marcus MA, Honig WM, Walenkamp GH, Joosten EA (2007) The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods 163:9-16*
50. Garrick JM, Costa LG, Cole TB, Marsillach J (2021) Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk. *Curr Protoc 1:e220*
51. George C, Smith C, Isaacs AW, Huisamen B (2015) Chronic *Prosopis glandulosa* treatment blunts neutrophil infiltration and enhances muscle repair after contusion injury. *Nutrients 7:815-830*
52. Gerber YN, Sabourin J-C, Rabano M, Vivanco MDM, Perrin FE (2012) Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE 7:e36000*
53. Gerling M, Zhao Y, Nania S, Norberg KJ, Verbeke CS, Englert B, Kuiper RV, Bergstrom A, Hassan M, Neesse A, Lohr JM, Heuchel RL (2014) Real-time assessment of tissue hypoxia in vivo with combined photoacoustics and high-frequency ultrasound. *Theranostics 4:604-613*
54. Ghaly A, Marsh DR (2010) Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Experimental Gerontology 45:381-388*
55. Gibbs NJ, Cross TM, Cameron M, Houang MT (2004) The accuracy of MRI in predicting recovery and recurrence of acute grade one hamstring muscle strains within the same season in Australian Rules football players. *J Sci Med Sport 7:248-258*
56. Grech D, Vela-gala, J., Dembek, D.J. and Tabaac, B. (2018) Critical Literature Review of the Homeo-pathic Compound Traumeel for Treatment of Inflammation. . *Pharmacology&Pharmacy:67-83*

57. Grillner S (1975) Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol Rev* 55:247-304
58. Grounds MD (1987) Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice. *J Pathol* 153:71-82
59. Guo Z, Li L, Wang LV (2009) On the speckle-free nature of photoacoustic tomography. *Med Phys* 36:4084-4088
60. Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispens WH (2001) Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 18:187-201
61. Hamers FP, Koopmans GC, Joosten EA (2006) CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:537-548
62. Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon J-M, Tajbakhsh S, Rocheteau P, Chrétien F (2016) Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE* 11:e0147198
63. Hashimoto BE, Kramer DJ, Wiitala L (1999) Applications of musculoskeletal sonography. *Journal of Clinical Ultrasound* 27:293-318
64. Hayashi D, Hamilton B, Guermazi A, de Villiers R, Crema MD, Roemer FW (2012) Traumatic injuries of thigh and calf muscles in athletes: role and clinical relevance of MR imaging and ultrasound. *Insights Imaging* 3:591-601
65. Heel GmbH BH (2016). Gebrauchsinformation Traumeel® S (Baden- Baden)
66. Heinzl JC, Oberhauser V, Keibl C, Swiadek N, Längle G, Frick H, Kolbenschlag J, Prahm C, Grillari J, Hercher D (2020) Evaluation of Functional Recovery in Rats After Median Nerve Resection and Autograft Repair Using Computerized Gait Analysis. *Front Neurosci* 14:593545
67. Henne-Bruns D, Barth E (2012). Chirurgie. In *Duale Reihe* (Stuttgart, Thieme), pp. 690-693.
68. Herbin M, Gasc JP, Renous S (2004) Symmetrical and asymmetrical gaits in the mouse: patterns to increase velocity. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190:895-906
69. Herold S, Kumar P, Jung K, Graf I, Menkhoff H, Schulz X, Bähr M, Hein K (2016) CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. *BMC Neuroscience* 17:78
70. Hirsch T, Wahl U (2017) Das praktische Vorgehen beim postoperativen und posttraumatischen Lymphödem. *Zentralbl Chir* 142:287-296
71. Histing T, Kristen A, Roth C, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Menger MD, Pohlemann T (2010) In vivo gait analysis in a mouse femur fracture model. *Journal of Biomechanics* 43:3240-3243

72. Hochuli R, An L, Beard PC, Cox BT (2019) Estimating blood oxygenation from photoacoustic images: can a simple linear spectroscopic inversion ever work? *J Biomed Opt* 24:1-13
73. Höckel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93:266-276
74. Hotfiel T, Carl HD, Swoboda B, Heinrich M, Heiss R, Grim C, Engelhardt M (2016) [Current Conservative Treatment and Management Strategies of Skeletal Muscle Injuries]. *Z Orthop Unfall* 154:245-253
75. Hotfiel T, Heiss R, Swoboda B, Kellermann M, Gelse K, Grim C, Strobel D, Wildner D (2018a) Contrast-Enhanced Ultrasound as a New Investigative Tool in Diagnostic Imaging of Muscle Injuries-A Pilot Study Evaluating Conventional Ultrasound, CEUS, and Findings in MRI. *Clin J Sport Med* 28:332-338
76. Hotfiel T, Seil R, Bily W, Bloch W, Gokeler A, Kriffter RM, Mayer F, Ueblacker P, Weisskopf L, Engelhardt M (2018b) Nonoperative treatment of muscle injuries - recommendations from the GOTS expert meeting. *J Exp Orthop* 5:24
77. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M (1991) Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 23:801-810
78. Hussain N, Johal H, Bhandari M (2017) An evidence-based evaluation on the use of platelet rich plasma in orthopedics – a review of the literature. *SICOT-J* 3:57
79. Ishihara M, Horiguchi A, Shinmoto H, Tsuda H, Irisawa K, Wada T, Asano T (2016). Comparison of transrectal photoacoustic, Doppler, and magnetic resonance imaging for prostate cancer detection. Paper presented at: Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2016.
80. Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M, Kami K (2010) Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Muscle Nerve* 41:694-701
81. Jarvinen M, Sorvari T (1975) Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83:259-265
82. Järvinen M, Sorvari T (1975) Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83:259-265
83. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (2005) Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33:745-764
84. Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H (2013) Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J* 3:337-345

85. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M (2005) Muscle Injuries. *The American Journal of Sports Medicine* 33:745-764
86. Kappos EA, Sieber PK, Engels PE, Mariolo AV, D'Arpa S, Schaefer DJ, Kalbermatten DF (2017) Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain Behav* 7:e00723
87. Kary JM (2010) Diagnosis and management of quadriceps strains and contusions. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 3:26-31
88. Kasseroller R (1999). Kompendium der Manuellen Lymphdrainage nach Dr. Vodder. 2. Auflage. In (Heidelberg, Karl.F. Haug Verlag), pp. 45-136.
89. Kazimirskii AN, Salmasi ZM, Poryadin GV, Kukes IV (2021) Results of Complex Immunopharmacological Analysis of the Mechanisms of Action of Bioregulation Agents. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 172:38-41
90. Kieb M, Lorbach O, Engelhardt M (2010) Muskelverletzungen: Diagnostik und Behandlungen. *Der Orthopäde* 39:1098-1107
91. Koh TJ, Peterson JM, Pizza FX, Brooks SV (2003) Passive stretches protect skeletal muscle of adult and old mice from lengthening contraction-induced injury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:592-597
92. Koike TE, Dell Aquila RA, Silva KS, Aoki MS, Miyabara EH (2022) Glutamine supplementation improves contractile function of regenerating soleus muscles from rats. *J Muscle Res Cell Motil*
93. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN (1988) Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 254:H823-827
94. Koulouris G, Connell D (2005) Hamstring muscle complex: an imaging review. *Radiographics* 25:571-586
95. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkiewicz A, Dulak J (2015) The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 36:377-393
96. Kruger MJ, Myburgh KH, Smith C (2014) Contusion injury with chronic in vivo polyphenol supplementation: leukocyte responses. *Med Sci Sports Exerc* 46:225-231
97. Leineweber M, Gao Y (2015) Quantifying skeletal muscle recovery in a rat injury model using ultrasound imaging. *Journal of Biomechanics* 48:379-382
98. Lepicard EM, Venault P, Abourachid A, Pellé E, Chapouthier G, Gasc JP (2006) Spatio-temporal analysis of locomotion in BALB/cByJ and C57BL/6J mice in different environmental conditions. *Behav Brain Res* 167:365-372
99. Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734

100. Lin KL, Yang DY, Chu IM, Cheng FC, Chen CJ, Ho SP, Pan HC (2010) DuraSeal as a ligature in the anastomosis of rat sciatic nerve gap injury. *J Surg Res* 161:101-110
101. Liu XG, Chen PJ, Zhao LL, Zeng ZG, Xiao WH (2018) [Macrophages depletion impairs skeletal muscle regeneration by regulating inflammation and oxidative stress levels]. *Sheng Li Xue Bao* 70:23-32
102. Liu YJ, Chen XF, Zhou LP, Rao F, Zhang DY, Wang YH (2022) A nerve conduit filled with Wnt5a-loaded fibrin hydrogels promotes peripheral nerve regeneration. *CNS Neurosci Ther* 28:145-157
103. Lukjanenko L, Brachat S, Pierrel E, Lach-Trifilieff E, Feige JN (2013) Genomic Profiling Reveals That Transient Adipogenic Activation Is a Hallmark of Mouse Models of Skeletal Muscle Regeneration. *PLOS ONE* 8:e71084
104. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. In (Stuttgart, Georg Thieme Verlag), pp. 209-223.
105. Lussignoli S, Bertani S, Metelmann H, Bellavite P, Conforti A (1999) Effect of Traumeel S, a homeopathic formulation, on blood-induced inflammation in rats. *Complement Ther Med* 7:225-230
106. Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I (1998) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J Biol Chem* 273:33508-33516
107. Machado AS, Darmohray DM, Fayad J, Marques HG, Carey MR (2015) A quantitative framework for whole-body coordination reveals specific deficits in freely walking ataxic mice. *eLife* 4:e07892
108. Mahdy MAA (2018) Glycerol-induced injury as a new model of muscle regeneration. *Cell Tissue Res* 374:233-241
109. Majewski-Schrage T, Snyder K (2016) The Effectiveness of Manual Lymphatic Drainage in Patients With Orthopedic Injuries. *J Sport Rehabil* 25:91-97
110. Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T (2015) Prediction of Tumor Recurrence and Therapy Monitoring Using Ultrasound-Guided Photoacoustic Imaging. *Theranostics* 5:289-301
111. Mantovani A, Sica A, Locati M (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37:14-16
112. Maricelli JW, Lu QL, Lin DC, Rodgers BD (2016) Trendelenburg-Like Gait, Instability and Altered Step Patterns in a Mouse Model for Limb Girdle Muscular Dystrophy 2i. *PLoS One* 11:e0161984
113. Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (2005) Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 86:1304-1310

114. Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C, Munell F, Roig-Quilis M (2007) Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscular Disorders* 17:707-718
115. Martins L, Gallo CC, Honda TSB, Alves PT, Stilhano RS, Rosa DS, Koh TJ, Han SW (2020) Skeletal muscle healing by M1-like macrophages produced by transient expression of exogenous GM-CSF. *Stem Cell Res Ther* 11:473
116. Martins RP, Hartmann DD, de Moraes JP, Soares FA, Puntel GO (2016) Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats. *Platelets* 27:784-790
117. Masocha W, Parvathy SS (2009) Assessment of weight bearing changes and pharmacological antinociception in mice with LPS-induced monoarthritis using the Catwalk gait analysis system. *Life Sci* 85:462-469
118. Maulik N (2002) Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 4:805-815
119. McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA (2007) Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88:936-940
120. McBrier NM, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N (2009) Reliability and validity of a novel muscle contusion device. *J Athl Train* 44:275-278
121. McCaffrey AM, Pugh GF, O'Connor BB (2007) Understanding Patient Preference for Integrative Medical Care: Results from Patient Focus Groups. *Journal of General Internal Medicine* 22:1500-1505
122. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP (2001) Activated human neutrophils release hepatocyte growth factor/scatter factor. *Eur J Surg Oncol* 27:396-403
123. Merrick MA (2002) Secondary injury after musculoskeletal trauma: a review and update. *J Athl Train* 37:209-217
124. Minai L, Yelin D (2022) Plasmonic fusion between fibroblasts and skeletal muscle cells for skeletal muscle regeneration. *Biomed Opt Express* 13:608-619
125. Miyakawa M, Kawashima M, Haba D, Sugiyama M, Taniguchi K, Arakawa T (2020) Inhibition of the migration of MCP-1 positive cells by icing applied soon after crush injury to rat skeletal muscle. *Acta Histochem* 122:151511
126. Mock JT, Knight SG, Vann PH, Wong JM, Davis DL, Forster MJ, Sumien N (2018) Gait Analyses in Mice: Effects of Age and Glutathione Deficiency. *Aging Dis* 9:634-646
127. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC (2013) Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*:Cd010071
128. Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL, Lowe DA (2007) Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol* (1985) 102:1387-1393

129. Moritz MS, Tepp WH, Inzalaco HNt, Johnson EA, Pellett S (2019) Comparative functional analysis of mice after local injection with botulinum neurotoxin A1, A2, A6, and B1 by catwalk analysis. *Toxicon* 167:20-28
130. Morton DB, Griffiths PH (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 116:431-436
131. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969
132. Muders K, Pilat C, Deuster V, Frech T, Krüger K, Pons-Kühnemann J, Mooren F-C (2016) Effects of Traumeel (Tr14) on Exercise-Induced Muscle Damage Response in Healthy Subjects: A Double-Blind RCT. 2016:1-9
133. Muders K, Pilat C, Deuster V, Frech T, Krüger K, Pons-Kühnemann J, Mooren FC (2017) Effects of Traumeel (Tr14) on recovery and inflammatory immune response after repeated bouts of exercise: a double-blind RCT. *Eur J Appl Physiol* 117:591-605
134. Müller-Wohlfahrt H-W, Ueblacker P, Hänsel L, Betthäuser A, Dvořák J (2018). Muskelverletzungen im Sport. In (Stuttgart, Georg Thieme Verlag), pp. 50-195.
135. Murray PJ, Wynn TA (2011) Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 89:557-563
136. Myburgh KH, Kruger MJ, Smith C (2012) Accelerated skeletal muscle recovery after in vivo polyphenol administration. *J Nutr Biochem* 23:1072-1079
137. Needles A, Heinmiller A, Sun J, Theodoropoulos C, Bates D, Hirson D, Yin M, Foster FS (2013) Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 60:888-897
138. Neumann M, Wang Y, Kim S, Hong SM, Jeng L, Bilgen M, Liu J (2009) Assessing gait impairment following experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods* 176:34-44
139. Ninagawa NT, Isobe E, Hirayama Y, Murakami R, Komatsu K, Nagai M, Kobayashi M, Kawabata Y, Torihashi S (2013) Transplanted mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells promote muscle regeneration and accelerate functional recovery of injured skeletal muscle. *Biores Open Access* 2:295-306
140. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M (2010) Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:366-378
141. Oyaizu T, Enomoto M, Yamamoto N, Tsuji K, Horie M, Muneta T, Sekiya I, Okawa A, Yagishita K (2018) Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Sci Rep* 8:1288
142. Palermi S, Massa B, Vecchiato M, Mazza F, De Blasiis P, Romano AM, Di Salvatore MG, Della Valle E, Tarantino D, Ruosi C, Sirico F (2021) Indirect Structural Muscle Injuries of Lower Limb: Rehabilitation and Therapeutic Exercise. *J Funct Morphol Kinesiol* 6

143. Park S, Jang J, Kim J, Kim YS, Kim C (2017) Real-time Triple-modal Photoacoustic, Ultrasound, and Magnetic Resonance Fusion Imaging of Humans. *IEEE Trans Med Imaging* 36:1912-1921
144. Peetrons P (2002) Ultrasound of muscles. *Eur Radiol* 12:35-43
145. Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A (2013) Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304:E453-465
146. Pitzer C, Kurpiers B, Eltokhi A (2021) Gait performance of adolescent mice assessed by the CatWalk XT depends on age, strain and sex and correlates with speed and body weight. *Sci Rep* 11:21372
147. Pizza FX, McLoughlin TJ, McGregor SJ, Calomeni EP, Gunning WT (2001) Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C335-341
148. Porozov S, Cahalon L, Weiser M, Branski D, Lider O, Oberbaum M (2004) Inhibition of IL-1beta and TNF-alpha secretion from resting and activated human immunocytes by the homeopathic medication Traumeel S. *Clin Dev Immunol* 11:143-149
149. Porter AG, Jänicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 6:99-104
150. Puntel GO, Carvalho NR, Amaral GP, Lobato LD, Silveira SO, Daubermann MF, Barbosa NV, Rocha JBT, Soares FAA (2011) Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free Radical Research* 45:133-146
151. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H (1999) Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers After Experimental Muscle Injury. *The American Journal of Sports Medicine* 27:54-59
152. Reimers CD, Schedel H, Fleckenstein JL, Nägele M, Witt TN, Pongratz DE, Vogl TJ (1994) Magnetic resonance imaging of skeletal muscles in idiopathic inflammatory myopathies of adults. *Journal of Neurology* 241:306-314
153. Riel KA (2012). Sport- und Weichteilverletzungen. In (Springer Berlin Heidelberg), pp. 19-40.
154. Rosenberg HF, Gallin JI (1993) Neutrophil-specific granule deficiency includes eosinophils. *Blood* 82:268-273
155. Sakuma Y, Miyagi M, Inoue G, Ishikawa T, Kamoda H, Yamauchi K, Orita S, Suzuki M, Oikawa Y, Inage K, Kubota G, Sainoh T, Sato J, Takahashi K, Ohtori S (2016) Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia innervating the injured muscle. *Muscle Nerve* 54:776-782

156. Saxton JM, Claxton D, Winter E, Pockley AG (2003) Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond)* 104:69-77
157. Schneider BS, Tiidus PM (2007) Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 37:837-856
158. Schneider C (2011) Traumeel - an emerging option to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of acute musculoskeletal injuries. *Int J Gen Med* 4:225-234
159. Shintani S, Shiigai T (1993) Repeat MRI in acute rhabdomyolysis: correlation with clinicopathological findings. *Journal of computer assisted tomography* 17:786-791
160. Shu B, Yang Z, Li X, Zhang L-Q (2012) Effect of Different Intensity Pulsed Ultrasound on the Restoration of Rat Skeletal Muscle Contusion. *Cell Biochemistry and Biophysics* 62:329-336
161. Singer SR, Amit-Kohn M, Weiss S, Rosenblum J, Maoz G, Samuels N, Lukasiewicz E, Freedman L, Paltiel O, Itzchaki M, Niska M, Oberbaum M (2010) Traumeel S® for pain relief following hallux valgus surgery: a randomized controlled trial. *BMC Clinical Pharmacology* 10:9
162. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH (2008) The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med* 38:947-969
163. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ (1989) Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 256:H789-793
164. Souza JD, Gottfried C (2013) Muscle injury: Review of experimental models. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 23:1253-1260
165. Srikuea R, Pholpramool C, Kitiyanant Y, Yimlamai T (2010) Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:1078-1086
166. St Laurent G, 3rd, Seilheimer B, Tackett M, Zhou J, Shtokalo D, Vyatkin Y, Ri M, Toma I, Jones D, McCaffrey TA (2017) Deep Sequencing Transcriptome Analysis of Murine Wound Healing: Effects of a Multicomponent, Multitarget Natural Product Therapy-Tr14. *Front Mol Biosci* 4:57
167. Stratos I, Graff J, Rotter R, Mittlmeier T, Vollmar B (2010) Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair. *J Orthop Res* 28:950-957
168. Stratos I, Li Z, Rotter R, Herlyn P, Mittlmeier T, Vollmar B (2012) Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. *Apoptosis* 17:269-277
169. Strauss MB, Hargens AR, Gershuni DH, Greenberg DA, Crenshaw AG, Hart GB, Akeson WH (1983) Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittent hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 65:656-662

170. Szczesny G, Olszewski WL (2003) The Pathomechanism of Posttraumatic Edema of the Lower Limbs: II—Changes in the Lymphatic System. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 55:350-354
171. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-438
172. Taruttis A, Timmermans AC, Wouters PC, Kacprowicz M, van Dam GM, Ntziachristos V (2016) Optoacoustic Imaging of Human Vasculature: Feasibility by Using a Handheld Probe. *Radiology* 281:256-263
173. Teixeira CF, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez JM (2003) Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve* 28:449-459
174. Thordarson DB, Ghalambor N, Perlman M (1997) Intermittent pneumatic pedal compression and edema resolution after acute ankle fracture: a prospective, randomized study. *Foot Ankle Int* 18:347-350
175. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H (1998) Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Medication on Satellite Cell Proliferation During Muscle Regeneration. *The American Journal of Sports Medicine* 26:172-176
176. Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R345-353
177. Tidball JG (2011) Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 1:2029-2062
178. Tiidus PM, Bombardier E (1999) Oestrogen attenuates post-exercise myeloperoxidase activity in skeletal muscle of male rats. *Acta Physiol Scand* 166:85-90
179. Tiidus PM, Holden D, Bombardier E, Zajchowski S, Enns D, Belcastro A (2001) Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. *Can J Physiol Pharmacol* 79:400-406
180. Trunz LM, Landy JE, Dodson CC, Cohen SB, Zoga AC, Roedl JB (2022) Effectiveness of Hematoma Aspiration and Platelet-rich Plasma Muscle Injections for the Treatment of Hamstring Strains in Athletes. *Med Sci Sports Exerc* 54:12-17
181. Ulfig N (2015). *Kurzlehrbuch Histologie*. In (Stuttgart, Georg Thieme Verlag), pp. 238-254.
182. Ulfig N (2019). *Kurzlehrbuch Histologie*. In (Stuttgart, Georg Thieme Verlag), pp. 662-668.
183. Unger EW, Histing T, Rollmann MF, Orth M, Herath E, Menger M, Herath SC, Grimm B, Pohlemann T, Braun BJ (2021) Development of a dynamic fall risk profile in elderly nursing home residents: A free field gait analysis based study. *Arch Gerontol Geriatr* 93:104294

184. Vandeputte C, Taymans JM, Casteels C, Coun F, Ni Y, Van Laere K, Baekelandt V (2010) Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci* 11:92
185. Vieira WF, Kenzo-Kagawa B, Cogo JC, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA (2016) Low-Level Laser Therapy (904 nm) Counteracts Motor Deficit of Mice Hind Limb following Skeletal Muscle Injury Caused by Snakebite-Mimicking Intramuscular Venom Injection. *PLoS One* 11:e0158980
186. Viswanathan K, Dhabhar FS (2005) Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5808-5813
187. Vrinten DH, Hamers FFT (2003) ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 102:203-209
188. Walter J, Kovalenko O, Younsi A, Grutza M, Unterberg A, Zweckberger K (2020) The CatWalk XT® is a valid tool for objective assessment of motor function in the acute phase after controlled cortical impact in mice. *Behavioural Brain Research* 392:112680
189. Walter J, Mende J, Hutagalung S, Grutza M, Younsi A, Zheng G, Unterberg AW, Zweckberger K (2022) Focal lesion size poorly correlates with motor function after experimental traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 17:e0265448
190. Waśko MK, Langner M, Pomianowski S (2016) Posttraumatic Oedema in Lower Limbs. *Advances in Understanding Etiopathogenesis and Treatment. Review Article. Ortop Traumatol Rehabil* 18:519-526
191. Weidner N (1993) Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 10:302-313
192. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (2004) Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 25:73-77
193. Williams JM, Zurawski J, Mikecz K, Glant TT (1993) Functional assessment of joint use in experimental inflammatory murine arthritis. *J Orthop Res* 11:172-180
194. Wilson KE, Bachawal SV, Tian L, Willmann JK (2014) Multiparametric spectroscopic photoacoustic imaging of breast cancer development in a transgenic mouse model. *Theranostics* 4:1062-1071
195. Winkler T, Von Roth P, Matziolis G, Schumann MR, Hahn S, Strube P, Stoltenburg-Didinger G, Perka C, Duda GN, Tohtz SV (2011) Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma. *Acta Orthopaedica* 82:102-111
196. Wishnia A, Alameddine H, Tardif de Géry S, Leroy-Willig A (2001) Use of magnetic resonance imaging for noninvasive characterization and follow-up of an experimental injury to normal mouse muscles. *Neuromuscul Disord* 11:50-55

197. Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL (2005) Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32:43-50
198. Wooley CM, Xing S, Burgess RW, Cox GA, Seburn KL (2009) Age, experience and genetic background influence treadmill walking in mice. *Physiol Behav* 96:350-361
199. Wu Y, Wang R, Meng Q (2021) Clinical Effect of PRP with DPASB on Full-Thickness Rotator Cuff Tears and Its Role in VAS, SST, and Constant Scores of Patients. *Clin Lab* 67
200. Yamamoto N, Oyaizu T, Enomoto M, Horie M, Yuasa M, Okawa A, Yagishita K (2020) VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Sci Rep* 10:2744
201. Yang J, Zhang G, Chang W, Chi Z, Shang Q, Wu M, Pan T, Huang L, Jiang H (2020) Photoacoustic imaging of hemodynamic changes in forearm skeletal muscle during cuff occlusion. *Biomed Opt Express* 11:4560-4570
202. Zaccagnini G, Palmisano A, Canu T, Maimone B, Lo Russo FM, Ambrogio F, Gaetano C, De Cobelli F, Del Maschio A, Esposito A, Martelli F (2015) Magnetic Resonance Imaging Allows the Evaluation of Tissue Damage and Regeneration in a Mouse Model of Critical Limb Ischemia. *PLoS One* 10:e0142111
203. Zacks SI, Sheff MF (1982) Age-related impeded regeneration of mouse minced anterior tibial muscle. *Muscle Nerve* 5:152-161
204. Zheng L, Liu X, Chen P, Xiao W (2019) Expression and role of lncRNAs in the regeneration of skeletal muscle following contusion injury. *Experimental and therapeutic medicine* 18:2617-2627
205. Zimowska M, Duchesnay A, Dragun P, Oberbek A, Moraczewski J, Martelly I (2009) Immunoneutralization of TGF β 1 Improves Skeletal Muscle Regeneration: Effects on Myoblast Differentiation and Glycosaminoglycan Content. 2009:1-16

8. Publikationen/ Danksagung

8.1. Publikation

Die hier vorliegende Arbeit ist zur Veröffentlichung geplant und das Abstract wurde zur Publikation für den Kongress der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie eingereicht und angenommen.

8.2. Danksagung

Vorliegende Studie wurde im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf dem langen Weg begleiteten und mir mein Studium und die Vollendung der Promotion ermöglichten:

Prof. Dr. med. Tina Histing, meiner Doktormutter, gilt besonderer Dank für ihre konstruktive Kritik, ihre Ratschläge und Expertise bei der Erstellung der Arbeit.

Dr. med. Tobias Fritz, meinem Betreuer, gebührt größter Dank für die hervorragende Betreuung sowie das Überlassen des anspruchsvollen und interessanten Projektes. Ich danke ihm für seine vielen Ideen, seine Erreichbarkeit bei sämtlichen Fragen, seine Unterstützung und Hilfe in allen Bereichen, die Begleitung der Dissertation von Anfang an, für das Korrekturlesen der Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und die kritischen Anmerkungen. Ohne seine Hilfe wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. med. Michael D. Menger danke ich herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Arbeiten sowie das großzügige Bereitstellen der Gerätschaften und Räumlichkeiten und der Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke danke ich für seine Zeit, seine Hilfe und seine produktiven sowie kritischen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit und Sichtung der Ergebnisse.

Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die Unterstützung bei den Tierversuchen sowie dem Bereitstellen von Materialien und Hilfestellungen.

Dr. rer. med. Andreas Müller danke ich herzlichst für seine große Hilfe bei der Durchführung der MRT-Untersuchung, Anfertigen der MRT-Bilder sowie seine stetige Unterstützung, das Finden von Lösungsansätzen, seine produktiven Anregungen und seine Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen.

Dr. med. vet. Christina Körbel danke ich für die Einführung in die PAI, ihre Zeit bei der Durchführung der Ultraschallanalyse und Hilfe bei der weiteren Auswertung.

Caroline Bickelmann danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnittpräparate, der ständigen Erreichbarkeit sowie ihrer Hilfe bei offenen Fragen.

Ferner möchte ich mich bei allen weiteren Kollegen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, dem Sekretariat, der Tierpflege und den anderen Doktoranden bedanken. Es war stets ein angenehmes Arbeitsklima und ein kollegialer und hilfsbereiter Umgang. Bei allen Fragen und Problemen fand sich stets gemeinsam eine Lösung. Eine Zeit, die ich nicht missen möchte.

Christina Dahlem, Mandy Binder, Jana Kambert, Madison Adams und *Christian Dahlem* danke ich für die Durchsicht der Arbeit und ihre, auch zum Teil scharfe, konstruktive Kritik.

Dr. med. Musa Kockaya danke ich außerdem für seine Unterstützung, seine Motivation und dafür, dass er stets ein offenes Ohr hat.

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner gesamten Familie und meinen langjährigen Freunden für ihre Liebe und Unterstützung. Meinen Eltern *Elke* und *Andreas Dahlem* gebührt besonderer Dank für die Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg und vor allem dem *Mut machen* und *an sich glauben*. Meiner Schwester *Christina Dahlem*, meinen Großeltern *Willy* und *Ingrid Dahlem, Edith Reinhold* und *Karl-Heinz Reinhold*, der stets auf uns wacht und dessen lustige, muntere Art mir immer in Erinnerung bleibt, danke ich ebenfalls von ganzem Herzen.

Diese Arbeit ist euch allen gewidmet.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

10. Anhang

Ganganalyse

	Tag -1	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Max Contact Area (%)	100±0	96,363±5,142	75,652±17,628	106,372±6,731	109,907±13,000
Max Contact Mean Intensity (%)	100±0	94,93±2,35	85,257±7,522	99,75±2,08	102,141±5,695
Print Area (%)	100±0	93,348±4,771	71,426±16,182	102,319±6,532	104,656±10,261
Duty Cycle (%)	58,399±1,523	55,427±1,695	44,965±3,814	57,070±2,287	44,965±3,814

Tab. 4: CatWalk NaCl Left Hind

	Tag -1	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Max Contact Area (%)	100±0	91,380±4,444	81,626±2,748	112,870±11,681	114,281±10,858
Max Contact Mean Intensity (%)	100±0	96,211±2,056	90,022±3,323	102,367±3,641	104,887±3,127
Print Area (%)	100±0	89,977±4,129	79,000±2,070	108,134±10,862	111,032±8,479
Duty Cycle (%)	59,427±1,393	52,520±1,924	43,281±2,334	54,193±2,025	58,763±0,696

Tab. 5: CatWalk Traumeel Left Hind

Sonographie

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	57,115±2,367	58,755±1,950	70,494±5,761	62,483±8,867	53,194±0,366
Traumeel	64,344±1,974	60,508±1,562	66,409±5,082	69,989±1,262	46,949±1,798
RH	47,75±21,23				

Tab. 6: S0₂ AV 3D [%] NaCl vs. Traumeel

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	100±0	110,423±6,488	143,342±12,311	93,690±14,283	91,325±2,190
Traumeel	100±0	90,665±7,000	113,565±5,144	111,436±5,370	69,637±4,215

Tab. 7: SO₂ AV 3D [delta] NaCl vs. Traumeel

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	119,613±4,957	123,046±4,083	147,631±12,066	130,833±18,550	111,401±0,766
Traumeel	134,431±4,235	126,719±3,272	139,076±10,643	146,574±2,642	98,323±3,766
RH	100±0				

Tab. 8: SO₂ AV 3D [%] NaCl vs. Traumeel gemessen an RH

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	15648,241±146 4,850	12514,303±95,2 85	12106,731±71 3,399	13056,721±187 8,508	12122,753±36 1,625
Traumeel	18242,222±923, 148	16934,918±215 3,247	11873,757±21 3,452	11684,996±79,5 96	10432,196±38 8,026
RH	14625,91±667,8 2				

Tab. 9: HbT Av 3D NaCl vs. Traumeel

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	100±0	101,516±3,332	75,027±11,001	74,864±19,214	89,137±0,251
Traumeel	100±0	101,452±4,145	65,312±5,882	61,454±7,896	58,491±4,495

Tab. 10: HbT Av 3D [delta] NaCl vs. Traumeel

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	99,395±12,879	85,563±0,651	82,776±4,878	89,271±12,844	82,885±2,472
Traumeel	116,706±11,404	115,787±14,722	81,183±1,459	79,892±0,544	71,327±2,653
RH	100±0				

Tab. 11: HbT Av 3D [%] NaCl vs. Traumeel gemessen an RH

Histologie

	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
HE	100,000±0,00 0	168,491±12,691	262,133±31,04 9	226,598±22,78 8	190,590±17,97 6
CD 68	100,000±0,00 0	292,317±50,065	241,950±53,20 3	163,025±25,80 8	91,526±24,007
Caspase -3	100,000±0,00 0	159,767±20,304	203,782±26,29 5	139,495±32,02 0	215,305±31,69 5
MPO	100,000±0,00 0	452,154±165,16 1	126,284±24,85 5	49,484±6,625	49,966±7,483

Tab. 12: Histologie LH NaCl (%)

	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
HE	100,000±0,00 0	123,797±8,492	199,737±35,69 6	144,467±14,64 3	135,165±8,797
CD 68	100,000±0,00 0	259,968±50,812	346,943±64,75 0	108,011±13,35 4	88,765±8,523
Caspase -3	100,000±0,00 0	137,560±18,468	180,016±40,11 1	83,490±7,043	103,151±11,31 3
MPO	100,000±0,00 0	595,483±123,75 6	129,706±47,02 8	39,445±3,934	36,469±4,810

Tab. 13: Histologie LH Traumeel (%)

Muskeldurchmesser

	Vor Kon- tusion	Nach Kon- tu- sion	Nach Injek- tion	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	92,32±1, 44	100± 0	105,194±1,5 35	109,085±4,3 44	99,02±2, 49	99,396±1,1 56	90,48±2, 79
Traume el	92,63 ±1,96	100± 0	111,058±2,5 77	105,743±5,0 49	99,18±2, 16	89,432±4,7 92	89,3±5,0 4

Tab.14: Schiebelehre Dicke mm [%]

MRT

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	100±0	66,669±5,340	52,98±2,91	47,952±3,768	46,785±2,547
Traumeel	100±0	59,580±7,543	61,675±5,50	38,833±2,795	40,024±2,132

Tab. 15: Ödem mm³ [%] NaCl vs. Traumeel

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	100±0	55,95±3,56	46,734±4,312	35,562±3,146	24,86±1,73
Traumeel	100±0	52,09±6,21	43,836±5,267	20,439±2,627	21,739±3,51

Tab. 16: intramuskuläres Ödem NaCl vs. Traumeel LH vs RH mm³ [%]

	Tag0	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
NaCl	100±0	97,496±3,061	93,14±3,39	92,301±0,862	86,804±0,883
Traumeel	100±0	93,223±1,435	93,06±1,05	86,031±1,728	88,772±1,115

Tab. 17: Umfang mm [%] NaCl vs. Traumeel