

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie (ZOU)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Beeinflussung der Heilung nach einem Muskelbündelriss durch Actovegin und Traumeel S

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lisa Nauth  
aus Rüsselsheim

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 7. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	I
Diagrammverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Bedeutung von Muskelverletzungen.....	3
2.2 Aufbau der Muskulatur.....	5
2.2.1 Skelettmuskulatur.....	6
2.2.2 Kontraktion der Skelettmuskulatur.....	7
2.2.3 Fasertypen der Skelettmuskulatur.....	9
2.3 Muskelverletzungen.....	10
2.3.1 Pathogenese.....	11
2.3.2 Klassifikationen.....	12
2.3.3 Physiologische Muskelheilung.....	15
2.4 Satellitenzellen.....	18
2.5 Pax 7.....	19
2.6 CD56.....	20
2.7 Medikamentöse Therapie.....	20
2.7.1 Actovegin.....	21
2.7.2 Traumeel S.....	22
2.8 Therapie von Muskelverletzungen nach Dr. Hans-Wilhelm Müller-Wohlfahrt.....	23
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Tiere und Materialien.....	24
3.1.1 Tiere und Tierhaltung.....	24
3.1.2 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Primer.....	24
3.1.3 Medikamente.....	28
3.1.4 Geräte.....	29
3.2 Tierversuchsantrag.....	30
3.3 Tiermodell.....	30
3.3.1 Zeitlicher Ablauf der Versuche.....	31
3.3.2 Tierhaltung.....	33
3.3.3 Anästhesie.....	34
3.3.4 Operationsvorbereitung.....	36
3.3.5 Operationstechnik.....	37

3.3.6	Therapeutische Injektionen .....	41
3.3.7	Euthanasie der Tiere .....	42
3.3.8	Entnahme der Muskelproben .....	43
3.4	RNA-Extraktion und PCR-Analyse .....	45
3.4.1	Isolation .....	46
3.4.2	Reverse Transkription .....	48
3.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	49
3.5	Histologische Schnitte.....	51
3.5.1	Präparation der Histologie.....	52
4	Ergebnisse.....	54
4.1	RT-PCR .....	55
4.1.1	Zusammenfassung der RT-PCR-Analyse .....	59
4.1.2	Daten der RT-PCR-Analyse .....	60
4.2	Histologische Schnitte.....	75
4.2.1	NaCl-Injektionen (Gruppe 1) .....	76
4.2.2	Actovegin-Injektionen (Gruppe 2).....	78
4.2.3	Traumeel-Injektionen (Gruppe 3) .....	80
4.2.4	Kombinierte Actovegin & Traumeel-Injektionen (Gruppe 4).....	82
4.2.5	Kontrollgruppe ohne Injektionstherapie (Gruppe 5) .....	84
4.2.6	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.....	86
5	Diskussion .....	88
5.1	Etablierung des Tiermodells.....	89
5.2	In-vivo-Versuche .....	93
6	Zusammenfassung .....	97
7	Literaturverzeichnis.....	98
8	Anhang .....	102
9	Danksagung.....	109
10	Lebenslauf .....	110

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Muskelverletzung nach Ryan.....	12
Tabelle 2: Einteilung der Muskelverletzung nach Chan et al.....	13
Tabelle 3: Tiere und Tierhaltung.....	24
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	25
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Kits .....	26
Tabelle 6: PCR-Primer .....	27
Tabelle 7: Medikamente .....	28
Tabelle 8: Geräte.....	29
Tabelle 9: Gruppeneinteilung der Versuchstiere .....	30
Tabelle 10: Medikamentendosierung Anästhesie .....	35
Tabelle 11: Injektionsvolumina .....	41
Tabelle 12: Durchführung der reversen Transkription.....	49
Tabelle 13: Verwendete Primer .....	50
Tabelle 14: Volumina und Zeiten für Real-Time-PCR.....	50
Tabelle 15: PCR-Daten Tag 1 18S und NCAM1 .....	61
Tabelle 16: PCR-Daten Tag 1 Myosin .....	62
Tabelle 17: PCR-Daten Tag 1 Pax7 .....	64
Tabelle 18: PCR-Daten Tag 3 18S und NCAM1 .....	66
Tabelle 19: PCR-Daten Tag 3 Myosin .....	67
Tabelle 20: PCR-Daten Tag 3 Pax7 .....	69
Tabelle 21: PCR-Daten Tag 7 18S und NCAM1 .....	71
Tabelle 22: PCR-Daten Tag 7 Myosin .....	72
Tabelle 23: PCR-Daten Tag 7 Pax7 .....	74
Tabelle 24: Übersicht der histologischen Ergebnisse. (B: Blutung, L: Leukozyten, N: Nekrose, Ö: Ödem, F: Fibrose NEO: Neovaskularisation; Gruppeneinteilung: 1: NACL, 2: Actovegin, 3: Traumeel, 4: Actovegin und Traumeel, 5: keine Injektionen).....	86
Tabelle 25: Zeitplan der Tierversuche .....	108

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Euthanasie der Tiere, Gruppeneinteilung.....	42
Diagramm 2: Zeitlicher Ablauf der gesamten PCR Untersuchung .....	45

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Muskelquerschnitt mit bindegewebigen Hüllsystemen [8, 9].....	5
Abbildung 2: Morphologische Organisation des quergestreiften Muskels [10] .....	6

Abbildung 3: Klassifikation akuter Muskelverletzungen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Konsensus-Konferenz, München (2011) [7, 8] .....	14
Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf im Tiermodell einer stellvertretenden Versuchsgruppe .....	32
Abbildung 5: Einleitungsbox für Anästhesie.....	34
Abbildung 6: Genexpressionsanalyse von Myh1 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).....	56
Abbildung 7: Genexpressionsanalyse von NCAM1 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).....	57
Abbildung 8: Genexpressionsanalyse von Pax7 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).....	58
Abbildung 9: Zusammenfassung der RT-PCR-Analyse. Mittelwert der Triplikate (n=12) dargestellt mit dem Standardfehler. p-Werte < 0.05 werden als statistisch signifikant gewertet. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).....	59

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CD56	Cluster of Differentiation 56 (Synonym für NCAM, siehe dort)
cDNA	complementary DesoxyriboNucleinAcid
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert, auch Schwellenwert-Zyklus
DTT	Dithiothreitol
gtt	Guttae, also Tropfen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IPO	Inositol-Phospho-Oligosaccharide
kg	Kilogramm
M.	Musculus
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter
Myf5	Myogenic factor 5
NaCl	Natriumchlorid
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
nm	Nanometer
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
Nr	Nummer
Pax7	Paired box 7
PCR	Polymerase-chain-reaction /Polymerasekettenreaktion
PECH	Pause-Eis-Kompression-Hochlagerung
PRP	"Plättchen-reiches Plasma"

	(engl: Platelet-Rich Plasma)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinase
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
rpm	Rounds per minute



## **1 Ziel der Dissertation**

Muskelverletzungen zählen insbesondere im Profisport zu den häufigsten Verletzungen. Sie machen etwa ein Drittel aller Verletzungen im Profifußball aus [1]. Trotz dieser hohen Relevanz gibt es keine einheitlichen Empfehlungen bezüglich der Therapie. Allerdings gibt es viele unterschiedliche Therapieansätze. Einer dieser Therapieansätze nach Müller-Wohlfahrt findet seit Jahren in der Sportmedizin Anwendung und beinhaltet die Behandlung mit Actovegin- und Traumeel-Injektionen [2]. Es gibt bis dato jedoch keine hinreichenden Studien, die den positiven Effekt dieser Therapie wissenschaftlich belegen.

Anhand eines standardisierten Tiermodells sollen der Einfluss von Actovegin und Traumeel S als Monopräparate und in Kombination auf die Heilung von strukturellen Muskelverletzungen untersucht werden. Mit diesem Modell soll überprüft werden, ob Actovegin und Traumeel S auch wissenschaftlich einen erfolgsversprechenden Therapieansatz darstellen und ob die Wirkung der beiden Substanzen tatsächlich die Muskelregeneration, wie klinisch vermutet, fördert.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde im Rahmen der dargelegten Arbeit das im Folgenden beschriebene Tiermodell (siehe Kapitel 2.2) etabliert. In diesem Modell wird bei Ratten chirurgisch eine strukturelle Läsion des Musculus rectus femoris des Musculus quadriceps femoris erzeugt und somit ein Muskelbündelriss simuliert. Im Anschluss werden die Läsionen mit Actovegin, Traumeel oder physiologischer Natriumchloridlösung in verschiedenen Tiergruppen behandelt und mit der physiologischen Muskelheilung verglichen. An unterschiedlichen Zeitpunkten werden Muskelproben entnommen. Ein Teil der dabei gewonnenen Muskelgewebsproben wird zu histologischen Schnitten weiterverarbeitet. Dabei dient Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als orientierende Färbung. Es erfolgt eine mikroskopische Auswertung der Schnitte.

Des Weiteren werden mit den gewonnenen Muskelgewebsproben Real-Time-Polymerasekettenreaktionen (RT-PCR) durchgeführt und auf Faktoren hinsichtlich stattfindender Muskelheilung untersucht (siehe auch Kapitel 2.3).

Das entwickelte in-vivo-Tiermodell soll die klinisch beschriebenen Heilungserfolge von Actovegin und Traumeel S wissenschaftlich untersuchen und somit das Wissen bezüglich der Beeinflussung der Muskelheilung der beiden Substanzen erweitern.

Diese Dissertation ebnete den Weg und war die Basis für die Publikation „Intramuscular Injection of Combined Calf Blood Compound (CFC) and Homeopathic

Drug Tr14 Accelerates Muscle Regeneration In Vivo“ von Belikan, Nauth et al. im  
“International Journal of Molecular Science”.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Bedeutung von Muskelverletzungen**

Zerrung, Verrenkung, Prellung oder Faserriss - beinahe jeder Hobby- oder Profisportler kennt diese Verletzungen und fürchtet sie. Sportverletzungen sind nicht nur schmerzhaft und störend, sondern stellen gerade im Berufssport auch eine sozioökonomische Belastung für die Betroffenen und deren Vereine dar. Insbesondere im Leistungs- und Hochleistungssport können sich Athleten bei verletzungsbedingten Ausfällen aufgrund der finanziellen Einbußen existenziell bedroht fühlen.

In einem männlichen Profi-Fußballteam mit 25 Spielern kommt es im Durchschnitt pro Saison zu 15 Muskelverletzungen. Dies führt zu 223 versäumten Trainingstagen und hochgerechnet zu 37 nicht absolvierten Spielen [1]. Beachtliche Zahlen, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Kosten für manche Spieler pro Saison häufig im zweistelligen Millionenbereich liegen und in der Spitze bei Neueinkäufen heutzutage bis zu dreistellige Millionensummen aufgewendet werden. Lange Trainings- und Wettkampfpausen werden daher von Sportlern und Vereinen gefürchtet.

Da Muskelverletzungen sowohl im Freizeit- als auch im Profisport zu den häufigsten Verletzungen zählen [1, 3], besteht seit Jahren ein hohes medizinisches Interesse an deren Prävention und Therapie. Die physiologische Muskelheilung ist ein langsamer Prozess und erfordert Zeit, die gerade im Hochleistungssport sehr oft nicht gegeben ist. Zudem kann es bei nicht ausreichender Heilung bzw. fehlender Ausheilung an den verletzten Arealen zu Wiederverletzungen kommen [4, 5].

Zur primären, notfallmäßigen Therapie von Muskelverletzungen ist das PECH-Prinzip (Pause, Eis, Kompression und Hochlagerung), auf Englisch auch RICE-Prinzip (Rise, Ice, Compression, Elevation) allgemein akzeptiert. Diese Akuttherapie in der ersten Phase der Verletzung wird im besten Fall schon direkt am Spielfeldrand von Physiotherapeuten oder Ärzten angewandt mit dem Ziel, eine intramuskuläre Einblutung zu minimieren, eine ausgeprägte Schwellung zu verhindern, Schmerzen zu lindern und somit eine allgemeine Sekundärverschlimmerung der Verletzung zu vermeiden [6]. Darüber hinaus kommen regelmäßig Antiphlogistika und Physiotherapie zum Einsatz. Trotz stetig verbesserten Therapieformen dauert es dennoch oft Wochen oder Monate, bis der Sportler wieder auf seinem ursprünglichen Leistungsniveau belastbar und einsatzfähig ist.

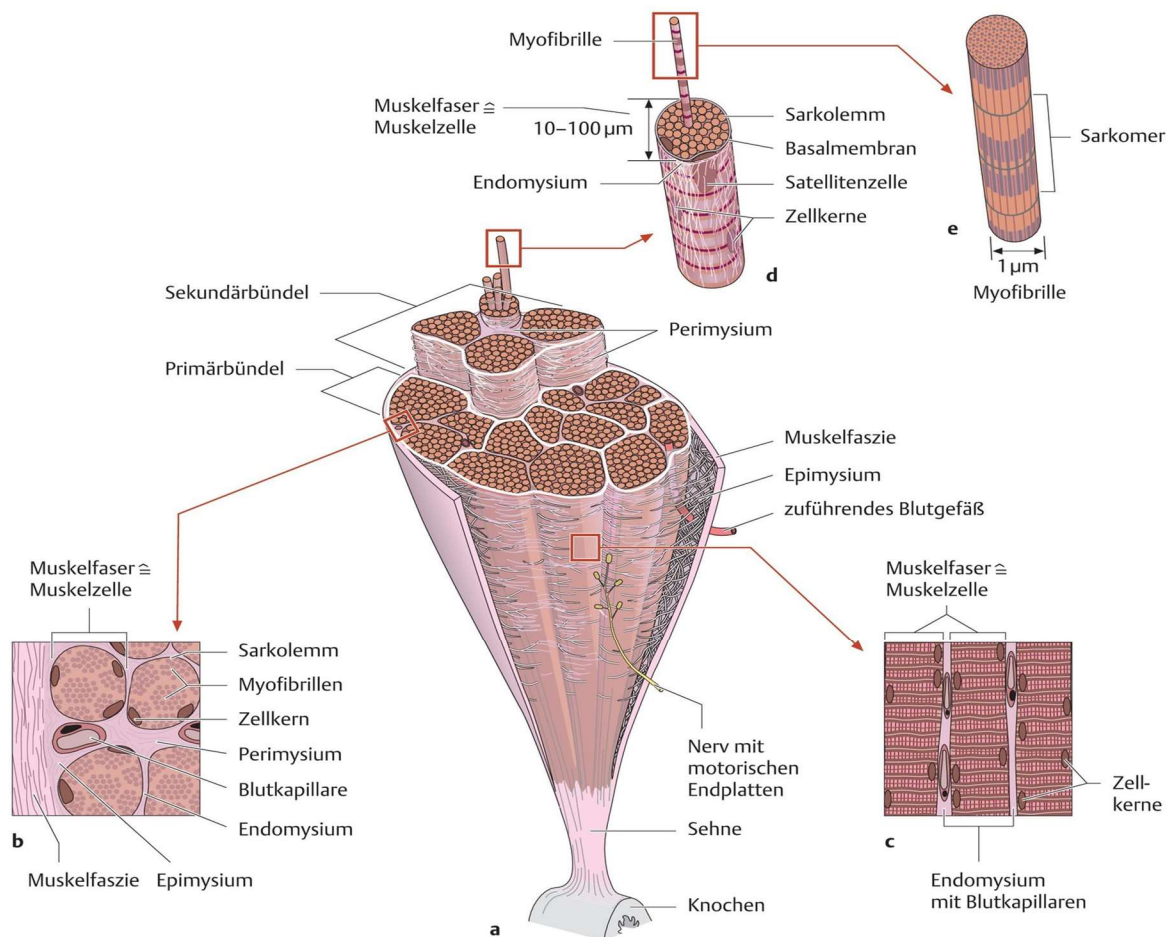
Zu Muskelverletzungen im Allgemeinen zählen verschiedene Verletzungstypen, sodass der Begriff „Muskelverletzung“ nur als Oberbegriff gilt. Zur Verbesserung der Kommunikation unter Therapeuten gab es in den vergangenen Jahren viele Ansätze, Muskelverletzungen zu klassifizieren. Nach Müller-Wohlfahrt lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden: funktionelle und strukturelle Muskelverletzungen [7].

Die Muskelheilung findet abhängig vom umgebenden Milieu im Verletzungsgebiet auf zwei unterschiedlichen Wegen statt. Zum einen kann neues, funktionelles Muskelgewebe entstehen, das in einer vollen Leistungs- und Funktionsrückkehr resultiert. Vernarbt das Gewebe allerdings, entsteht ein minderwertigeres Narbengewebe, welches nicht die eigentliche Funktion der Muskulatur erfüllt. Die fehlende Kontraktilität und Elastizität stellen eine mögliche Erklärung für die hohe Wiederverletzungsrate an identischer Stelle dar.

Die beste Therapieform von Muskelverletzungen wird trotz hohem wissenschaftlichem Stand der Medizin vielfach diskutiert, da es kaum verlässliche oder evidenzbasierte Studien zu dieser Thematik gibt. In der Hoffnung, die Heilung beschleunigen zu können, werden von Sportmedizinern insbesondere im Profisport regelmäßig Präparate in die Verletzungsregionen injiziert. In diesem Zusammenhang kommen auch Actovegin und Traumeel zur Anwendung. Der genaue Wirkungsmechanismus von Actovegin und Traumeel ist bisher weitestgehend unerforscht. Trotz häufig berichteter klinischer Erfolge bei der Therapie von Muskelverletzungen gibt es für die Anwendung dieser Agenzien keinen wissenschaftlichen Beleg. Es fehlen bis heute in der Literatur randomisierte, prospektive, kontrollierte klinische Studien, um eine allgemeine Therapieempfehlung für oder gegen eine der angewendeten Therapieformen aussprechen zu können.

## 2.2 Aufbau der Muskulatur

Grundsätzlich unterscheidet man drei Typen von Muskulatur: Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatte Muskulatur. Alle Muskelarten folgen einem gleichen Grundaufbau, unterscheiden sich jedoch feinbaulich und funktionell. Die kleinsten Einheiten des Muskels sind die Myofilamente Aktin und Myosin. Aktin und Myosin sind Proteine, die unter Anwesenheit von Calcium eine Kontraktion ermöglichen. Diese bilden die Myofibrillen. Myofibrillen wiederum liegen innerhalb des Endomysiums einer Muskelfaser. Die Muskelfaser entspricht einer Muskelzelle. Muskelzellen sind durch ein Perimysium zu Sekundärbündeln zusammengefasst. Viele Sekundärbündel bilden das Tertiärbündel, welches von einem Epimysium umgeben ist und funktionell dem gesamten Muskel entspricht [8].



**Abbildung 1: Muskelquerschnitt mit bindegewebigen Hüllsystemen [8, 9]**

Für die hier vorliegende Arbeit ist die quergestreifte Skelettmuskulatur relevant, sodass im Weiteren näher darauf eingegangen werden soll.

## 2.2.1 Skelettmuskulatur

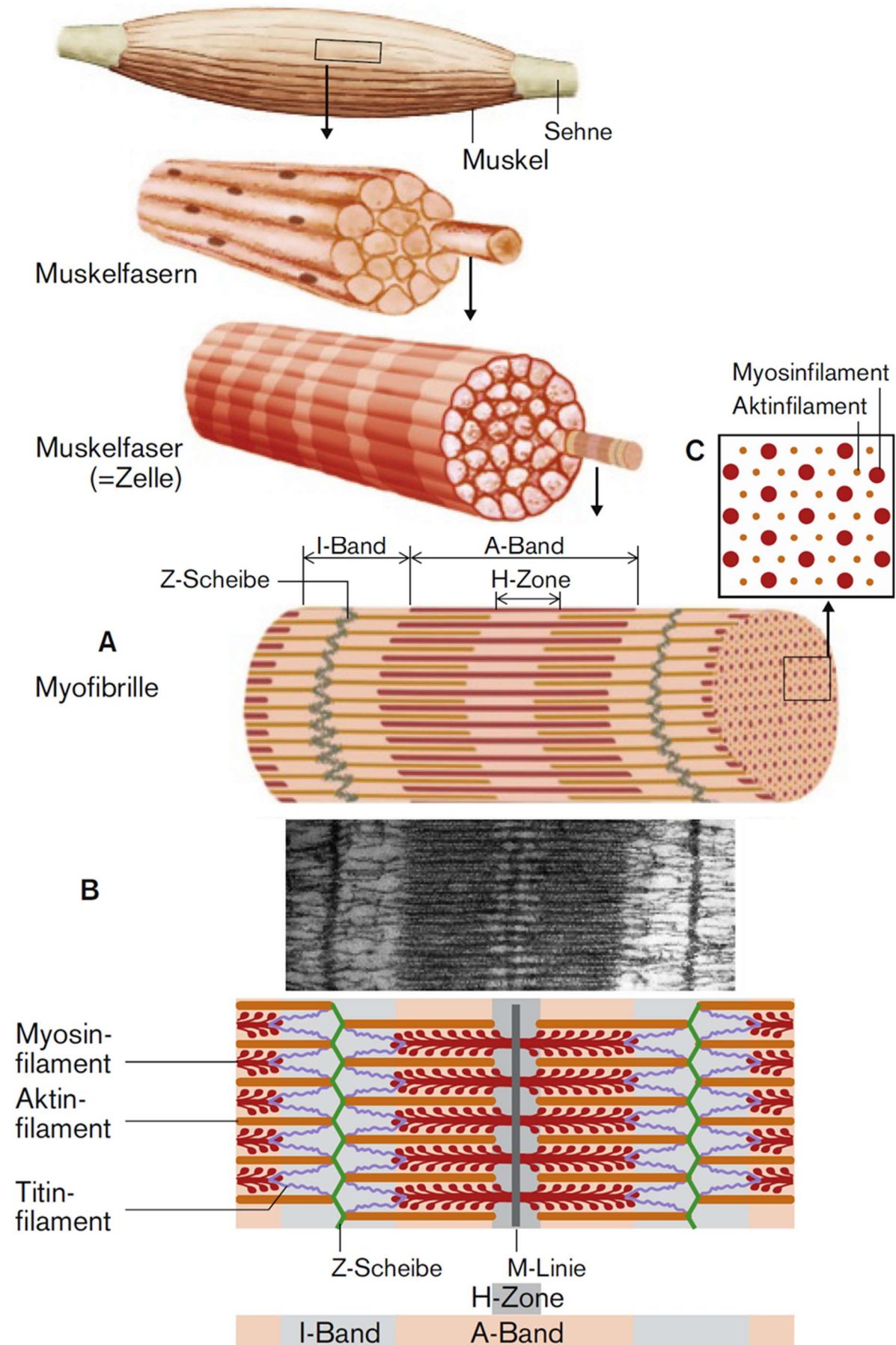


Abbildung 2: Morphologische Organisation des quergestreiften Muskels [10]

Die Skelettmuskulatur wird auch als quergestreifte Muskulatur bezeichnet, da sie lichtmikroskopisch aufgrund der Anordnung der Filamente quergestreift erscheint. Hauptelemente dieser Querstreifung sind die dunkle A-Bande (anisotrop) und die helle I-Bande (isotrop).

Die dunkle A-Bande mit einer helleren, mittig gelegenen H-Zone bildet den Bereich, in dem sich Aktin und Myosin überlappen. In der H-Zone liegt kein Aktin, sondern nur Myosin vor. In der H-Zone befindet sich der dunklere M-Streifen, in dem die Myosinfasern verankert sind. In der hellen I-Bande liegen die Teile der Aktinfilamente, die nicht mit Myosin überlappen. Die Aktinfilamente sind in der Z-Scheibe verankert.

Die Skelettmuskelfasern sind funktionelle Synzytien mit randständigen Zellkernen. Zwischen Zellmembran und Basallamina liegen die Muskelstammzellen, die sogenannten Satellitenzellen.

Entscheidend für die Muskelfunktion ist die Kontraktion, aus der eine Bewegung resultiert oder durch die Haltearbeit geleistet wird. Voraussetzung für die willkürliche Ansteuerung der Muskulatur ist eine Innervierung über die motorische Endplatte in motorischen Einheiten.

### 2.2.2 Kontraktion der Skelettmuskulatur

Kontrahiert sich der Muskel oder wird er gedehnt, verändert sich die Gesamtlänge des Muskels. Die einzelnen Filamente Aktin und Myosin verändern dabei ihre Länge nicht. Vielmehr gleiten sie aneinander und überlappen so mehr (Kontraktion) oder weniger (Dehnung). Durch einen neuronalen Impuls steigt die zyttoplasmatische Calciumkonzentration, sodass das Protein Tropomyosin die Myosinbindungsstelle am Aktin freigibt und so den Weg der Kontraktion ebnet.

Nun kann an dieser Stelle das Protein Myosin, welches auch als Motorprotein des Muskels bezeichnet wird, andocken. Dieses Protein trägt an seinem Kopf eine ATP (Adenosintriphosphat)-Bindungsstelle. Die Bindung an Aktin erfolgt durch die Spaltung des ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) und Phosphat. Die beiden Spaltprodukte sind immer noch an das Myosinköpfchen gebunden. Werden sie nun abgegeben, kann das gebundene Myosinköpfchen um  $45^\circ$  abknicken. Pro Knick werden die Fasern im Rahmen einer Kontraktion um circa 10-20 nm ineinandergeschoben.

Nun muss erneut ein ATP-Molekül am Myosinköpfchen binden, um dieses vom Aktin zu lösen. Das Myosinprotein richtet sich im Folgenden wieder in seinen Ursprungswinkel ( $90^\circ$  von Myosinkopf zu Myosinhals) auf. Dadurch kann der Zyklus erneut beginnen, allerdings an einer neuen Stelle, die wiederum 10-20 nm weiter liegt.

Somit kann pro Kontraktionszyklus und Sarkomer eine Verkürzung von etwa 20-40 nm erreicht werden. Da die Sarkomere hintereinander in Reihe liegen, addieren sich die Verkürzungen der einzelnen Sarkomere, sodass es in der Summe zu einer makroskopisch sichtbaren Kontraktion kommt [11, 12].



### 2.2.3 Fasertypen der Skelettmuskulatur

Zur groben Unterscheidung kann man die quergestreifte Skelettmuskelfasern in zwei Kategorien einteilen. Diese haben unterschiedliche metabolische und physiologische Eigenschaften. Kommt ein Aktionspotenzial über die motorische Endplatte an den entsprechenden Fasern an, reagieren diese immer mit einer einzelnen Zuckung, sobald die Schwelle überschritten ist, egal wie stark das eintreffende Signal ist. Sie werden deshalb als Zuckungsfaser, im Englischen twitch fibres, bezeichnet.

Typ I-Fasern werden auch als langsame oder rote Fasern bezeichnet und sind durch eine dunkle Farbe gekennzeichnet, die vom hohen Gehalt an Myoglobin, Mitochondrien und Kapillaren hervorgerufen wird. Wegen der aeroben Stoffwechsellage ist dieser Typ von Muskulatur für Haltearbeiten prädestiniert. Diese Fasern ermüden nur sehr langsam und werden daher als ermüdungsresistent bezeichnet. Da sie allerdings nur langsam auf Signale ansprechen, werden sie als „slow twitch“-Fasern bezeichnet.

Typ II-Fasern, auch schnelle Fasern genannt, sind von weißer Farbe. Diese Fasern leisten wegen des hohen Glykogengehalts bei gleichzeitig eher geringem Myoglobin- und Mitochondriengehalt schnelle, kurze und kraftvolle Kontraktionen. Die Stoffwechsellage ist hierbei anaerob. Dadurch ermöglichen sie kraftvolle und schnelle Kontraktionen, ermüden jedoch schnell. Sie werden als „fast twitch“-Fasern bezeichnet und finden sich insbesondere in der Bewegungs- und Schnellkraftmuskulatur [13].

Typ II-Fasern lassen sich in zwei weitere Untergruppen unterteilen, nämlich in IIA- und IIB-Fasern. Die Typ IIA-Fasern liegen mit ihren Eigenschaften zwischen Typ I- und Typ II-Fasern und werden daher auch als Intermediärtyp bezeichnet. Das heißt, diese Fasern ermüden langsamer als Typ-II-Fasern, haben jedoch eine gute Ausstattung an Mitochondrien und somit die Grundlage zum oxidativen Stoffwechsel [14]. Das Vorhandensein der unterschiedlichen Fasertypen in den einzelnen Muskeln ist zwar genetisch festgelegt, jedoch lässt sich diese Ausstattung mit Training modifizieren. Je nachdem welche Sportart ausgeübt wird, passt sich die Muskulatur in einem gewissen Rahmen an. Bei Ausdauersportlern wie Marathonläufern dominieren die aerob arbeitenden und nicht so schnell ermüdenden Typ I-Fasern. Typ II-Fasern, welche besonders schnell und kraftvoll, jedoch mit schneller Ermüdung arbeiten, sind beispielsweise bei Sprintern besonders ausgeprägt [15].

### 2.3 Muskelverletzungen

Wenn der oben beschriebene physiologische Aufbau der Muskulatur aus innerer oder äußerer Ursache gestört wird, kann die Funktion eingeschränkt werden oder gänzlich zum Erliegen kommen. Die Schwere der Verletzung definiert das Ausmaß des Funktionsverlustes. Bei einer Muskelzerrung bleibt die ursprüngliche Muskelstruktur erhalten und es kommt zu einer Überdehnung der Sarkomere. Bei einem Muskelfaser- oder -bündelriss hingegen reißen je nach Ausprägung wenige bis hin zu vielen Fasern eines Muskels. Es entsteht ein auch makroskopisch nachweisbarer struktureller Gewebeschaden.

Die Schwere der Verletzung korreliert häufig mit der beim Trauma einwirkenden Kräfte. Müller-Wohlfahrt unterscheidet zwischen direkten und indirekten Muskelverletzungen. Direkte Muskelverletzungen entstehen aufgrund einer Einwirkung von außen, zum Beispiel durch Tritte, Schnitte oder Schläge. Indirekte Muskelverletzungen, die aufgrund innerlicher Kraftmissverhältnisse entstehen, werden noch einmal nach funktionellen oder sichtbar strukturellen Schäden unterteilt. Im folgenden Kapitel „Klassifikation“ wird hierauf noch detaillierter eingegangen [8].

Indirekte Muskelverletzungen sind häufige Sportverletzungen. Sowohl funktionelle, als auch strukturelle Schäden beeinträchtigen die Sportler sehr und sind der Hauptgrund für schmerzbedingte Trainingsunterbrechungen. Gehäuft bei Leistungssportlern kommt es bei langen und intensiven Trainingseinheiten zu einer Rigidität des beanspruchten Muskels. Insbesondere gegen Ende der Trainingseinheiten, wenn der Muskel übermüdet ist und das ATP als Energieträger für das Lösen der Myosinfilamente von den Aktinfilamenten nicht mehr ausreicht und die Konzentration an Stoffwechselendprodukten ansteigt, ist der Muskel besonders rigide. Reißt nun eine Muskelfaser, ist der natürliche Verlauf der Muskulatur unterbrochen. Der entstehende Gewebedefekt füllt sich initial mit Blut. Es entsteht ein Hämatom. Zum Eigenschutz des Muskels wird der Tonus proximal und distal der Verletzung gesteigert. Des Weiteren entwickelt sich im Verlauf ein Ödem an der betroffenen Stelle [2].

Häufig betroffene Muskelgruppen sind die Adduktoren, die ischiokrurale Muskulatur, der Musculus rectus femoris des Quadriceps femoris sowie die Wadenmuskulatur, da diese tonisch arbeiten und somit zur Verkürzung neigen. Diese Muskelgruppen sind besonders bei häufigen Sprints und Sprüngen, wie sie beispielsweise beim Fußball vorkommen, verletzungsanfällig. Die auftretenden Belastungen sind hoch und bringen die Muskulatur an die Grenzen ihrer Zugbelastbarkeit. Die dabei entstehenden

Verletzungen sind insbesondere am muskulotendinösen Übergang distal oder proximal lokalisiert [16, 17].

### 2.3.1 Pathogenese

Muskelverletzungen im Sport können aufgrund zweier unterschiedlicher Arten von Traumata entstehen. Als direktes Trauma ist die Kontusionsverletzung aufzuführen, also Schäden, die aufgrund von Tritten, Schlägen, Prellungen oder Quetschungen entstehen. Diese sind besonders bei Kontaktsportarten häufig.

Gerade bei Lauf- und Sprintsportarten kommt es bei Über- und Fehlbelastung der Beinmuskulatur mit wechselnder exzentrischer Muskelbelastung zu indirekten Muskelverletzungen [6]. Je nach Schwere der Verletzungen werden die indirekten Muskelverletzungen weiter unterteilt.

### 2.3.2 Klassifikationen

Zur optimalen Therapie von Muskelfaserverletzungen ist es nötig, diese präzise zu klassifizieren und eine einheitliche Ausgangsbasis für jeden Therapeuten zu schaffen. Je genauer kommuniziert wird, desto effektiver kann die Behandlung gestaltet werden. Um Muskelverletzungen einzuteilen, gibt es verschiedene Ansätze: Ryan teilt die Verletzung nach dem strukturellen Schaden in vier unterschiedliche Grade ein. Ausschlaggebend für die Einstufung einer Verletzung hierbei ist die Verletzung der Muskelfaszie. Die Abstufung reicht von einer intakten Faszie bis zum vollständigen Faszien- und Muskelriss (Grad 4) [18].

	Größe	Faszie	Blutung	Klinischer Befund	Bewegung
I	Wenige Muskelzellen	Intakt	Klein	Lokalisierte Schmerz	Schmerzhaft, aber möglich
II	Mittelgroßes Muskelareal	Intakt	Flüssige und geronnene Anteile	Palpabler Muskelwulst	Geringes Bewegungsausmaß möglich
III	Großes Areal, mehrere verschiedene Areale im Muskel bzw. der Muskelgruppe möglich	Teilweise defekt	Größere Menge, aber diffus, da Faszie defekt	Deutliche, generalisierte Schwellung	Keine Bewegung möglich
IV	Gesamter Muskel bzw. mehrere Muskeln der Muskelgruppe	Komplett defekt	Größere Menge, aber diffus, da Faszie defekt	Sehr starke, generalisierte Schwellung mit gespannter Haut	Keine Bewegung möglich

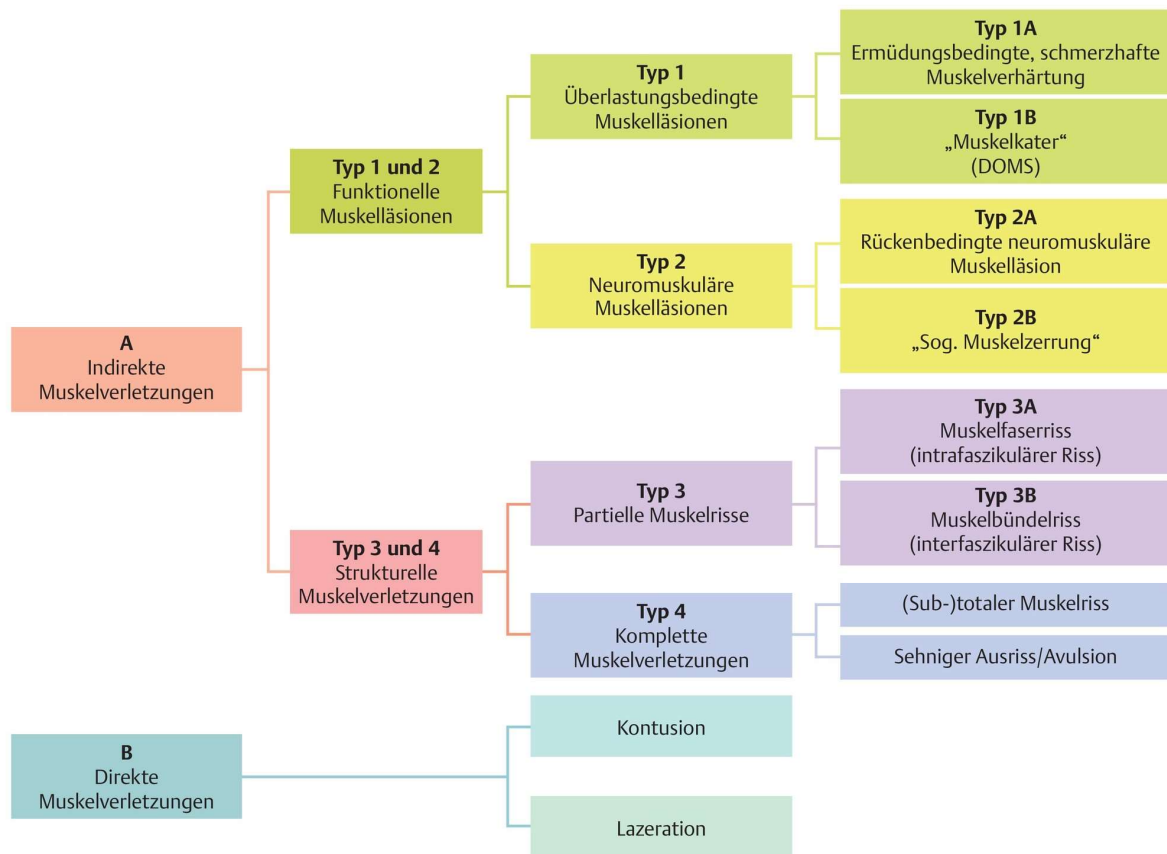
**Tabelle 1: Einteilung der Muskelverletzung nach Ryan**

Eine weitere Möglichkeit der Einteilung ist die Klassifikation von Chan et al., die die Muskelverletzungen nach dem intramuskulären Schaden einteilen. Das Ausmaß der Verletzung wird für diese Klassifikation mit einer Magnetresonanztomografie oder einer Ultraschalluntersuchung festgestellt. Die Unterteilung erfolgt anhand der Position der Läsion (proximal, mittig, distal), der verletzten Strukturen (faszial, myofaszial, perifaszial, muskulotendinös oder einer Kombination) sowie der Läsionsgröße in Prozent [19].

Lage der Läsion			MRT	Ultraschall
1) Proximales MTJ			I) <5% der Fasern betroffen	I) Normal, fokale Erhöhung der Echogenität möglich
2) Muskel	A) proximal B) mittig C) distal	a) Intramuskulär b) myofaszial c) myofaszial/perifaszial d) myotendinös e) Kombination	II) Ödem und Einblutung entlang Faszien und zwischen Muskelgruppen, desorganisierte Fasern	II) Unterbrochene Fasern, Hypervaskularisation, echoverstärkt
3) Distale MTJ			III) komplette Diskontinuität	III) Wie bei MRT

**Tabelle 2: Einteilung der Muskelverletzung nach Chan et al.**

Die eben dargestellten Einteilungen stellen nur einen kleinen Auszug der vorhandenen Klassifikationen dar. Im Rahmen der Konsensus-Konferenz am 03. März 2011 in München wurde unter der Leitung von Müller-Wohlfahrt eine neue Klassifikation entwickelt, die sowohl die Ursache, als auch den funktionellen oder strukturellen Schaden einbezieht (Siehe Abbildung 3) [7, 8]. Diese Klassifikation hat sich in Deutschland seitdem durchgesetzt und vereinfacht so die Kommunikation zwischen Ärzten und allen beteiligten Therapeuten.



**Abbildung 3: Klassifikation akuter Muskelverletzungen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Konsensus-Konferenz, München (2011) [7, 8]**

### **2.3.3 Physiologische Muskelheilung**

Um die verletzte Muskulatur wieder wie vor einer Läsion nutzen zu können, bedarf es wesentlicher Prozesse der Heilungskaskade. Diese drei Phasen der Heilung (Entzündung, Regeneration, Remodelling) haben jedoch einen fließenden Übergang und laufen physiologisch in der Regel parallel ab.

#### **2.3.3.1 Entzündungsphase**

Die erste Phase des Regenerationsprozesses wird auch „Destruktionsphase“ genannt. Sie findet an den Tagen 1 bis 5 nach einem Muskeltrauma statt. Kennzeichnend für diese Phase ist eine Entzündung, die aufgrund von Zerstörung zellulärer Strukturen stattfindet. Zusätzliche Einblutungen können die Entzündungsreaktion verstärken. Je nach Lokalisation und Schweregrad kann die Blutmenge mehrere 100 ml betragen. Die geschädigten Muskelzellen werden nekrotisch und sterben schließlich ab.

Eingewanderte neutrophile Granulozyten und Thrombozyten sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Sowohl diese, als auch die freigewordene intrazelluläre Matrix verstärken die Entzündungsreaktion.

Die Neutrophilen phagozytieren abgestorbene Zellen und sezernieren freie Radikale und Proteasen. Diese können das Gewebe zusätzlich schädigen. Somit verstärkt sich die Entzündungsreaktion selbst und führt zu Sekundärschäden. Um diese zu reduzieren, hat sich die Inhibierung von Neutrophilen als mögliche Behandlung als sinnvoll erwiesen [4].

Neben den neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten wandern auch Makrophagen ein. Ihre Hauptfunktion besteht in der Phagozytose der apoptotischen Zellreste. Dabei sezernieren sie ebenfalls Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Muskelzellen anti-apoptotisch beeinflussen können [4, 6].

Zusammengefasst ist die Entzündungsphase ein komplex reguliertes Zusammenspiel vieler Zellarten, die je nach Aktivität die nächste Phase der Heilung verzögern oder beschleunigen können.

### **2.3.3.2 Regenerationsphase**

An die Phase der Entzündung schließt sich die Phase der Regeneration an, welche auch als Reparaturphase bezeichnet wird. Sie findet zwischen dem 5. und 10. Tag statt. Dabei werden Zelltrümmer abgebaut und das Hämatom resorbiert. Des Weiteren werden zum Überbrücken der Ruptur eine Bindegewebsbrücke und neue Myofilamente gebildet [6].

Diese Phase ist richtungsweisend für den weiteren Verlauf der Heilung. Entweder es entsteht eine Narbe (Narbenheilung), oder es bildet sich wieder funktionsfähiges Muskelgewebe (Restitutio ad integrum). Entscheidend hierfür sind die muskulären Stammzellen, die sogenannten Satellitenzellen. Je nach umgebendem Milieu können sie sich entweder in Myoblasten oder in Myofibroblasten differenzieren und somit die Gewebeentwicklung entweder Richtung Muskel- oder Narbengewebe beeinflussen [20]. Wachstumsfaktoren beeinflussen maßgeblich die Differenzierung. Der insulin-like growth factor (IGF) zum Beispiel begünstigt eine Muskelheilung, während der Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-beta1) wiederum die Entstehung von Narbengewebe begünstigt [4].



### **2.3.3.3 Remodellingphase / Fibrose**

Die Remodellingphase findet im Anschluss an die Reparaturphase statt und beginnt etwa ab dem 14. Tag nach Muskelläsion. Diese letzte Phase entscheidet über den Erfolg oder Misserfolg der funktionellen Ausheilung. Die in der Reparaturphase entstandene Gewebebrücke dient den entstandenen Myoblasten als Leitschiene für die Ausbildung des neuen Muskelgewebes.

Sind jedoch nicht genug Myoblasten vorhanden, sondern überwiegen die Myofibroblasten, wird die Fibrose dichter und es entsteht endgültiges Narbengewebe. Narbengewebe ist weniger elastisch und flexibel als Muskelgewebe und stellt in der funktionellen Einheit eines Muskels bei erneuter sportlicher Belastung eine prädisponierte Region für erneute Verletzungen (Re-Verletzungen) dar. So kann es bei Belastungen zu Re-Rupturen an der gleichen Stelle kommen. Können die gerissenen Enden der Muskelfibrillen nicht mehr funktionell zueinanderfinden, bleibt eine Neuinnervation aus. Die Re-Innervation spielt eine wichtige Rolle in der Remodellingphase. Bei fehlender Innervation atrophieren die bestehenden Fasern weiter und die ursprüngliche Muskelkraft kehrt nicht zurück.

Meist entsteht jedoch im Rahmen der Heilung keine reine End-zu-End-Muskelverbindung. Ein kleiner „Narbenrest“ verbleibt in der Regel immer. In der Therapie von Muskelverletzungen im Sport ist daher oberstes Ziel, diesen Narbenrest so klein wie möglich zu halten oder sogar ganz zu vermeiden [6].

## 2.4 Satellitenzellen

Satellitenzellen sind multipotente Muskelstammzellen. Im Gegensatz zu normalen Muskelzellen, die sich nach der Zellteilung nicht mehr replizieren können, sind diese in der Lage zur Proliferation und Differenzierung. Daher sind sie essentiell wichtig für Wachstum, Aufrechterhaltung und Heilung nach einer Verletzung der Muskulatur. Physiologisch ruhen Satellitenzellen in der G<sub>0</sub>-Phase. Innerhalb des Aufbaus der Muskulatur befinden sie sich unterhalb der Basallamina. Die Aktivität der Satellitenzellen wird von intensiven Reizen wie Muskelanstrengung, Verletzung oder von generellen Zellschäden ausgelöst. Eine aktivierte Satellitenzelle wird auch Myoblast genannt und befindet sich in der G<sub>1</sub>-Phase. Als Muskelstammzellen haben sie Potenzial, sich selbst zu erneuern, sich zu vermehren und durch Differenzierung gar neue Muskelfasern zu bilden sowie mit bestehenden Muskelfasern zu verschmelzen. Dies geschieht in Abhängigkeit der vorhandenen regulatorischen Transkriptionsfaktoren. Bei der Neubildung von Muskelfasern beginnt nach der Verletzung im Rahmen der Reparatur die Replikation von neuen Muskelzellen und ihre Verschmelzung zu Myotuben. Nach einer Re-Innervation folgt die Fasertypendifferenzierung, weiteres Wachstum und das Erlangen von Kontraktionseigenschaften. Somit kann ein Schaden repariert und die Faserfunktion wiedererlangt werden.

Nicht alle aktivierten Satellitenzellen differenzieren sich nach der Replikation zu Muskelzellen. Einige Satellitenzellen kehren an ihren ursprünglichen Ort in der Basallamina zurück und sorgen dafür, dass ein Muskelstammzellpool erhalten bleibt [21, 22].

Um ruhende und aktive Satellitenzellen in der PCR darstellen zu können, kann Pax 7, welches ein Schlüsselprotein einer funktionierenden Satellitenzelle ist, als Marker benutzt werden [23].

## 2.5 Pax 7

Das „paired box 7“ (Pax7) ist ein regulatorischer Transkriptionsfaktor, der von ruhenden Satellitenzellen exprimiert wird. Er spielt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Entwicklung und Heilung der Muskulatur [21]. Werden die Satellitenzellen aktiviert, wird Pax7 in Kombination mit anderen regulatorischen Transkriptionsfaktoren exprimiert [24]. Muskeln im Wachstum, bei denen das Pax7-Gen geblockt wurde, zeigen deutliche Defizite in Größe, Kerngehalt und Durchmesser der Muskelfasern [21]. Pax7 ist also essenziell wichtig für das Fortbestehen und Funktionieren von Satellitenzellen. Hierfür sind zwei wichtige Gründe anzuführen.

Zum einen ist Pax7 ein Schlüsselfaktor bei der Expression von Myf5. Myf5 gehört zur Familie der myogenen Regulationsfaktoren. Wird Pax7 nun inhibiert, kann kaum mehr Myf5 gebildet werden. Da Myf5 wie MyoD ein primärer myogener Regulationsfaktor ist, beeinflusst er die Transformation einer ruhenden Satellitenzelle zu einem Myoblasten. Die Anwesenheit von Myf5 fördert also aktiv die Neubildung von Muskulatur [25]. Ohne Pax7 kann nicht genug Myf5 gebildet werden. Somit wird das Muskelwachstum inhibiert [21, 26].

Bei einem Versuch mit Mäusen mit inhibierter Pax7-Expression zeigte sich eine mangelhafte Proliferation von Satellitenzellen. Außerdem differenzierten diese sich unter Pax7-Mangel früher. Insgesamt war bei diesen Tieren der Pool an Muskelstammzellen erschöpft [21].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Pax7 dafür sorgt, dass ruhende Satellitenzellen überleben und in ausreichender Zahl vorhanden sind. Pax7 ist ein essenzieller Kofaktor in der Expression von myogenen Regulationsfaktoren, die das Muskelwachstum fördern. Pax7 ist ein zentraler Faktor von vitalem und sich regenerierendem Muskelgewebe.

## **2.6 CD56**

Das CD56 (Cluster of Differentiation 56), auch Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM) genannt, ist ein Oberflächenantigen, welches typischerweise auf Satellitenzellen und Myoblasten exprimiert wird [27].

Es wird zwar prinzipiell auch auf anderen Zellen wie neuronalen Zellen und Lymphozyten exprimiert, allerdings keinesfalls auf Fibroblasten. CD56 unterscheidet zwischen proliferierender (CD56+) und reifer (CD56-) Muskulatur [28]. Ist also CD56 nachweisbar, kann man annehmen, dass sich aktive Myoblasten im Gewebe befinden und eine Neubildung von Muskelgewebe stattfindet. Ist CD56 nur in geringem Maß nachweisbar, lässt sich der Schluss ziehen, dass es sich um Narbengewebe oder reife Muskulatur handelt.

CD56 ist darüber hinaus als Marker geeignet, um zwischen einer Muskelregeneration und einer Narbenbildung zu unterscheiden. Lässt sich CD56 nachweisen, ist eine Heilung mit Ausbildung funktionsfähiger Muskulatur wahrscheinlich.

## **2.7 Medikamentöse Therapie**

Es gibt zahlreiche Therapieansätze bei Muskelverletzungen. Ziel ist immer die Krankheitsphase zu verkürzen und die Heilung Richtung funktionalem Muskelgewebe mit möglichst geringer Narbenbildung zu beeinflussen. Zu den Standardtherapien der vergangenen Jahrzehnte zählten Eistherapie, nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAR) und Physiotherapie. Diese Therapieansätze können zwar die Heilung aufgrund der klinischen Erfahrung positiv unterstützen, jedoch nicht in dem Maße, wie es im Leistungssport nötig wäre [4]. In neuen Studien wurde sogar eine negative Auswirkung von NSAIDs auf die Muskelheilung nach Läsion beschrieben. Sie können eine Hemmung der Migration von neuen Muskelzellen, welche für die Regeneration essenziell ist, bewirken [29].

Zu den gängigen medikamentösen Therapieansätzen, die die Muskelheilung günstig beeinflussen können, zählen Platelet-rich plasma (PRP), Actovegin und Traumeel S. Das plättchenreiche Plasma soll die natürliche Muskelheilung beschleunigen, indem hochkonzentriert Thrombozyten an den Ort der Läsion injiziert werden um vor Ort heilungsfördernde Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Dieses Therapeutikum wird in der heutigen Literatur kontrovers diskutiert [6, 30]. Trotz gut angelegter, randomisiert-prospektiver Studien, die die positive Wirksamkeit von PRP belegen konnten, gibt es genauso viele Studien, die das Gegenteil gezeigt haben. Darüber hinaus wurden die Nebenwirkungen von PRP noch nicht ausreichend erforscht. Daher kann keine

allgemeine Empfehlung ausgesprochen werden und auch das Internationale Olympische Komitee (IOC) rät zur Vorsicht beim Einsatz von PRP in der Sportmedizin, bis grundlegende, vertrauenswürdige Studien verfügbar sind [31].

Alternative Medikamente zur Behandlung von Muskelverletzungen sind die Agenzien Actovegin und Traumeel S. Diese Präparate erfreuen sich seit den medienwirksamen klinischen Erfolgen von Müller-Wohlfahrt zunehmender Beliebtheit. So werden Actovegin- und Traumeel-Injektionen zur intramuskulären Behandlung von Muskelverletzungen angewendet. Zwar gibt es Fallstudien mit erfolgreicher Anwendung und Verkürzung der Ausfallzeit, allerdings fehlen bis dato Studien, die die Wirksamkeit dieser beiden beliebten Substanzen evidenzbasiert belegen.

### 2.7.1 Actovegin

Bei Actovegin handelt es sich um ein Kälberblut-Hämodialysat. Als ultrafiltriertes Hämodialysat (6000 Dalton) enthält Actovegin keine Proteine, Wachstumsfaktoren oder Hormone, sondern lediglich Elektrolyte, Spurenelemente, Aminosäuren, Nukleoside und Stoffwechselprodukte des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels. Actovegin wird im klinischen Alltag seit mehr als 60 Jahren angewendet, unter anderem als intravenöse Infusion bei akutem Schlaganfall oder topisch bei Haut- und Mundulzera [32, 33].

Actovegin enthält Inositol-Phospho-Oligosaccharide (IPO), welche einen teilweise insulin-ähnlichen Effekt auf den Glukosetransport in Adipozyten haben [34].

Mit einer intramuskulären Injektion soll durch Begrenzung der Nekrose in der Muskelzelle eine Verbesserung des Zellstoffwechsels und somit eine schnellere Ausheilung ohne Narbenbildung erreicht werden. In Versuchen, die den Einfluss von Hypoxie auf Leberzellen von Ratten untersuchten, zeigte Actovegin einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben. Zellen, deren Nährmedium Actovegin zugesetzt war, überlebten bei 4-stündiger anaerober Inkubation zu 50 Prozent. In der Kontrollkultur ohne Actovegin lag der Anteil der überlebenden Zellen nur bei 20 Prozent [35].

Actovegin wurde als sicher und nebenwirkungsarm in einer großen, multizentrischen, randomisierten und kontrollierten Studie getestet [33]. Gerade in der Sportmedizin erfreut sich dieses Medikament immer größerer Beliebtheit und ist ein großer Hoffnungsträger unter den Athleten in der Behandlung von Muskelverletzungen. Unter anderem wurden in einer Pilotstudie Fußballspieler nach einer Muskelverletzung zusätzlich mit Actovegin statt nur mit Physiotherapie behandelt. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe waren die mit Actovegin behandelten Spieler im Durchschnitt 8 Tage früher wieder einsatzfähig als die Kontrollgruppe [36].

### 2.7.2 Traumeel S

Traumeel S ist ein Kombinationspräparat aus 14 verschiedenen homöopathischen Inhaltsstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen. Es wurde vom deutschen Arzt Dr. Hans-Heinrich Reckeweg entwickelt und ist in Deutschland seit über 60 Jahren ein in Apotheken frei verkäufliches Präparat. Man kann es als Tabletten, als Gel, als Tropfen, als Salbe oder als Injektionslösung anwenden.

Traumeel S setzt sich aus folgenden Wirkstoffen zusammen: Atropa belladonna (Schmerz), Aconitum napellus, Hepar sulfuris (Infektionen), Mercurius solubilis Hahnemanni (Schwellung), Chamomilla recutita (Wundheilung), Symphytum, Achillea millefolium (Blutungen), Arnica montana (Hämatome), Calendula officinalis (Wundheilung), Hamamelis virginiana, Bellis perennis, Echinacea angustifolia, Echinacea purpurea, Hypericum perforatum. Die einzelnen Wirkstoffe sind in der Phytotherapie und Homöopathie seit langer Zeit bekannt und werden dort häufig eingesetzt. Einige von ihnen sollen anti-inflammatorisch wirken, andere hingegen pro-inflammatorisch. Einige sollen die Wundheilung verbessern, Schmerz lindern oder aber die Ödembildung modifizieren. Insgesamt soll eine synergistische Wirkung aller einzelnen Komponenten für die letztendliche Wirkung verantwortlich sein.

Traumeel S wird nicht nur in Deutschland immer bekannter und beliebter, wenn es um die Behandlung von akuten muskuloskelettalen Verletzungen, Schmerzen oder Schwellungen geht. Aktuell ist es in mehr als 50 Ländern weltweit erhältlich. Viele Menschen können oder wollen aufgrund der Nebenwirkungen und der Verträglichkeit keine nicht-steroidalen Antiphlogistika einnehmen und betrachten Traumeel S als Alternative, insbesondere da das homöopathische Traumeel sehr gut verträglich ist und keine Nebenwirkungen wie gastrointestinale Blutungen bekannt sind [37].

## **2.8 Therapie von Muskelverletzungen nach Dr. Hans-Wilhelm Müller-Wohlfahrt**

Die Therapie von Muskelverletzungen nach Müller-Wohlfahrt folgt einem festgelegten zeitlichen Algorithmus. In der Akutphase sollte die verletzte Muskelregion mit Druck und Kälte, im Idealfall mit einem Eiswasserdruckverband, großflächig behandelt werden. Um eine weitere Einblutung und Ödembildung zu minimieren, sollten ergänzend eine Entlastung und Hochlagerung über Herzhöhe erfolgen. Diese Akutbehandlung erfolgt nach dem PECH-Schema und wird in dieser Form allgemein praktiziert.

Bei strukturellen Muskelverletzungen (> Typ II) erfolgt nach Diagnosestellung und Bildgebung in der Regel bereits am Unfalltag die erste Infiltrationstherapie mit Traumeel S und Actovegin, welche im Folgenden noch genauer beschrieben wird. Im Anschluss wird ein Entlastungsverband angelegt und der Sportler wird zu Ruhe, Hochlagerung und Alkoholkarenz angehalten. Die darauffolgende Therapie ist sehr physiotherapieintensiv, und ab dem 5. Tag kann eine etappenweise Belastungssteigerung erfolgen. Zur ergänzenden Therapie greift Müller-Wohlfahrt auf orale Medikamente zurück. Neben der bereits genannten Infiltrationstherapie mit Actovegin und Traumeel S beinhaltet diese oral gegebene Enzyme wie Phlogenzym®, antioxidative Enzyme A, C und E sowie die Substitution von Zink und Magnesium [2].

Die Infiltrationstherapie nach Müller-Wohlfahrt umfasst drei Behandlungen mit Traumeel S und der physiologischen Aminosäurelösung Actovegin. Die einzelnen Behandlungen finden direkt nach der Verletzung (Tag 0) sowie an den Tagen 2 und 4 statt. Nach lokaler Anästhesie der Muskulatur proximal und distal der Läsion mit Mepivacain zur Detonisierung werden Traumeel S und Actovegin im Verhältnis 2:1 an drei Stellen (proximal und distal der Verletzung sowie in ihr Zentrum) gespritzt.

Diese Therapie soll den Heilungsprozess begünstigen und potentiell schädliche Mängel im Muskelstoffwechsel ausgleichen. Insgesamt soll sie neben einer Faserheilung außerdem zu einer Detonisierung und zu einer Verbesserung des Energiestoffwechsels führen [2].

### 3 Material und Methoden

In einem in-vivo-Tiermodell an der Ratte soll der Einfluss von Actovegin und Traumeel auf die Heilung nach einem simulierten Muskelbündelriss (Typ 3B nach Müller-Wohlfahrt) dargestellt werden. Die Muskelbündelverletzung des M. rectus femoris des Musculus quadriceps femoris wurde bei allen Tieren nach einem standardisierten Vorgehen im Rahmen einer kurzen Operation in Narkose erzeugt.

#### 3.1 Tiere und Materialien

##### 3.1.1 Tiere und Tierhaltung

Sprague Dawley Ratten	Janvier Labs, CS 4105 Le Genest-Saint-Isle, F-53941 Saint-Berthevin Cedex
Makrolon Typ IV-Käfige	Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland

**Tabelle 3: Tiere und Tierhaltung**

##### 3.1.2 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Primer

###### Reagenzien:

0,5% Eosin G, wässrig	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
5x Puffer (DS98200)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aqua dest. Spüllösung	Braun, Melsungen, Deutschland
dNTPs (201900)	Qiagen, Hilden, Deutschland
DTT (P2325)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eisessig	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolute	Lonza, Basel, Schweiz
Gill-3-Hämamytoxylin	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland
Isopropylalkohol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland



Kohlenstoffdioxid flüssig	The Linde Group, München, Deutschland
Quantitect® Primer Assay (Random Primers) (3116663)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Primers	Promega®, Madison, USA
Reverse Transkriptase (SuperScript® III Reverse Transcriptase)	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™ Life Technologies), Waltham, Massachusetts, USA
Richard-Allan Scientific™ Cytoseal™	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNAlaterRNA Stabilization Reagent (76104)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies Wasser (204141)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti®-Histofix 4 % (säurefreie (pH 7), phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Plast Paraffin Pastillen, Gewebereinbettungsmedium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green (204141)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Xylol	Applichem, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 4: Verwendete Reagenzien**

### Verbrauchsmaterialien und Kits:

10er-Skalpell (Feather®, 200130010)	Pfm Medical, Köln, Deutschland
11er-Skalpell (Feather®, 200130011)	Pfm Medical, Köln, Deutschland
4-0 Monocryl-Faden	Ethicon, Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA
4-0 Prolene-Faden	Ethicon, Johnson&Johnson, New Brunswick, New Jersey, USA
96-Loch-Platte	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Injekt®-F Solo, 1 ml, ohne Kanüle, 2-teilig (9166017V)	Braun, Melsungen, Deutschland
Mulltupfer, steril, Größe 2 (35019)	Maimed, Neuenkirchen, Deutschland
Objektträger, Menzel-Gläser, Superfrost Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR Strips (338176)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Strips (AM12230)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
QIAshredders homogenizer (79654)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RNase-free DNase-Set (79254)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (74104)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sterican® Gr. 18, G 26 x 1" / ø 0,45 x 25 mm, braun (4657683)	Braun, Melsungen, Deutschland
Steriles Abdecktuch	OPS™ Essential, Medline, Warrington, United Kingdom
Tissue-Tek® Mega-Cassette®	Sakura Fintec Europe B.V, Alphen aan den Rijn, Niederlande
15 ml Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien und Kits**

**PCR-Primer:**

<b>Myosin</b>	
Rn_Myh1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00384307) (NM_001135158, XM_001077982, XM_001078018, XM_213345)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_MYO1H_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT01678383) (NM_001101421, NM_173597, XM_001125815, XM_001132344)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Pax7</b>	
Rn_Pax7_1_SG QuantiTect Primer Assay QT01301552 (NM_001191984, XM_001071787, XM_575941)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_PAX7_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00018942 (NM_001135254, NM_002584)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>CD56</b>	
Rn_Ncam1_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00181944 (NM_031521)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_NCAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00071211 (NM_000615, NM_001076682, NM_001242608)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>18S Ratte</b>	
Rn_Rnr1_1_SG QuantiTect Primer Assay QT00199374 (M11188)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 6: PCR-Primer

### 3.1.3 Medikamente

0,9%-ige NaCl-Lösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Atipamezol (Alzane® 5mg/ml)	Zoetis, Berlin, Deutschland GmbH
Corneregel®	Bausch+Lomb, Berlin, Deutschland
Fentanyl (0,1mg/2ml)	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
Flumazenil (Anexate® 0,5mg/5ml)	Roche, Basel, Schweiz
Isofluran (Forane®)	Abbott Laboratories, North Chicago, IL 60064, USA
Medetomidinhydrochlorid (Dorbene vet® 1mg/ml)	Laboratorios SYVA S.A., Leon, Spanien
Midazolam (15mg/3ml)	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
Tramadol-Tropfen (100mg/ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

**Tabelle 7: Medikamente**

### 3.1.4 Geräte

Autotechnicon (Einbettautomat)	Siemens Healthcare Diagnostic Inc.
AxioVision LE, Mikroskopsoftware	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EVOS® Mikroskop	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isofluran-Vapor	Dräger, Lübeck, Deutschland
Leica MZ A Mikroskop und Leica DC 180 Kamera	Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland
Microliter-Pipette	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA und Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microtom 2030	Reichert-Jung (Leica), Wetzlar, Deutschland
Multistep-Pipette	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Gerät mit Real-Time PCR 7300 System	ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, Massachusetts, USA
Stickstofftank Nitrogen Container Arpege 110	Air Liquide, Paris, Frankreich
Thermocycler	
TISSUE-TEK® Dispensing Console	Miles Scientific, Newark, USA
Zentrifuge Centrifuge 5804R und Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 8: Geräte**

### 3.2 Tierversuchsantrag

Eine Genehmigung der Tierversuche wurde eingeholt. Sie wurde über den Tierschutzbeauftragten der Einrichtung beim Landesuntersuchungsamt in Koblenz beantragt und unter der Nummer G 12-1-088 bewilligt.

### 3.3 Tiermodell

Im Tierversuch beträgt die Gesamtanzahl 150 Ratten. Diese 150 Tiere wurden in 5 Gruppen zu je 30 Ratten aufgeteilt. Somit konnten pro Gruppe und Tag 10 Tiere untersucht werden.

	Behandlung mit:	Anzahl der Tiere	
<b>Gruppe 1</b>	NaCl	30	Tag 1: 10 Tiere Tag 3: 10 Tiere Tag 7: 10 Tiere
<b>Gruppe 2</b>	Actovegin	30	Tag 1: 10 Tiere Tag 3: 10 Tiere Tag 7: 10 Tiere
<b>Gruppe 3</b>	Traumeel	30	Tag 1: 10 Tiere Tag 3: 10 Tiere Tag 7: 10 Tiere
<b>Gruppe 4</b>	Actovegin und Traumeel	30	Tag 1: 10 Tiere Tag 3: 10 Tiere Tag 7: 10 Tiere
<b>Gruppe 5</b>	Keine Injektionen, <b>Kontrollgruppe</b>	30	Tag 1: 10 Tiere Tag 3: 10 Tiere Tag 7: 10 Tiere

**Tabelle 9: Gruppeneinteilung der Versuchstiere**

Die Tiere der Gruppe 5 erhielten keine intramuskuläre Injektion (Kontrollgruppe) und entsprechen somit der physiologischen Muskelheilung. Bei ihnen wurde lediglich eine Läsion gesetzt, aber keine anschließende Injektionstherapie durchgeführt, um eine Vergleichsbasis für die histologischen Analysen zu schaffen.

Insgesamt erstreckte sich die in-vivo-Versuchsreihe für jedes Tier über einen Zeitraum von acht Tagen (Tag 0 - 7).

Alle Tiere bekamen an Tag 0 die gleiche standardisierte OP, welche im Folgenden erläutert wird.

### 3.3.1 Zeitlicher Ablauf der Versuche

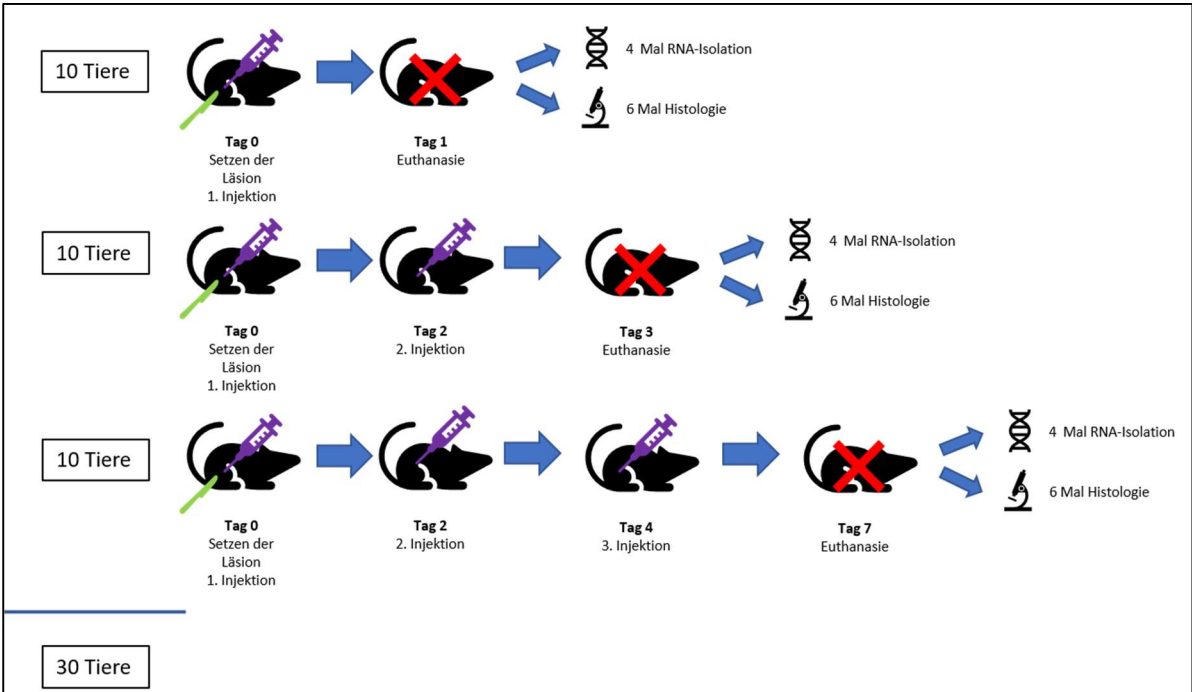
An Tag 0 erfolgte der chirurgische Eingriff. Hier wurde bei allen Tieren der 5 Gruppen über eine Hautinzision der Muskel dargestellt und mit einem spitzen 11-er Skalpell eine strukturelle Querläsion in den M. rectus femoris des M. quadriceps femoris gesetzt. Alle Behandlungsgruppen außer der Kontrollgruppe erhielten im Rahmen der Operation an Tag 0 unter Sicht eine intramuskuläre Injektion mit dem jeweiligen Präparat. Die genaue Operationstechnik wird im nachfolgenden Absatz (3.3.5) in Detail dargestellt.

An Tag 1 wurden pro Versuchsgruppe je 10 Tiere getötet und die Muskelproben aus dem Läsionsbereich entnommen. Diese 10 Proben wurden aufgeteilt. Aus 6 Proben wurden histologische Schnitte angefertigt. Dies wird im Kapitel 3.5 genauer erläutert. Aus den übrigen 4 Proben wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in einer RT-PCR hinsichtlich der Expression der Zielgene (Pax 7, CD56, Myosin, 18S) untersucht. Die genaue Technik kann unter 3.4 nachvollzogen werden. Es verblieben 20 Ratten.

Diese 20 Tiere bekamen die zweite Injektion an Tag 2.

An Tag 3 der Versuchsreihe wurden weitere 10 Tiere pro Gruppe getötet. Wieder wurde aus dem behandelten Bein der Musculus quadriceps femoris entnommen, um eine histologische Untersuchung oder eine Polymerasekettenreaktion durchzuführen. Nach der erneuten Euthanasie verblieben noch 10 Tiere.

Diese 10 Tiere erhielten an Tag 4 ihre dritte intramuskuläre Injektion. An Tag 7 wurden die verbliebenen 10 Ratten pro Gruppe getötet und der behandelte Muskel für weitere Untersuchungen entnommen.



**Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf im Tiermodell einer stellvertretenden Versuchsgruppe**

Um den Arbeitsablauf zu optimieren, wurden die Gruppen in zwei Durchgängen à 15 Tieren operiert. Daher verblieben für die Untergruppen, die an Tag 1,3 und 7 getötet wurden jeweils 5 Ratten. Der exakte Zeitplan der Versuche befindet sich im Anhang unter Kapitel 8.



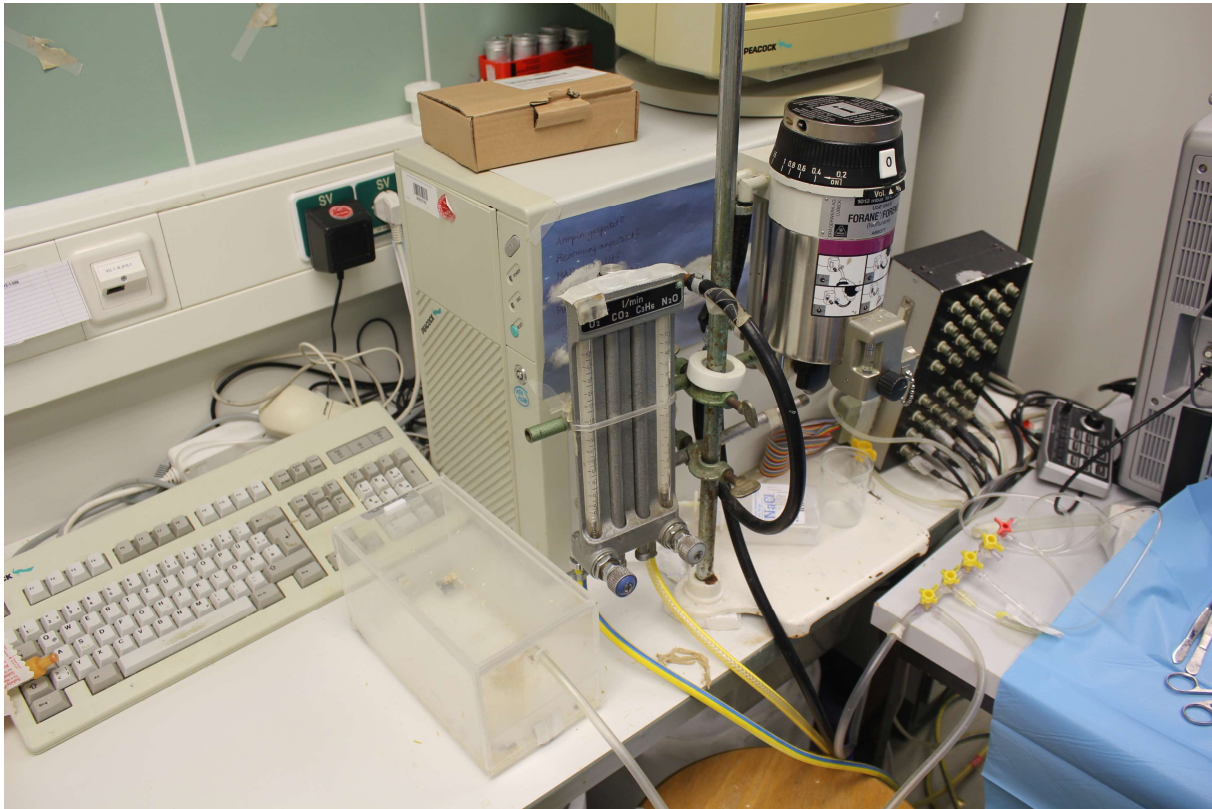
### **3.3.2 Tierhaltung**

Es wurden 150 männliche Sprague Dawley Ratten der Firma Janvier Labs (CS 4105 Le Genest-Saint-Isle, F-53941 Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) operiert. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 347 +/- 20 Gramm. Bei Beginn der Experimente waren die Tiere 10 Wochen alt. Die Haltung der Tiere erfolgte in unserem Labor mit Biosicherheitsstufe 1 in einem abgeschlossenen Raum mit einem 12-stündigen hell/dunkel-Rhythmus. Die Haltung erfolgte in Einzelhaltung in Makrolon Typ IV-Käfigen mit einer Größe von 1815 cm<sup>2</sup> und einer Höhe von 20 cm. Der Zugang zu Futter und Wasser sowie die Aktivität im Käfig wurden nicht eingeschränkt.

### 3.3.3 Anästhesie

Drei Tage präoperativ wurde das Trinkwasser der Tiere mit Tramadol (1mg/ml) versetzt. Dies geschah im Voraus, damit die Tiere am OP-Tag an den Geschmack gewöhnt waren.

Zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten einzeln in eine Box gesetzt, zu der eine Zu- und Ableitung von Luft, Sauerstoff und Isofluran (Abbott) bestand.



**Abbildung 5: Einleitungsbox für Anästhesie**

Sobald optisch eine deutliche Verlangsamung der Atmung und eine Sedierung erkennbar war, wurde das Tier aus der Box genommen und erhielt die Medikamenteninjektionen für die Narkose (siehe Tabelle 10). Die Injektion erfolgte in die Rückenfalte in Verlängerung von rechtem und linkem Ohr, hierzu wurde mit zwei Fingern eine Falte erzeugt. In diese Falte wurden die Medikamente im Folgenden subkutan injiziert. Bis zum vollständigen Wirkungseintritt der Medikamente wurde die Ratte, um Stress und Verletzungen zu vermeiden, erneut zurück in die Einleitungsbox gesetzt. Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte mittels Prüfung des Rückziehreflexes des Beines durch Kneifen in den Zehenzwischenraum.

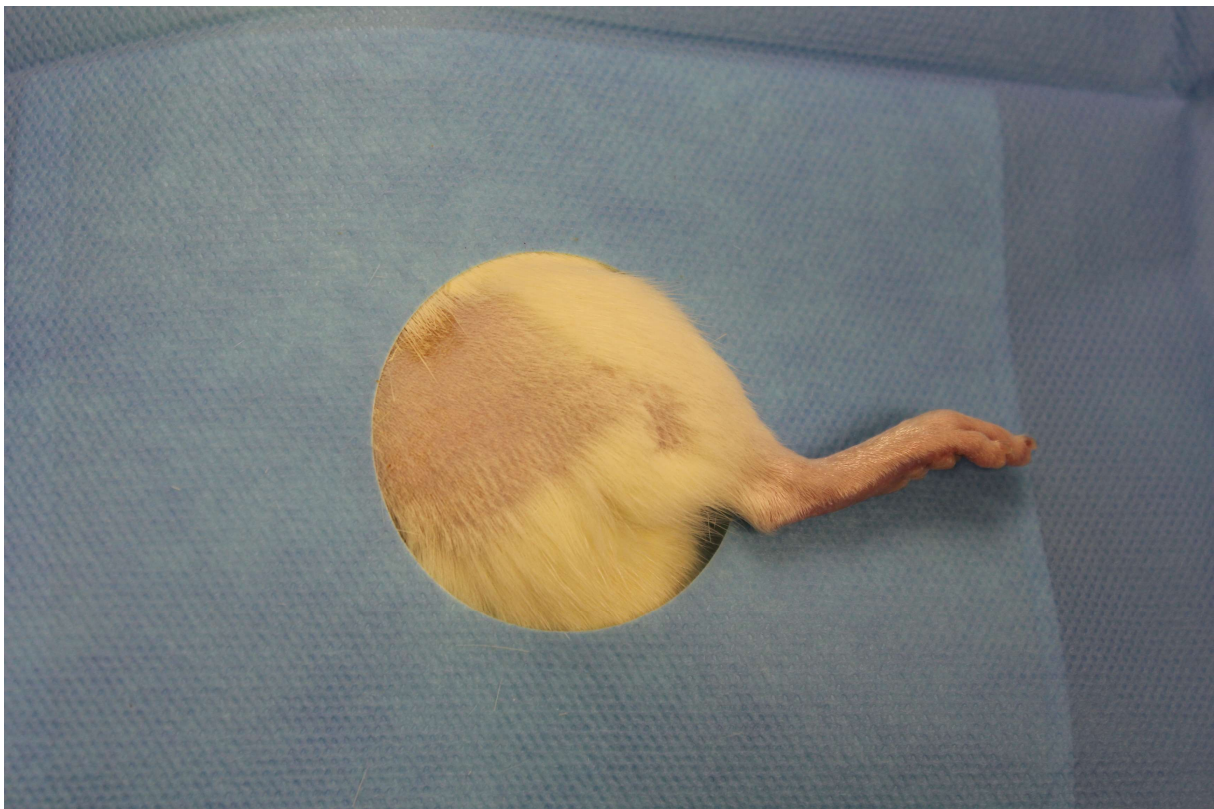
<b>Narkoseeinleitung</b>	
<b>Medikament</b>	<b>Dosis</b>
Fentanyl	0,005 mg/kg
Midazolam	4 mg/kg
Medetomidin	0,375 mg/kg
<b>Narkoseausleitung</b>	
<b>Medikament</b>	<b>Dosis</b>
Flumazenil	0,2 mg/kg
Atipamezol	1 mg/kg

**Tabelle 10: Medikamentendosierung Anästhesie**

### 3.3.4 Operationsvorbereitung

Im Rahmen der Vorbereitung wurde ein steriles OP-Feld geschaffen. Eine Wärmematte wurde auf dem OP-Tisch positioniert. Diese und die Oberflächen des OP-Tischs wurden steril abgedeckt. Das Instrumentarium, bestehend aus Monocryl-Fäden (Ethicon) und Prolene-Fäden (Ethicon), Tupfern, Nadelhalter, Schere, einem 10er-Skalpell sowie einem Skalpell der Größe 11, wurde bereitgelegt. Das 11-er Skalpell wurde im Vorfeld bei einer Klingenbreite von 3 mm markiert.

Nach vollständiger Sedierung der Ratte wurde der rechte Oberschenkel der Ratte auf einem separaten Tisch rasiert, um eine Kontamination des OP-Gebiets zu vermeiden. Außerdem wurden die Augen mit Augengel vor Austrocknen geschützt. Nach der Rasur wurde das Tier in Linksseitenlage auf der Wärmematte platziert und der rechte Oberschenkel mit einem Lochtuch abgedeckt. Im Operationsgebiet wurde eine Hautdesinfektion vorgenommen.



**Abbildung 6: OP-Gebiet am Oberschenkel des rechten Hinterbeines**

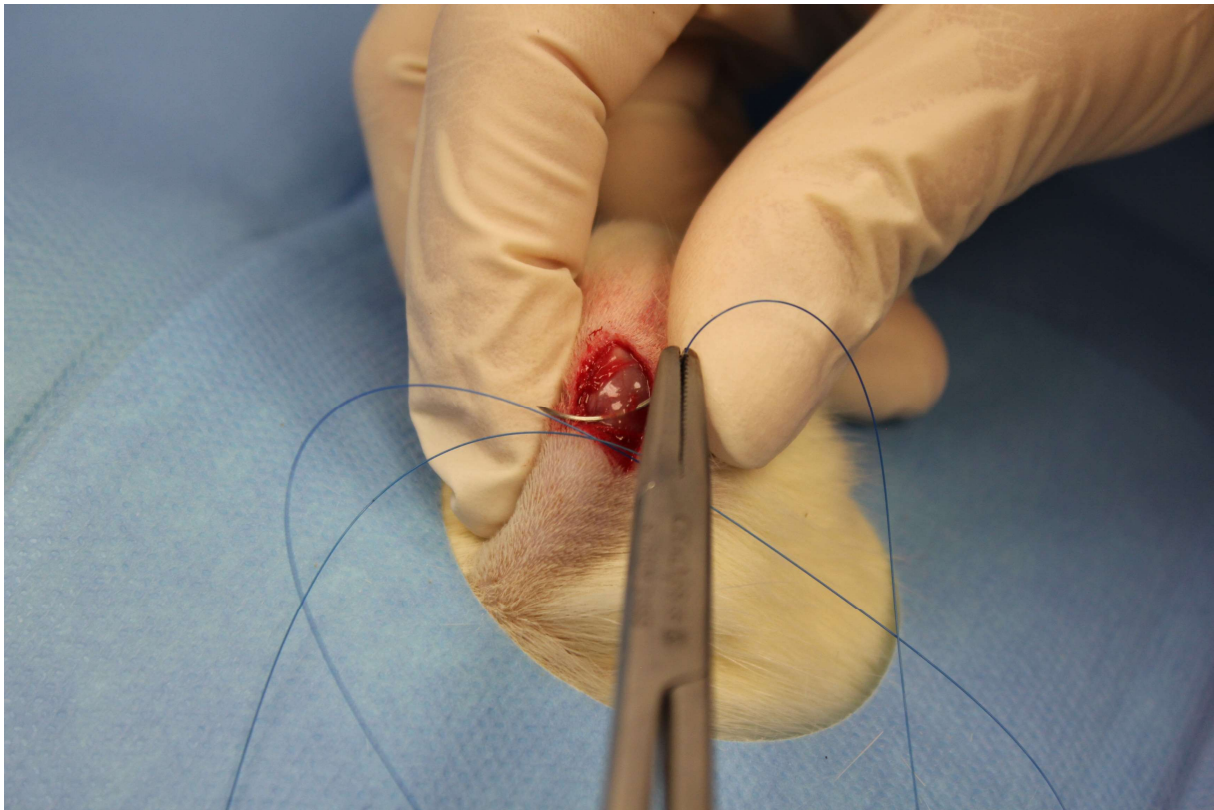
### 3.3.5 Operationstechnik

Der Hautschnitt erfolgte am rechten Oberschenkel, lateral des M. quadriceps femoris an einer gedachten Linie zwischen lateralem Femurkondylus und Trochanter major. Der Hautschnitt war circa 1,5 cm lang und wurde mittels 10-er Skalpell durchgeführt.



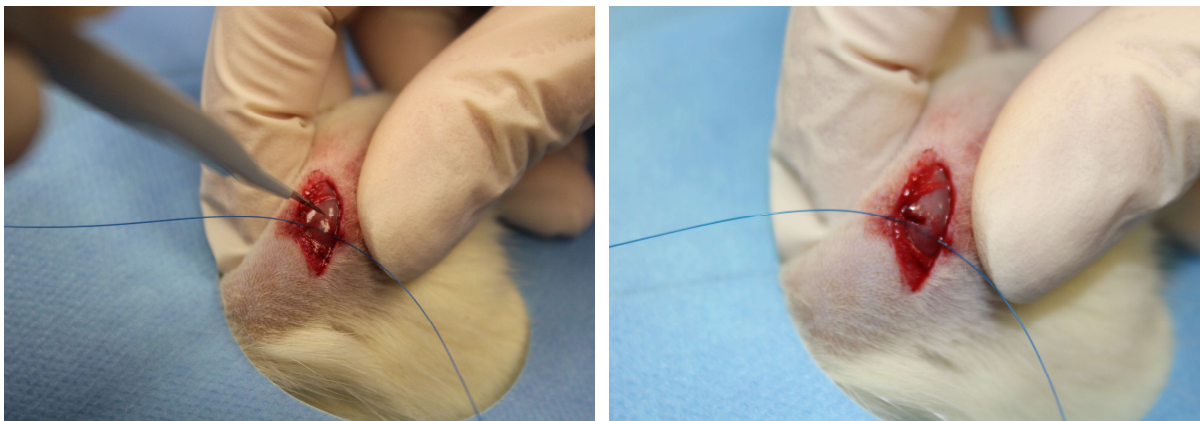
**Abbildung 7: Operativer Zugangsweg am Oberschenkel des rechten Hinterbeines**

Danach wurde das Bein in Flexion und Außenrotation gebracht und dort manuell fixiert, um den Muskelbauch des M. rectus femoris des M. quadriceps femoris darzustellen. In diesem Versuchsaufbau wurde aufgrund der guten Erreichbarkeit und der Möglichkeit der Standardisierung im Musculus rectus femoris des Musculus quadriceps femoris ein querverlaufender Muskelbündelriss simuliert. Durch die gewählte Position kommt es zu einer Verschiebung von Haut und darunterliegender Muskulatur. In physiologischer Position liegen Schnitt und Läsion nicht übereinander, da sich die Schichten dachziegelartig übereinanderlegen. Proximal der geplanten Läsionsstelle wurde daher eine Einzelknopfnah aus nicht resorbierbarem Material (4-0 Prolene, Ethicon) gesetzt, um nach Beenden des Eingriffs den Knoten für weitere Injektionen perkutan tasten zu können.



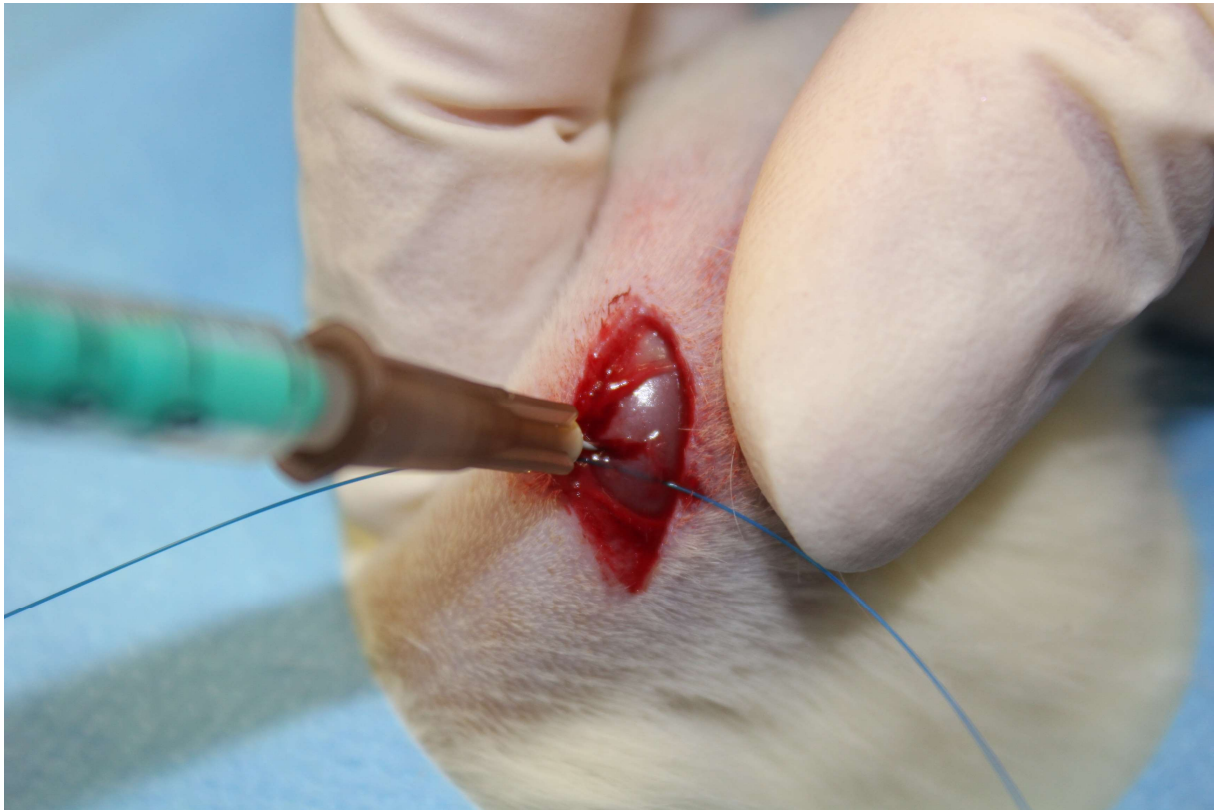
**Abbildung 8: Fadenmarkierung M. rectus femoris proximal der Läsionsstelle**

Die Läsion erfolgte standardisiert mit einem markierten 11-er Skalpell, so dass eine Schnittbreite von 3mm und eine Schnitttiefe von ebenfalls 3 mm erzeugt wurde. Hierzu wurde das Skalpell vertikal einen Zentimeter proximal der Patella mittig in den Muskelbauch des M. rectus femoris eingebracht und wieder herausgezogen. Durch endgradige Flexion bei gleichzeitiger Extension im Hüftgelenk wurde der Muskel vorgespannt. Die Läsion wurde bewusst nicht mittig, sondern eher im Übergang mittleres zum distalen Drittel zur Patella hin, gesetzt, da klinisch diese Art von Verletzungen gehäuft am muskulotendinösen Übergang auftreten.



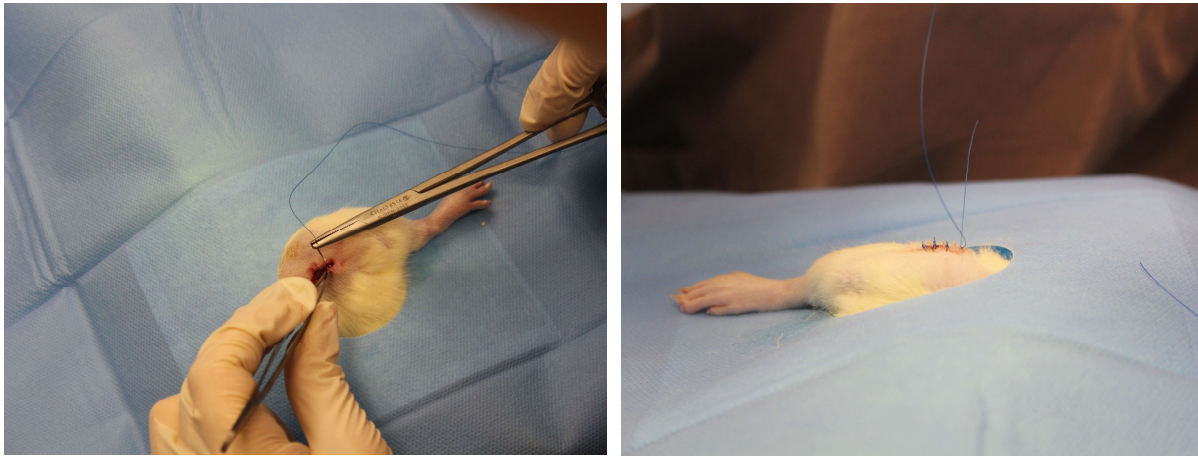
**Abbildung 9: Setzen der Muskelläsion mit einem 11-er Skalpell**

Im Anschluss wurde - wie in Tabelle 11 dargestellt - der jeweilige Wirkstoff intramuskulär bzw. intraläsional appliziert.



**Abbildung 10: Intraoperative Injektion der jeweiligen Präparate in die Läsionsstelle.**

Die anschließende Hautnaht erfolgte mit Einzelknopfnähten (4-0 Monocryl, Ethicon) mit der Dichte von drei Knoten auf 1 cm.



**Abbildung 11: Hautnaht**

Die Gesamtdauer der Operation betrug im Durchschnitt 20 Minuten. Zur OP-Ausleitung wurden Antidota gespritzt (siehe Tabelle 9). Hierzu wurde erneut in Verlängerung des rechten Ohres in eine Falte am Rücken der Ratte subkutan gespritzt.

Nach Abschluss der operativen Maßnahmen wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gesetzt und bis zum vollständigen Abklingen der Sedierung beobachtet. Das mit Tramadol versetzte Trinkwasser wurde den Tieren postoperativ für 7 Tage zur Verfügung gestellt.



### 3.3.6 Therapeutische Injektionen

Für weitere Injektionen wurden die Tiere erneut in die Narkosebox gesetzt und wie bei der Operation mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch kurzzeitig betäubt. Auch hier wurde die Verlangsamung der Atmung als suffizientes Zeichen der Sedierung betrachtet. Bei ausreichender Sedierung wurden die Tiere auf die steril abgedeckte Wärmematte gelegt und das rechte Bein erneut in eine Außenrotation und Flexion gebracht. Bei manueller Fixation wurde der Knoten unter der Haut getastet. Anschließend erfolgte die intramuskuläre Injektion knapp distal des gut tastbaren Knotens. Bei Erwachsenen wird in der Injektionstherapie nach Müller-Wohlfahrt ein Verhältnis von 2:1 (Actovegin:Traumeel) gewählt. Eine Ampulle Actovegin (200mg/5ml) wird zusammen mit einer Ampulle Traumeel (2,2 ml) aufgezogen. Aus diesen 7,2 ml Gemisch werden 2 ml für die Injektion beim erwachsenen Menschen von 80kg verwendet. Dies entspricht heruntergerechnet auf ein durchschnittliches Rattengewicht von 350 Gramm 8,75 µl Injektionsvolumen des Gemisches.

Für Monoinjektionen von Actovegin oder Traumeel wurden die jeweiligen Ampullen mit physiologischer NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) auf das Zielvolumen von 7,2 ml aufgezogen. Daraus wurden ebenfalls 8,75 µl entnommen.

Die 8,75 µl Therapeutikum wurden bis auf ein Volumen von 0,1 ml zur besseren Applizierbarkeit mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt. In der Gruppe, die nur NaCl-Lösung erhielt, wurde ebenfalls ein Volumen von 0,1 ml appliziert. Gruppe 5 erhielt keine Injektionen.

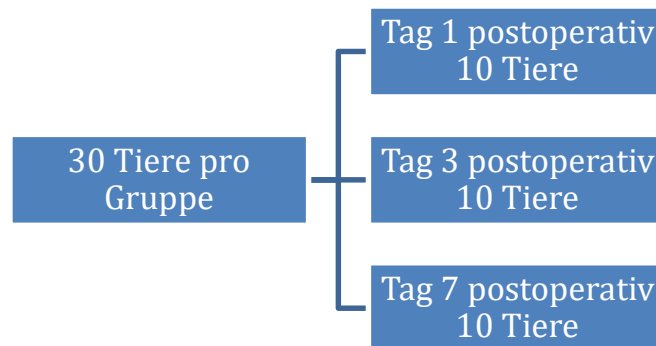
Nach erfolgter Injektion wurden die Tiere wieder in ihre Käfige gesetzt. Eine Beobachtung erfolgte im Anschluss, bis keine Anzeichen für eine Sedierung mehr erkennbar waren.

	Medikament	Zielvolumen
Gruppe 1	0,9%ige NaCl-Lösung	0,1 ml NaCl
Gruppe 2	5 ml Actovegin + 2,2 ml 0,9%ige NaCl-Lösung	8,75 µl Medikament + 91,25 µl NaCl
Gruppe 3	2,2 ml Traumeel + 5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung	8,75 µl Medikament + 91,25 µl NaCl
Gruppe 4	5 ml Actovegin + 2,2 ml Traumeel	8,75 µl Medikament + 91,25 µl NaCl
Gruppe 5	Keine Injektionen	

**Tabelle 11: Injektionsvolumina**

### 3.3.7 Euthanasie der Tiere

Die Euthanasie der Tiere erfolgte mittels Kohlenstoffdioxidgas-Inhalation. Dazu wurden die Tiere in eine Box gesetzt und solange dem CO<sub>2</sub> ausgesetzt, bis das Herz palpatorisch aufhörte zu schlagen und keine Bewegungen, zum Beispiel durch das Setzen eines Schmerzreizes an der Schwanzspitze, mehr provoziert werden konnten. Die Euthanasie der Tiere erfolgte, entsprechend ihrer Gruppe, an Tag 1, 3 oder 7 postoperativ. In jeder untersuchten Gruppe (1-5) wurden pro Untergruppe (Tag 1,3, oder 7) je 10 Tiere getötet.



**Diagramm 1: Euthanasie der Tiere, Gruppenaufteilung**

### 3.3.8 Entnahme der Muskelproben

Nach der Euthanasie der Tiere wurde umgehend mit der Entnahme der Muskelproben begonnen. Hierzu wurde ein Schnitt am rechten Oberschenkel lateral des Musculus quadriceps femoris und parallel zur bestehenden OP-Narbe gesetzt. Das Bein wurde so weit rotiert, bis ein großer Teil des Ober- und Unterschenkels dargestellt werden konnte. Jeweils seitlich der Läsion wurde eine Einzelknopfnahat aus nicht resorbierbarem Material (4-0 Prolene, Ethicon) in das Perimysium als Markierung zur histologischen Schnittführung gesetzt. Die proximale Markierungsnaht für die Injektionen wurde vorsichtig entfernt.



**Abbildung 12: Fadenmarkierung für Histologie**

Anschließend wurde die Patellasehne unterhalb der Patella durchtrennt und mit einer Pinzette nach kranial gezogen. Durch dieses Manöver ließ sich nun die Patella lösen. Der Musculus quadriceps femoris konnte mit dem Skalpell langsam am Femurknochen entlang in toto abgelöst werden. War der Muskel bis gut einen Zentimeter oberhalb der Läsion abgelöst, wurde der Muskelbauch mit einem glatten transversalen Schnitt abgetrennt. Die Muskelprobe konnte nun als Stück entnommen werden.

Die gewonnenen Gewebestücke wurden umgehend entsprechend der Weiterverarbeitung wie folgt behandelt: Für eine spätere RNA-Extraktion wurden zwei

der pro Gruppe und Tag gewonnenen fünf Proben mit einem Skalpell in ca. 1x1 mm große Stücke zerkleinert und in einer Aufbewahrungslösung des RNA-Extraktionskits („RNAlater-Lösung“, Qiagen, Venlo, Niederlande) bis zur weiteren zeitnahen Verarbeitung in 15 ml-Röhrchen gelagert. Aus drei der fünf gewonnen Proben wurden histologische Schnitte angefertigt. Diese Gewebeproben wurden umgehen in Roti®-Histofix 4% (säurefreie (pH 7), phosphatgepufferte Formaldehydlösung, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach ca. 30 Minuten wurde diese Histofix-Lösung erneuert, um etwaige Verunreinigungen beispielsweise durch Blut oder andere Gewebereste zu vermeiden.

### 3.4 RNA-Extraktion und PCR-Analyse

Um die gewonnenen Muskelgewebeproben zu untersuchen und auszuwerten, wurde RNA protokollgetreu mit dem RNeasy Mini Kit der Firma (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert. Mit der gewonnenen RNA wurde eine reverse Transkription zur cDNA-Gewinnung durchgeführt. Die hierbei entstandene cDNA wurde im Folgenden mit einer RT-PCR im Hinblick auf die Aktivität der Satellitenzellen untersucht. Es wurden Primerpaare für die Marker Myosin, CD56, Pax7 sowie für 18S der Ratte als „Housekeeping“-Gen (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet. Die gewonnenen Daten wurden bezüglich der Quantität der vorkommenden Marker beurteilt.

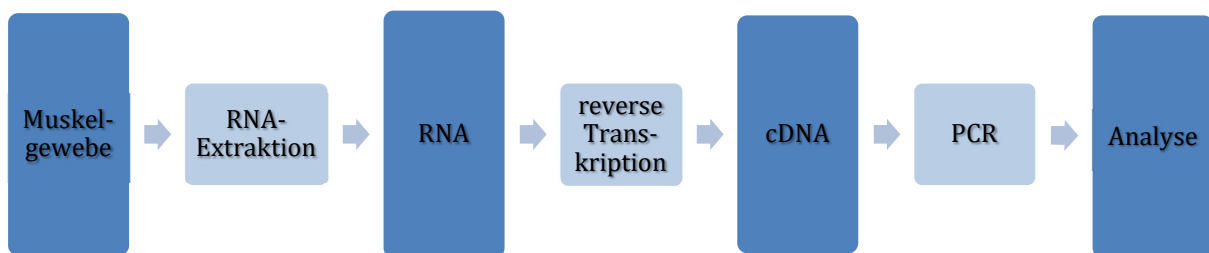


Diagramm 2: Zeitlicher Ablauf der gesamten PCR Untersuchung

### 3.4.1 Isolation

Die RNA-Extraktion erfolgte protokollgetreu des RNeasy Mini Kit-Handbuchs, wobei zusätzlich das RNase-freie DNase-Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) handbuchgetreu eingesetzt wurde.

#### **Inhalt RNeasy Mini Kit:**

RNeasy Mini Spin Columns

Collection Tubes (1.5 ml)

Collection Tubes (2 ml)

Buffer RLT

Buffer RW1

Buffer RPE- Konzentrat (wird 1:4 mit 100% Ethanol verdünnt)

RNase-Free Water

Quick-Start Protocol

#### **Inhalt RNase-freies DNase Set:**

RNase-freie DNase I

RNase-freier Buffer RDD

RNase-freies Wasser

#### **Lyse und Homogenisierung**

Die zerkleinerten Gewebestücke wurden aus der RNA<sup>later</sup>-Lösung entnommen und in eine Mörserschale gegeben. Nach Begießen mit flüssigem Stickstoff wurden diese umgehend zu Pulver gemörsert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 700 µl Portionen mit je 600 µl Buffer RLT in ein dem verwendeten RNA-Extraktionskit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) zugehörigen QIAshredder-Röhrchen (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben, welches auf einem 2 ml Sammelröhrchen platziert wurde, und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die extrahierte Flüssigkeit wurde im 2 ml Sammelröhrchen nun für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Sammelröhrchen abpipettiert.

### **Laden und Binden**

Dem gewonnenen Filtrat wurden je 600 µl 70%iges Ethanol zugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. 700 µl hiervon wurden in eine RNeasy-Spin-Column auf einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben und 15 Sekunden mit 10.000 rpm (rounds-per-minute) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

### **Waschen I und DNA-Verdau**

Auf die RNeasy-Spin-Column wurden 350 µl Buffer RW1 gegeben und 15 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen. 10 µl DNase I wurden zu 70 µl Buffer RDD gegeben und vorsichtig vermischt. 80 µl dieser Mischung wurden direkt auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µl Buffer RW1 hinzugefügt und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde auch hier verworfen.

### **Waschen II**

Im Folgenden wurden 500 µl Buffer RPE auf die Säule gegeben, erneut 15 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 500 µl Buffer RPE auf die Säule gegeben, dieses Mal allerdings 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert.

### **Trocknen**

Die Säule wurde auf eine neues 2 ml-Sammelröhrchen gestellt und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

### **Eluieren**

Die Säule wurde auf ein neues 1,5 ml-Sammelröhrchen platziert. Es wurden 50 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und bei 10.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert.

Die gewonnenen Proben wurden im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) auf ihren RNA-Gehalt geprüft. Hierfür wurden 2 µl der RNA auf die Küvette (µKüvette G1.0, Eppendorf) aufgetragen. Als Leerwert diente RNase-freies Wasser. Es erfolgte eine Messung bei 260 und 280 nm. RNA hat das Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine bei 280 nm. Dieses Verhältnis gibt Aufschluss über die Qualität und Konzentration der RNA. In dieser Versuchsreihe lag das 260/280nm-Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0.

### 3.4.2 Reverse Transkription

Ziel der reversen Transkription ist es, aus der gewonnenen RNA eine cDNA herzustellen. Hierfür wird ein spezielles Enzym, die reverse Transkriptase (Invitrogen/ThermoFischer Scientific), benutzt. Dieses ist in der Lage, aus einzelsträngiger RNA unter Anwesenheit eines Primers einen komplementären DNA-Strang (cDNA) zu erzeugen. Die isolierte RNA wird also unspezifisch umgeschrieben. Hierzu dienen „Random Hexamer Primers“, welche 6 Nukleotide lang sind. Diese randomisierten Sequenzen binden nicht an definierten Stellen der RNA. Somit entstehen unterschiedliche Startpunkte für die reverse Transkription.

Für die reverse Transkription wurde die isolierte, eingefrorene RNA schonend aus Eis aufgetaut.

Je 2 µg RNA wurden mit je 2 µl Random Primers und 2 µl dNTPs in ein Röhrchen eines PCR-Strips gegeben. Anschließend wurden 29 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Im Thermocycler wurden die Strips für 5 Minuten auf 65 °C denaturiert. Nach diesem Schritt liegen alle kohäsiven Enden ungepaart vor. Im Anschluss wurden die Röhrchen sofort auf Eis gekühlt. Danach wurde eine vorbereitete Mischung, bestehend aus je 8µl 5x Puffer, 2µl DTT und 1µl Super Script Reverse Transkriptase, in jedes Röhrchen hinzugefügt. Anschließend wurden die Strips wieder in den Thermocycler gestellt und 5 Minuten bei 25°C, danach 60 Minuten bei 50°C und abschließend 15 Minuten bei 70°C zur Enzymdeaktivierung erhitzt. Die entstehende cDNA wurde bis zur Durchführung der PCR bei -20°C eingefroren. Diese wurde nach Beendigung der Tierversuche mit allen Proben gemeinsam durchgeführt.



<b>Basismischung vor Denaturierung</b>	<b>Zugabe zur Basismischung für reverse Transkription</b>
2 µg RNA	8µl 5x Puffer
2 µl Random Primers	2µl DTT
2 µl dNTPs	1µl Super Script Reverse Transkriptase
29 µl H <sub>2</sub> O	
<i>5 Minuten 65°C</i>	<i>5 Minuten 25°C</i>
	<i>60 Minuten 50°C</i>
	<i>15 Minuten 70°C</i>

**Tabelle 12: Durchführung der reversen Transkription**

### 3.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die zuvor gewonnene cDNA (siehe Kapitel 2.3.2) wird in Real-Time-PCR als Vorlage benutzt. Während der Amplifikation der Ziel-cDNA wird die Zunahme der amplifizierten cDNA durch Fluoreszenzmessungen detektiert. Dies geschieht durch die Nutzung der Eigenschaften von SYBR-Green. SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der stärker fluoresziert, wenn er mit Nukleinsäuren interkaliert.

Im Zuge dieser Arbeit sollte die Expression der Zielgene Myosin, CD56, Pax7 und 18S der Ratte (Qiagen, Hilden, Deutschland) analysiert werden (siehe Tabelle 4).

Die Myosin-Primer dienen dem Nachweis der Neubildung von Myosinfilamenten, die ein essentieller Bestandteil der Muskulatur sind. Werden vermehrt „Myosin-Gene“ transkribiert, ist dies als Hinweis zu werten, dass mehr regenerative Heilung als fibrosierende Narbenbildung stattfindet.

Des Weiteren wurde das Pax7-Gen untersucht. Es gibt Aufschluss über die Aktivität der Satellitenzellen und somit über das Wachstum der Muskulatur.

Der Nachweis der Transkription des CD56-Gens gibt ebenfalls Aufschluss über die qualitative Menge und Aktivität der Satellitenzellen.

Der 18S Primer als „Housekeeping“-Gen der Ratte diente in diesem Versuchsaufbau als interne Kontrolle.

Hs_MYO1H_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT01678383
Hs_PAX7_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00018942
Hs_NCAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00071211
Rn_Rnr1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QT00199374

**Tabelle 13: Verwendete Primer**

Für die Durchführung der RT-PCR wurde die bereits erzeugte cDNA 1:3 mit RNase-freiem Wasser in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen verdünnt. Jede einzelne Probe wurde mit den 4 verschiedenen Primern untersucht. Pro Probe und Primer wurden Triplikate angesetzt, um einen Pipettierfehler auszuschließen. Es erfolgten insgesamt vier Durchgänge der RT-PCR. Pro Primer wurde eine PCR-Analyse durchgeführt.

Jedes Loch der 96-Loch-Platte (96-Well-Platte) wurde mit 5 µl der verdünnten cDNA befüllt. In jeden Well wurden außerdem noch 10 µl SYBR Green PCR Master Mix, 2µl des jeweiligen Primers und 3 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Diese drei Komponenten wurden im Vorfeld für die gesamte Platte in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen hergestellt und jeweils 15 µl dieser Mischung in jedes Loch pipettiert. Mit dieser Vorgehensweise sollte eine einheitliche Basis geschaffen werden und es sollten geringfügige Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Löchern vermieden werden.

Anschließend wurde die Platte in das PCR-Analyse-Gerät gestellt und die Realtime-PCR gestartet.

Zuerst wurde die cDNA für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und eventuell noch vorhandene Enzyme zerstört. Im Anschluss erfolgte 40 Zyklen zur DNA-Amplifizierung, bestehend aus Denaturieren für 15 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden Anlagerung bei 55°C und Verlängerung für 35 Sekunden bei 72°C.

Die Analyse erfolgte mit dem 7300 Real-Time-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5 µl der verdünnten cDNA	<i>10 Minuten 95°C</i>
10 µl SYBR Green PCR Master Mix	<i>15 Sekunden 95°C 30 Sekunden 55°C } 40 Zyklen 35 Sekunden 72°C</i>
2µl des entsprechenden Primers	
3 µl H <sub>2</sub> O	
<b>20 µl pro Loch</b>	

**Tabelle 14: Volumina und Zeiten für Real-Time-PCR**

### **3.5 Histologische Schnitte**

Um die Muskelgewebeproben mikroskopisch beurteilen zu können, wurden histologische Schnitte angefertigt. Die histologische Beurteilung dient der Einschätzung des Heilungsprozesses. Man kann beobachten, ob und wie viel Fibrose oder Muskelregeneration stattgefunden hat, wie viele Entzündungszellen im verletzten Gewebe zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegen oder aber auch, ob es flächige Nekrosen gibt.

### 3.5.1 Präparation der Histologie

Die Muskelproben wurden direkt nach der Entnahme in 4%iger Formaldehydlösung (Histofix®) gelagert. Dieses wurde nach 30 Minuten erneuert, um eventuelle Blutreste oder andere Verunreinigungen zu entfernen.

Die einzelnen Proben wurden individuell zugeschnitten. Das bedeutet, dass ein glatter transversaler Schnitt oberhalb der Verletzung quer zur Faserrichtung erfolgte. Rechts und links der Läsion wurde die Probe passgenau für die Gewebekassetten zugeschnitten. Die Patella wurde vorsichtig entfernt, um ein Zerreißen der Probe beim Schneiden zu verhindern.

Der zugeschnittene Muskel wurde in eine Gewebekassette (Tissue-Tek-Mega

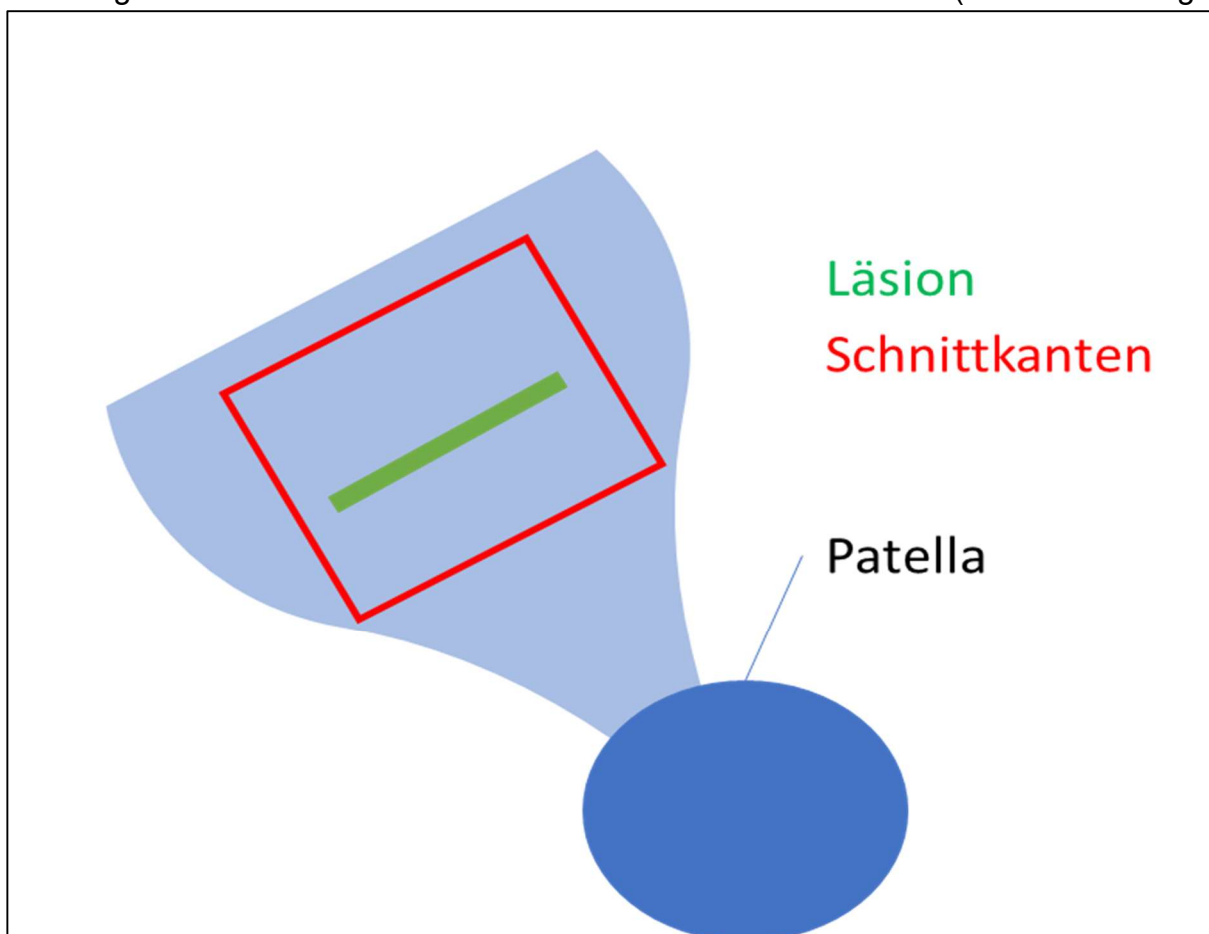
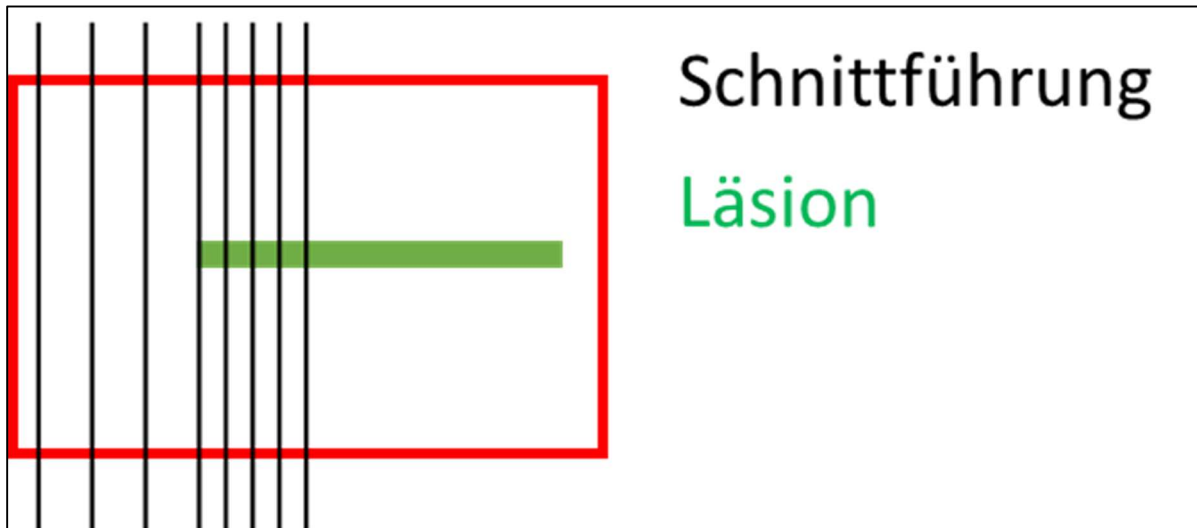


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Zuschnitts der Muskelprobe

Cassette, Firma Sakura) eingebettet und diese beschriftet. Die beschrifteten Kassetten wurden bis zum Einbetten in Paraffin erneut in Histofix® gelagert.

Die einzelnen Kassetten wurden, um die Proben in Paraffin einzubetten, in verschiedenen Schritten im Einbettautomat (Autotechnicon) gewaschen und dehydriert. Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin zu Blöcken gegossen.

Die Paraffinblöcke wurden im Mikrotom quer zur Läsion geschnitten. Anfänglich wurde hierfür eine Schnittdicke von 10µm gewählt. Innerhalb der Läsionszone wurde eine Schnittdicke von 5µm gewählt. Jeder Schnitt wurde auf ein Deckglas aufgezogen und für eine Stunde im Inkubator bei 50°C getrocknet.



Im Folgenden wurde jeder 5. Schnitt mit einer HE-Färbung eingefärbt. Um die Schnitte

#### **Abbildung 14: Schnittführung im Mikrotom**

weiter zu verarbeiten, war es notwendig, diese nun vom Paraffin zu befreien. Die Schnitte wurden je 3 mal 10 Minuten in 100% Xylol gelegt, um so das enthaltene Paraffin zu entfernen. Im Anschluss wurden sie je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 5 Minuten 100%iger Isopropylalkohol, 2 x 5 Minuten 96%iger Isopropylalkohol, 1 x 5 Minuten 70%iger Isopropylalkohol, 1 x 5 Minuten 50%iger Isopropylalkohol) hydriert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült.

Im Folgenden wurden sie zur Kernfärbung für 7 Minuten in Gill-3-Hämatoxylin gefärbt. Dieses wurde anschließend für 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült (Bläuen der Schnitte).

Die anschließende Plasmafärbung erfolgte mit 0,5% wässrigem Eosin G und 1 gtt Eisessig für 2 Minuten. Danach wurde die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und im Anschluss 3 x 5 Minuten in 100% Xylol gelegt. Abschließend wurden die Schnitte mit Cytoseal™, dem Eindeckmedium, eingedeckt.

## **4 Ergebnisse**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der PCR-Untersuchung und der histologischen Schnitte dargestellt.

Es wurden 87 histologische Präparate angefertigt und 60 RNA-Essays durchgeführt. Im Versuchsablauf sind drei Tiere aus unbekanntem Gründen verstorben. Sie wurden am Morgen nach der OP leblos in ihren Käfigen aufgefunden. Die Proben dieser Tiere konnten nicht ausgewertet werden, da der exakte Zeitpunkt des Todes zu weit von unserem ersten Zeitpunkt für die Probenentnahme (1 Tag postoperativ) entfernt war. Es ist ein Tier der Gruppe Traumeel Tag 1 verstorben (Tier Nummer 38). Des Weiteren verstarb ein Tier aus der Gruppe Actovegin und Traumeel an Tag 3 sowie ein Tier aus der Kontrollgruppe an Tag 1. Die verendeten Tiere waren alle der Gruppen für die histologischen Untersuchungen zugeordnet.

Nach der Euthanasie wurden aus den 10 isolierten Muskeln, je 6 Serien histologischer Schnitte angefertigt, und in je 4 weiteren Proben wurde die Expression spezifischer Zielgene mittels RT-PCR untersucht.

## 4.1 RT-PCR

Zur Analyse der Ergebnisse der angefertigten RT-PCR wurden der *cycle threshold*-Wert (Ct-Wert, auch Schwellenwert-Zyklus), der  $\Delta$ Ct-Wert und der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert herangezogen. Der Ct-Wert repräsentiert den Zyklus, in dem die Fluoreszenz der zu messenden Probe erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Um eine relative Quantifizierung durchzuführen, wird der Ct-Wert in Bezug zu einer internen Kontrolle gesetzt, in unserem Fall 18S als Housekeeping-Gen. Hierdurch werden Variationen in der Ausgangsmenge der RNA normiert (Ct-Zielgen – Mittelwert-Ct-Referenz). Um nun unsere untersuchten Gruppen zu vergleichen, wird der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert (Zielgen- $\Delta$ Ct – Mittelwert- $\Delta$ Ct-Kontrolle) gebildet. Dieser ermöglicht den Vergleich zwischen den behandelten Gruppen (Gruppe 1-4) und der Kontrollgruppe, die keine Injektionen erhielt (Gruppe 5). Der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert wird nun in die Gleichung

*x - fache Expression* =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  eingefügt [38].

Die weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPadPrism7 (GraphPad Software). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Mittels Normalwahrscheinlichkeitsdiagramm und Shapiro-Wilk-Test wurde die Verteilung getestet. Im Falle einer Normalverteilung wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Bei nicht normal verteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Test angewendet. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

In den folgenden Abbildungen werden die erfassten mRNA-Werte grafisch dargestellt. Diese wurden mittels des Housekeeping-Gens 18S normalisiert und in Bezug auf die unbehandelte Gruppe dargestellt, welche als durchgezogene Linie in den Abbildungen zu sehen ist [39].

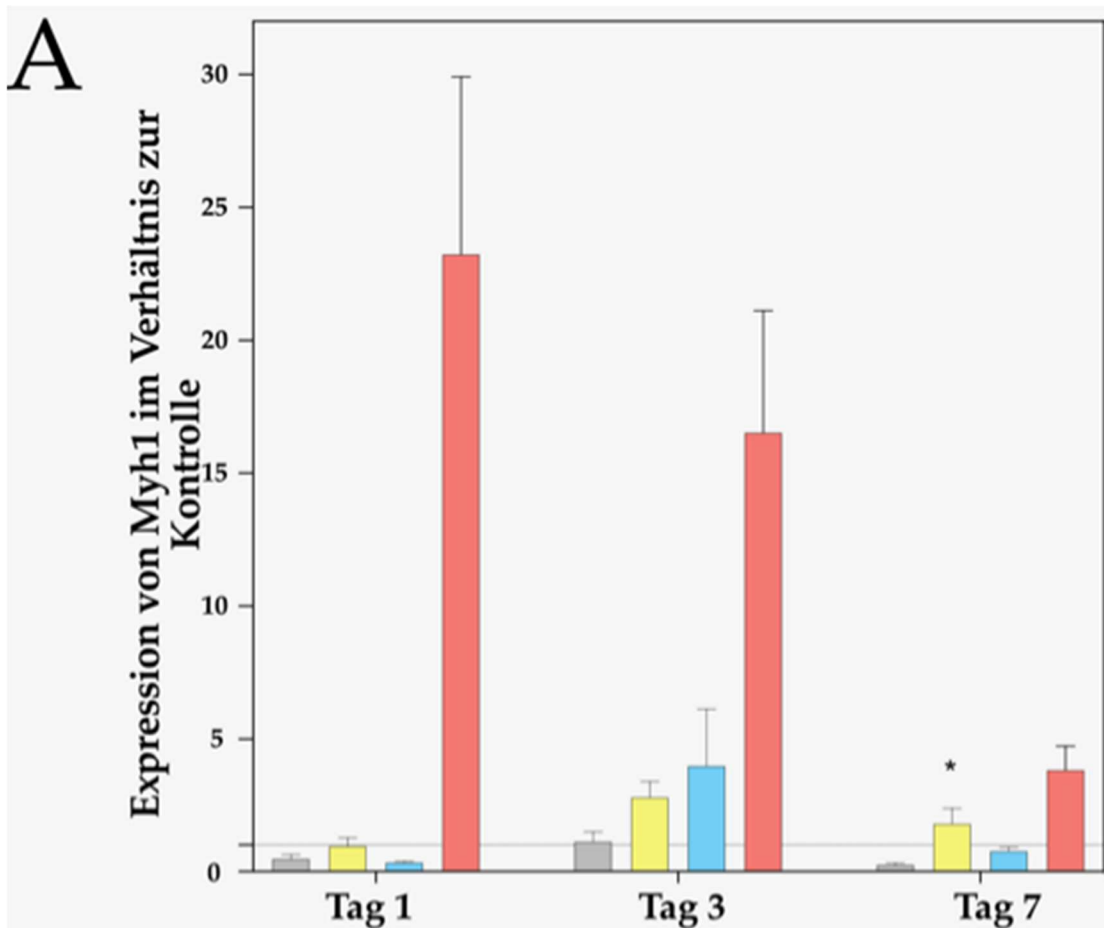
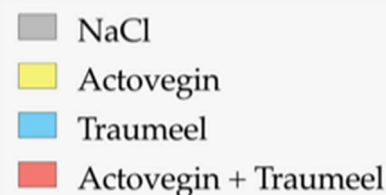


Abbildung 6: Genexpressionsanalyse von Myh1 (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )



### Myosinexpression

An Tag 1 ist die Myosinexpression in Gruppe 4, welche mit Actovegin und Traumeel behandelt wurde, 23-mal höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe (statistisch nicht signifikant). Eine Monotherapie mit NaCl, Actovegin oder Traumeel zeigte zunächst keinen Effekt auf die Expression von Myosin. Drei Tage postoperativ zeigte sich die Myosinexpression in allen mit Actovegin und/oder Traumeel behandelten Gruppen gesteigert. Hierbei ließen sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermitteln. An Tag 7 zeigte sich die Myosinexpression in allen Gruppen gemindert im Vergleich zu den Vortagen. Auch hier zeigte sich in Gruppe 4 die höchste absolute Expression. Gruppe 2 und 4 zeigten eine Erhöhung der Myosinexpression in Bezug auf die Kontrollgruppe, welche bei Gruppe 2 sogar als statistisch signifikant zu werten ist.



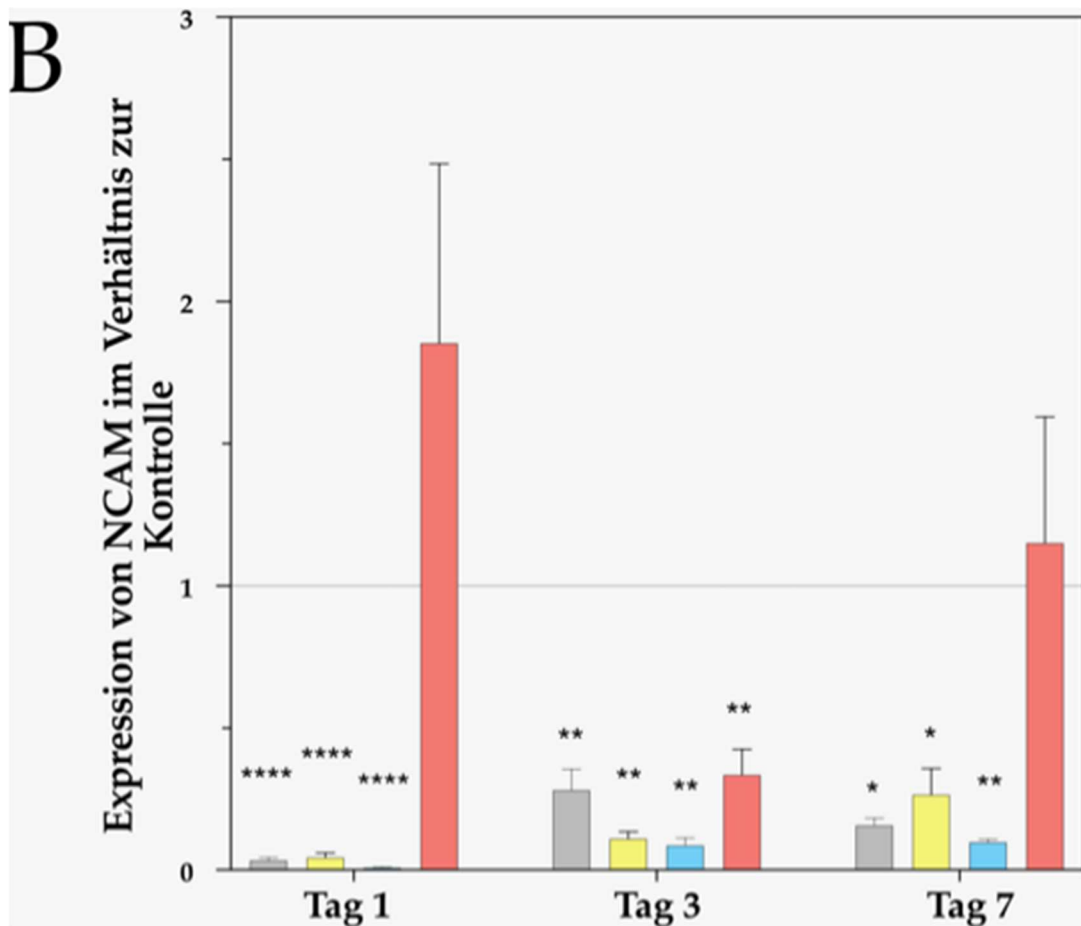
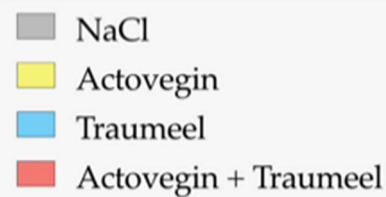


Abbildung 7: Genexpressionsanalyse von NCAM1 (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )



### NCAM1-Expression

An Tag 1 und 7 postoperativ zeigte sich die NCAM1-Expression in Gruppe 4 (Kombinationstherapie) gesteigert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression sogar in allen anderen Gruppen und Zeitpunkten statistisch signifikant vermindert. Eine Kombinationstherapie aus Actovegin und Traumeel führte zu einer gesteigerten Expression an Tag 1 und 7 im Vergleich zu allen behandelten Gruppen, was allerdings statistisch nicht signifikant ist.

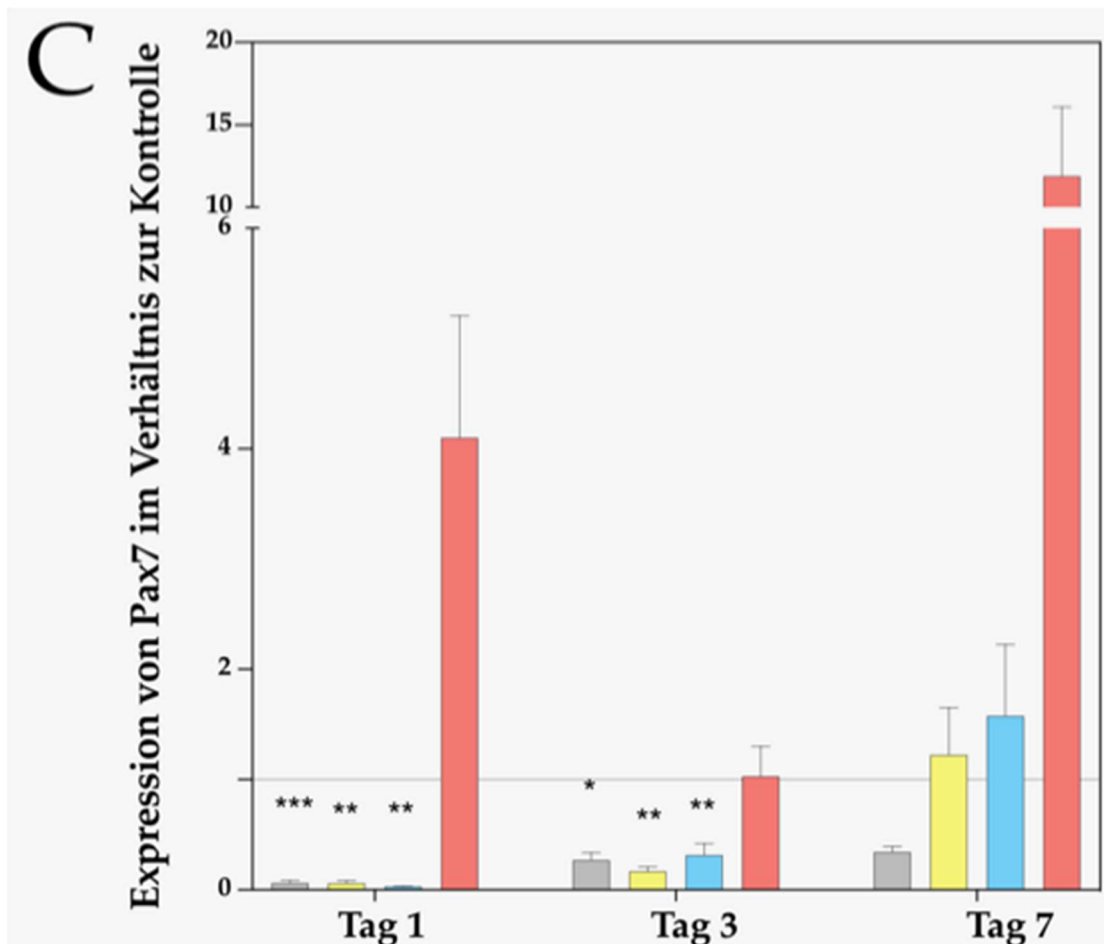
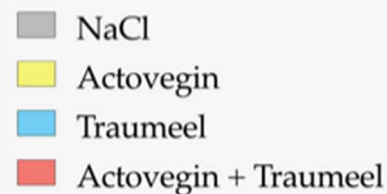


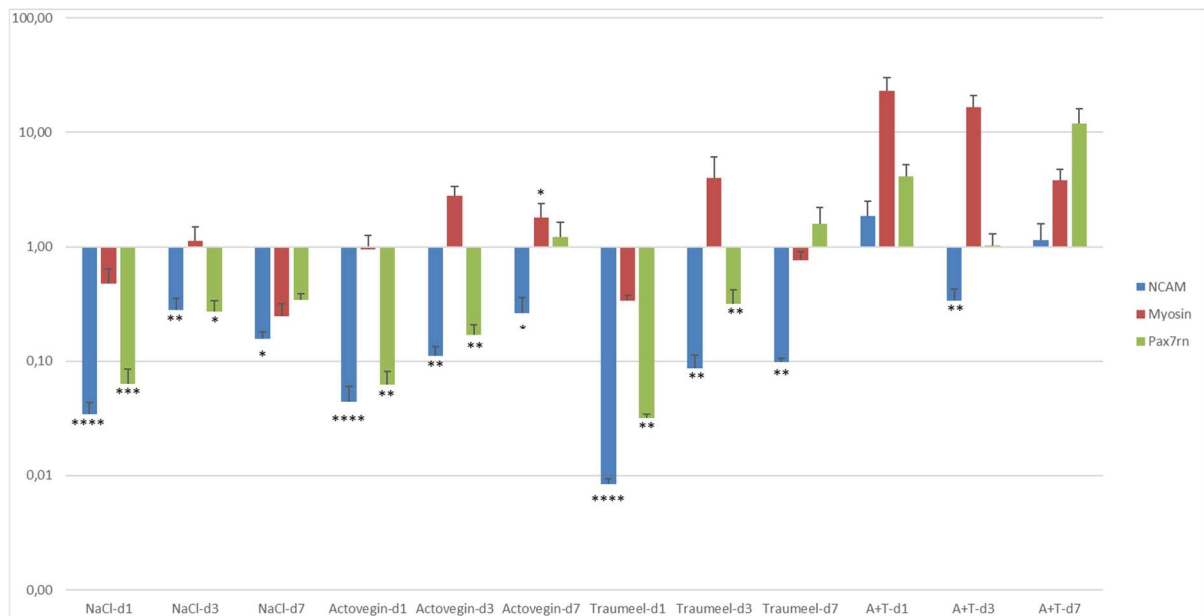
Abbildung 8: Genexpressionsanalyse von Pax7 (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )



### Pax7-Expression

Insgesamt zeigte sich eine statistisch signifikant verminderte Expression von Pax7 an Tag 1 und 3 in allen Gruppen, welche eine Monotherapie erhielten. Gruppe 4 zeigte an Tag 1 und 7 sowie Gruppe 2 und 3 an Tag 7 eine gesteigerte Pax7-Expression. Im Vergleich zu allen Gruppen mit Monotherapie zeigt sich die Pax 7-Expression an Tag 1 und 7 der Kombinationstherapiegruppe gesteigert. Dies ist allerdings statistisch nicht signifikant.

#### 4.1.1 Zusammenfassung der RT-PCR-Analyse



**Abbildung 9: Zusammenfassung der RT-PCR-Analyse. Mittelwert der Triplikate (n=12) dargestellt mit dem Standardfehler. p-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant gewertet. (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)**

Actovegin als Monotherapie (Gruppe 2) beeinflusst die Myosinexpression an Tag 3 und statistisch signifikant an Tag 7 postoperativ positiv. Auch die Pax7-Expression an Tag 7 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt nachweisbar.

Traumeel als Monotherapie zeigte einen positiven Einfluss auf Myosin an Tag 1 und 3 sowie auf Pax7 an Tag 7.

Actovegin und Traumeel zeigen in Kombination (Gruppe 4) ebenfalls einen positiven Effekt auf die Myosinexpression. Insbesondere an Tag 1 ist dies besonders deutlich zu erkennen, nämlich 23-mal mehr als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies ist zwar statistisch nicht signifikant, zeigt jedoch eine Wirkungstendenz. Auch eine vermehrte Expression von NCAM1 und Pax7 ist an Tag 1 und 7 erkennbar.

Eine Injektionstherapie mit NaCl scheint keinen positiven Effekt zu haben. Hier ist die Genexpression der untersuchten Marker sogar überwiegend geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

## 4.1.2 Daten der RT-PCR-Analyse

### Tag 1

Gruppe	Präparat - nummer	18S	NCAM-1	MW 18S	$\Delta Ct$ NCAM-1	MW $\Delta Ct$ KG	$\Delta\Delta Ct$ NCAM-1	x-fache Expression NCAM-1
Kontrolle-d1-1	2093	21,27	36,00	19,29	16,71	13,22		
	2093	21,66	34,14	19,29	14,85	13,22		
	2093	22,30	33,99	19,29	14,71	13,22		
Kontrolle-d1-2	2094	14,32	28,79	19,29	9,50	13,22		
	2094	14,78	29,22	19,29	9,93	13,22		
	2094	14,57	31,39	19,29	12,10	13,22		
Kontrolle-d1-3	2095	15,22	33,02	19,29	13,73	13,22		
	2095	15,04	32,72	19,29	13,43	13,22		
	2095	15,14	33,31	19,29	14,02	13,22		
Kontrolle-d1-4	2096	25,87		19,29				
	2096	25,60		19,29				
	2096	25,69		19,29				
NaCl-d1-1	1949	7,44	25,54	8,21	17,33	13,22	4,11	0,058
	1949	7,22	25,27	8,21	17,06	13,22	3,84	0,070
	1949	6,79	25,67	8,21	17,45	13,22	4,23	0,053
NaCl-d1-2	2055	10,40	29,19	8,21	20,98	13,22	7,76	0,005
	2055	9,52	29,51	8,21	21,29	13,22	8,07	0,004
	2055	9,62	28,91	8,21	20,70	13,22	7,48	0,006
NaCl-d1-3	1950	5,94	25,16	8,21	16,94	13,22	3,72	0,076
	1950	6,20	25,67	8,21	17,45	13,22	4,23	0,053
	1950	5,74	25,25	8,21	17,04	13,22	3,82	0,071
NaCl-d1-4	2056	9,42	28,99	8,21	20,77	13,22	7,55	0,005
	2056	9,83	29,14	8,21	20,93	13,22	7,70	0,005
	2056	10,43	29,12	8,21	20,90	13,22	7,68	0,005
Actovegin-d1-1	1980	13,17	30,61	10,77	19,84	13,22	6,62	0,010
	1980	13,00	30,14	10,77	19,38	13,22	6,16	0,014
	1980	12,82	30,40	10,77	19,64	13,22	6,42	0,012
Actovegin-d1-2	2061	10,28	29,54	10,77	18,77	13,22	5,55	0,021
	2061	9,95	30,03	10,77	19,27	13,22	6,05	0,015
	2061	9,68	29,85	10,77	19,08	13,22	5,86	0,017
Actovegin-d1-3	1981	7,66	27,06	10,77	16,29	13,22	3,07	0,119
	1981	8,45	27,02	10,77	16,25	13,22	3,03	0,122
	1981	9,14	26,60	10,77	15,84	13,22	2,62	0,163
Actovegin-d1-4	2062	11,82	30,52	10,77	19,75	13,22	6,53	0,011
	2062	11,57	30,32	10,77	19,55	13,22	6,33	0,012
	2062	11,66	30,78	10,77	20,01	13,22	6,79	0,009
Traumeel-d1-1	1986	8,81	30,57	8,67	21,91	13,22	8,68	0,002
	1986	9,06	30,05	8,67	21,38	13,22	8,16	0,003
	1986	8,87	30,65	8,67	21,98	13,22	8,76	0,002

Traumeel-d1-2	2067	8,14	28,79	8,67	20,12	13,22	6,90	0,008
	2067	8,23	28,65	8,67	19,99	13,22	6,77	0,009
	2067	8,18	28,43	8,67	19,76	13,22	6,54	0,011
Traumeel-d1-3	1987	7,54	28,52	8,67	19,85	13,22	6,63	0,010
	1987	7,25	28,33	8,67	19,66	13,22	6,44	0,012
	1987	7,24	28,11	8,67	19,44	13,22	6,22	0,013
Traumeel-d1-4	2068	10,28	28,38	8,67	19,71	13,22	6,49	0,011
	2068	10,12	28,78	8,67	20,11	13,22	6,89	0,008
	2068	10,28	28,61	8,67	19,94	13,22	6,72	0,009
A+T-d1-1	1992							
	1992							
	1992							
A+T-d1-2	2087	14,53	27,49	16,18	11,30	13,22	-1,92	3,775
	2087	14,36	27,32	16,18	11,14	13,22	-2,08	4,238
	2087	14,26	27,18	16,18	10,99	13,22	-2,23	4,688
A+T-d1-3	1993	19,13	36,38	16,18	20,20	13,22	6,97	0,008
	1993	20,22	36,67	16,18	20,49	13,22	7,27	0,006
	1993	20,15	35,85	16,18	19,66	13,22	6,44	0,012
A+T-d1-4	2088	14,43	29,00	16,18	12,81	13,22	-0,41	1,325
	2088	14,18	28,74	16,18	12,55	13,22	-0,67	1,591
	2088	14,40	29,34	16,18	13,16	13,22	-0,06	1,046

**Tabelle 15: PCR-Daten Tag 1 18S und NCAM1**

Gruppe	Präparatnummer	Myosin	MW 18S	$\Delta$ Ct Myosin	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct Myosin	x-fache Expression Myosin
Kontrolle-d1-1	2093	29,99	19,29	10,71	9,32		
	2093	29,83	19,29	10,54	9,32		
	2093	30,03	19,29	10,75	9,32		
Kontrolle-d1-2	2094	24,11	19,29	4,82	9,32		
	2094	22,88	19,29	3,59	9,32		
	2094	22,83	19,29	3,54	9,32		
Kontrolle-d1-3	2095	28,02	19,29	8,74	9,32		
	2095	24,92	19,29	5,63	9,32		
	2095	24,84	19,29	5,55	9,32		
Kontrolle-d1-4	2096	35,18	19,29	15,89	9,32		
	2096	35,51	19,29	16,23	9,32		
	2096	35,18	19,29	15,90	9,32		
NaCl-d1-1	1949	18,67	8,21	10,46	9,32	1,13	0,455
	1949	17,99	8,21	9,78	9,32	0,46	0,728
	1949	33,64	8,21	25,43	9,32	16,11	0,000
NaCl-d1-2	2055	21,19	8,21	12,98	9,32	3,65	0,079
	2055	21,41	8,21	13,19	9,32	3,87	0,068
	2055	21,06	8,21	12,85	9,32	3,53	0,087
NaCl-d1-3	1950	17,97	8,21	9,76	9,32	0,44	0,739
	1950	16,76	8,21	8,55	9,32	-0,77	1,709

	1950	17,06	8,21	8,85	9,32	-0,47	1,386
NaCl-d1-4	2056	20,18	8,21	11,97	9,32	2,64	0,160
	2056	20,24	8,21	12,03	9,32	2,70	0,153
	2056	20,20	8,21	11,98	9,32	2,66	0,158
Actovegin-d1-1	1980	22,63	10,77	11,86	9,32	2,54	0,172
	1980	22,40	10,77	11,63	9,32	2,31	0,202
	1980	22,53	10,77	11,76	9,32	2,44	0,184
Actovegin-d1-2	2061	20,37	10,77	9,60	9,32	0,28	0,824
	2061	21,00	10,77	10,23	9,32	0,91	0,534
	2061	20,79	10,77	10,03	9,32	0,70	0,614
Actovegin-d1-3	1981	19,48	10,77	8,71	9,32	-0,61	1,526
	1981	19,16	10,77	8,40	9,32	-0,93	1,900
	1981	18,13	10,77	7,37	9,32	-1,96	3,882
Actovegin-d1-4	2062	20,92	10,77	10,15	9,32	0,83	0,562
	2062	21,26	10,77	10,49	9,32	1,17	0,445
	2062	20,81	10,77	10,05	9,32	0,72	0,606
Traumeel-d1-1	1986	18,75	8,67	10,08	9,32	0,76	0,592
	1986	18,76	8,67	10,09	9,32	0,77	0,588
	1986	19,07	8,67	10,40	9,32	1,08	0,473
Traumeel-d1-2	2067	20,31	8,67	11,65	9,32	2,32	0,200
	2067	20,16	8,67	11,49	9,32	2,17	0,223
	2067	20,01	8,67	11,35	9,32	2,02	0,246
Traumeel-d1-3	1987	19,54	8,67	10,87	9,32	1,55	0,342
	1987	19,41	8,67	10,74	9,32	1,42	0,374
	1987	19,47	8,67	10,81	9,32	1,48	0,358
Traumeel-d1-4	2068	20,32	8,67	11,66	9,32	2,33	0,198
	2068	20,25	8,67	11,58	9,32	2,26	0,209
	2068	20,14	8,67	11,48	9,32	2,15	0,225
A+T-d1-1	1992						
	1992						
	1992						
A+T-d1-2	2087	19,95	16,18	3,77	9,32	-5,55	46,944
	2087	19,79	16,18	3,61	9,32	-5,72	52,577
	2087	20,30	16,18	4,12	9,32	-5,21	36,892
A+T-d1-3	1993	27,33	16,18	11,14	9,32	1,82	0,283
	1993	27,42	16,18	11,23	9,32	1,91	0,266
	1993	27,45	16,18	11,26	9,32	1,94	0,261
A+T-d1-4	2088	20,97	16,18	4,78	9,32	-4,54	23,263
	2088	20,76	16,18	4,58	9,32	-4,75	26,856
	2088	21,06	16,18	4,88	9,32	-4,45	21,785

**Tabelle 16: PCR-Daten Tag 1 Myosin**

Gruppe	Präparat- nummer	Pax7Rn	MW 18S	$\Delta$ Ct Pax7Rn	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct Pax7Rn	x-fache Expression Pax7Rn
Kontrolle-d1-1	2093	33,68	19,29	14,40	13,99		
	2093	31,16	19,29	11,87	13,99		
	2093	32,67	19,29	13,38	13,99		
Kontrolle-d1-2	2094	30,03	19,29	10,74	13,99		
	2094	30,27	19,29	10,99	13,99		
	2094	29,43	19,29	10,15	13,99		
Kontrolle-d1-3	2095	32,72	19,29	13,43	13,99		
	2095	31,15	19,29	11,87	13,99		
	2095	32,13	19,29	12,84	13,99		
Kontrolle-d1-4	2096	36,75	19,29	17,46	13,99		
	2096	39,70	19,29	20,41	13,99		
	2096	39,70	19,29	20,42	13,99		
NaCl-d1-1	1949	25,07	8,21	16,86	13,99	2,86	0,138
	1949	25,20	8,21	16,99	13,99	3,00	0,125
	1949	37,87	8,21	29,66	13,99	15,66	0,000
NaCl-d1-2	2055	30,34	8,21	22,13	13,99	8,13	0,004
	2055	30,01	8,21	21,80	13,99	7,81	0,004
	2055	37,54	8,21	29,32	13,99	15,33	0,000
NaCl-d1-3	1950	24,49	8,21	16,28	13,99	2,28	0,206
	1950	25,13	8,21	16,92	13,99	2,93	0,131
	1950	25,10	8,21	16,89	13,99	2,89	0,135
NaCl-d1-4	2056	29,42	8,21	21,20	13,99	7,21	0,007
	2056	29,96	8,21	21,74	13,99	7,75	0,005
	2056	29,19	8,21	20,98	13,99	6,99	0,008
Actovegin-d1-1	1980	30,91	10,77	20,14	13,99	6,14	0,014
	1980	31,83	10,77	21,06	13,99	7,07	0,007
	1980	30,39	10,77	19,62	13,99	5,63	0,020
Actovegin-d1-2	2061	29,52	10,77	18,75	13,99	4,76	0,037
	2061	29,87	10,77	19,10	13,99	5,10	0,029
	2061	29,32	10,77	18,56	13,99	4,56	0,042
Actovegin-d1-3	1981	27,40	10,77	16,63	13,99	2,64	0,161
	1981	27,41	10,77	16,64	13,99	2,65	0,159
	1981	27,13	10,77	16,36	13,99	2,37	0,194
Actovegin-d1-4	2062	30,28	10,77	19,52	13,99	5,52	0,022
	2062	29,66	10,77	18,90	13,99	4,90	0,033
	2062	29,99	10,77	19,23	13,99	5,23	0,027
Traumeel-d1-1	1986	28,26	8,67	19,59	13,99	5,60	0,021
	1986	27,66	8,67	18,99	13,99	4,99	0,031
	1986	27,38	8,67	18,71	13,99	4,71	0,038
Traumeel-d1-2	2067	27,38	8,67	18,71	13,99	4,71	0,038
	2067	27,45	8,67	18,79	13,99	4,79	0,036
	2067	27,19	8,67	18,52	13,99	4,53	0,043
Traumeel-d1-3	1987	27,27	8,67	18,60	13,99	4,61	0,041

	1987	27,34	8,67	18,67	13,99	4,67	0,039
	1987	27,55	8,67	18,88	13,99	4,88	0,034
Traumeel-d1-4	2068	28,21	8,67	19,54	13,99	5,55	0,021
	2068	28,27	8,67	19,61	13,99	5,61	0,020
	2068	28,29	8,67	19,62	13,99	5,63	0,020
A+T-d1-1	1992						
	1992						
	1992						
A+T-d1-2	2087	27,19	16,18	11,01	13,99	-2,99	7,927
	2087	27,20	16,18	11,02	13,99	-2,98	7,887
	2087	27,71	16,18	11,53	13,99	-2,47	5,538
A+T-d1-3	1993	38,41	16,18	22,22	13,99	8,23	0,003
	1993	34,58	16,18	18,40	13,99	4,40	0,047
	1993	36,00	16,18	19,82	13,99	5,82	0,018
A+T-d1-4	2088	28,25	16,18	12,07	13,99	-1,93	3,800
	2088	27,52	16,18	11,33	13,99	-2,66	6,324
	2088	27,75	16,18	11,57	13,99	-2,43	5,376

**Tabelle 17: PCR-Daten Tag 1 Pax7**



### Tag 3

Gruppe	Präparat- nummer	18S	NCAM-1	MW 18S	$\Delta$ Ct NCAM-1	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct NCAM-1	x-fache Expression NCAM-1
Kontrolle-d3-1	2097	16,69	33,94	14,49	19,45	15,49		
	2097	16,96	35,05	14,49	20,57	15,49		
	2097	16,78	35,60	14,49	21,11	15,49		
Kontrolle-d3-2	2098	14,17	30,15	14,49	15,66	15,49		
	2098	14,26	30,11	14,49	15,63	15,49		
	2098	14,07	30,16	14,49	15,68	15,49		
Kontrolle-d3-3	2099	17,42	28,52	14,49	14,03	15,49		
	2099	17,26	28,84	14,49	14,35	15,49		
	2099	17,32	29,35	14,49	14,87	15,49		
Kontrolle-d3-4	2100	9,72	26,02	14,49	11,53	15,49		
	2100	9,64	26,05	14,49	11,56	15,49		
	2100	9,55	25,92	14,49	11,43	15,49		
NaCl-d3-1	1951	6,52	25,24	8,39	16,85	15,49	1,36	0,390
	1951	6,94	25,27	8,39	16,88	15,49	1,39	0,382
	1951	6,69	24,72	8,39	16,34	15,49	0,85	0,556
NaCl-d3-2	2057	10,69	30,34	8,39	21,95	15,49	6,46	0,011
	2057	11,44	30,11	8,39	21,72	15,49	6,23	0,013
	2057	10,72	30,03	8,39	21,64	15,49	6,15	0,014
NaCl-d3-3	1952	8,66	27,59	8,39	19,21	15,49	3,72	0,076
	1952	9,47	27,54	8,39	19,15	15,49	3,66	0,079
	1952	8,84	27,20	8,39	18,81	15,49	3,32	0,100
NaCl-d3-4	2058	6,98	24,37	8,39	15,98	15,49	0,49	0,712
	2058	6,85	24,98	8,39	16,60	15,49	1,11	0,465
	2058	6,85	24,69	8,39	16,30	15,49	0,81	0,570
Actovegin-d3-1	1982	14,08	32,62	9,60	23,02	15,49	7,53	0,005
	1982	13,88	32,12	9,60	22,52	15,49	7,03	0,008
	1982	14,43	32,74	9,60	23,14	15,49	7,65	0,005
Actovegin-d3-2	2063	7,43	27,72	9,60	18,12	15,49	2,63	0,161
	2063	8,05	27,28	9,60	17,68	15,49	2,19	0,220
	2063	7,66	27,43	9,60	17,83	15,49	2,34	0,198
Actovegin-d3-3	1983	7,28	27,63	9,60	18,03	15,49	2,54	0,172
	1983	6,58	27,62	9,60	18,02	15,49	2,53	0,173
	1983	7,22	27,63	9,60	18,03	15,49	2,54	0,172
Actovegin-d3-4	2064	9,51	28,93	9,60	19,33	15,49	3,84	0,070
	2064	9,53	29,18	9,60	19,58	15,49	4,09	0,059
	2064	9,53	28,62	9,60	19,02	15,49	3,53	0,087
Traumeel-d3-1	1988	10,63	31,16	9,65	21,52	15,49	6,03	0,015
	1988	10,62	30,35	9,65	20,71	15,49	5,22	0,027
	1988	10,03	31,16	9,65	21,51	15,49	6,02	0,015
Traumeel-d3-2	2069	10,53	29,53	9,65	19,88	15,49	4,39	0,048
	2069	10,64	28,97	9,65	19,33	15,49	3,84	0,070
	2069	10,66	29,14	9,65	19,49	15,49	4,00	0,062

Traumeel-d3-3	1989	9,65	30,26	9,65	20,61	15,49	5,12	0,029
	1989	9,79	30,06	9,65	20,41	15,49	4,92	0,033
	1989	10,15	29,71	9,65	20,06	15,49	4,57	0,042
Traumeel-d3-4	2070	7,71	27,29	9,65	17,64	15,49	2,15	0,225
	2070	7,26	27,34	9,65	17,70	15,49	2,21	0,217
	2070	8,11	27,12	9,65	17,48	15,49	1,99	0,252
A+T-d3-1	1994							
	1994							
	1994							
A+T-d3-2	2089	8,45	28,80	12,69	16,11	15,49	0,62	0,651
	2089	9,24	29,05	12,69	16,36	15,49	0,87	0,548
	2089	8,80	29,07	12,69	16,37	15,49	0,88	0,543
A+T-d3-3	1995	19,44	38,53	12,69	25,84	15,49	10,35	0,001
	1995	19,00	38,25	12,69	25,55	15,49	10,06	0,001
	1995	18,44	38,82	12,69	26,13	15,49	10,64	0,001
A+T-d3-4	2090	10,28	29,13	12,69	16,44	15,49	0,95	0,517
	2090	10,33	29,33	12,69	16,64	15,49	1,15	0,451
	2090	10,28	29,85	12,69	17,15	15,49	1,66	0,316

Tabelle 18: PCR-Daten Tag 3 18S und NCAM1

Gruppe	Präparat- nummer	Myosin	MW 18S	$\Delta$ Ct Myosin	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct Myosin	x-fache Expression Myosin
Kontrolle-d3-1	2097	28,22	14,49	13,73	11,21		
	2097	28,25	14,49	13,76	11,21		
	2097	28,17	14,49	13,68	11,21		
Kontrolle-d3-2	2098	33,00	14,49	18,51	11,21		
	2098	32,65	14,49	18,16	11,21		
	2098	32,45	14,49	17,96	11,21		
Kontrolle-d3-3	2099	22,43	14,49	7,95	11,21		
	2099	22,16	14,49	7,68	11,21		
	2099	21,52	14,49	7,03	11,21		
Kontrolle-d3-4	2100	19,80	14,49	5,31	11,21		
	2100	19,84	14,49	5,35	11,21		
	2100	19,88	14,49	5,39	11,21		
NaCl-d3-1	1951	17,82	8,39	9,43	11,21	-1,78	3,429
	1951	18,49	8,39	10,11	11,21	-1,10	2,149
	1951	18,55	8,39	10,17	11,21	-1,04	2,060
NaCl-d3-2	2057	21,30	8,39	12,91	11,21	1,70	0,307
	2057	21,19	8,39	12,80	11,21	1,59	0,332
	2057	21,24	8,39	12,86	11,21	1,65	0,319
NaCl-d3-3	1952	20,93	8,39	12,54	11,21	1,33	0,398
	1952	20,25	8,39	11,86	11,21	0,65	0,637
	1952	20,58	8,39	12,19	11,21	0,98	0,506
NaCl-d3-4	2058	39,31	8,39	30,92	11,21	19,71	0,000
	2058	17,87	8,39	9,48	11,21	-1,73	3,320

	2058	33,64	8,39	25,26	11,21	14,05	0,000
Actovegin-d3-1	1982	26,11	9,60	16,51	11,21	5,30	0,025
	1982	26,11	9,60	16,51	11,21	5,30	0,025
	1982	25,96	9,60	16,36	11,21	5,16	0,028
Actovegin-d3-2	2063	19,22	9,60	9,62	11,21	-1,59	3,003
	2063	18,58	9,60	8,98	11,21	-2,23	4,695
	2063	18,52	9,60	8,92	11,21	-2,29	4,880
Actovegin-d3-3	1983	18,17	9,60	8,57	11,21	-2,64	6,240
	1983	18,77	9,60	9,17	11,21	-2,04	4,105
	1983	18,98	9,60	9,38	11,21	-1,83	3,566
Actovegin-d3-4	2064	19,55	9,60	9,95	11,21	-1,25	2,386
	2064	19,83	9,60	10,23	11,21	-0,98	1,968
	2064	19,46	9,60	9,86	11,21	-1,34	2,540
Traumeel-d3-1	1988	21,66	9,65	12,01	11,21	0,80	0,573
	1988	21,64	9,65	12,00	11,21	0,79	0,579
	1988	21,47	9,65	11,82	11,21	0,61	0,654
Traumeel-d3-2	2069	19,37	9,65	9,73	11,21	-1,48	2,794
	2069	19,60	9,65	9,95	11,21	-1,26	2,390
	2069	19,43	9,65	9,79	11,21	-1,42	2,680
Traumeel-d3-3	1989	21,26	9,65	11,61	11,21	0,40	0,757
	1989	21,59	9,65	11,94	11,21	0,73	0,602
	1989	21,46	9,65	11,81	11,21	0,60	0,659
Traumeel-d3-4	2070	17,55	9,65	7,90	11,21	-3,31	9,930
	2070	16,16	9,65	6,52	11,21	-4,69	25,857
	2070	22,08	9,65	12,43	11,21	1,22	0,429
A+T-d3-1	1994						
	1994						
	1994						
A+T-d3-2	2089	18,85	12,69	6,15	11,21	-5,06	33,251
	2089	19,10	12,69	6,41	11,21	-4,80	27,887
	2089	18,85	12,69	6,15	11,21	-5,06	33,297
A+T-d3-3	1995	29,00	12,69	16,31	11,21	5,10	0,029
	1995	28,00	12,69	15,31	11,21	4,10	0,058
	1995	29,78	12,69	17,09	11,21	5,88	0,017
A+T-d3-4	2090	19,68	12,69	6,99	11,21	-4,22	18,615
	2090	19,76	12,69	7,07	11,21	-4,14	17,632
	2090	19,74	12,69	7,04	11,21	-4,17	17,976

**Tabelle 19: PCR-Daten Tag 3 Myosin**

Gruppe	Präparat- nummer	Pax7Rn	MW 18S	$\Delta$ Ct Pax7Rn	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct Pax7Rn	x-fache Expression Pax7Rn
Kontrolle-d3-1	2097	32,41	14,49	17,93	16,07		
	2097	32,73	14,49	18,24	16,07		
	2097	32,00	14,49	17,51	16,07		
Kontrolle-d3-2	2098	35,00	14,49	20,51	16,07		
	2098	30,19	14,49	15,70	16,07		
	2098	30,70	14,49	16,22	16,07		
Kontrolle-d3-3	2099	29,61	14,49	15,12	16,07		
	2099	29,96	14,49	15,47	16,07		
	2099	32,54	14,49	18,06	16,07		
Kontrolle-d3-4	2100	27,25	14,49	12,76	16,07		
	2100	26,65	14,49	12,16	16,07		
	2100	27,67	14,49	13,18	16,07		
NaCl-d3-1	1951	25,99	8,39	17,60	16,07	1,53	0,346
	1951	25,72	8,39	17,33	16,07	1,26	0,417
	1951	25,14	8,39	16,75	16,07	0,68	0,623
NaCl-d3-2	2057	29,60	8,39	21,21	16,07	5,14	0,028
	2057	29,81	8,39	21,42	16,07	5,35	0,025
	2057	30,07	8,39	21,69	16,07	5,61	0,020
NaCl-d3-3	1952	28,28	8,39	19,89	16,07	3,82	0,071
	1952	27,89	8,39	19,50	16,07	3,43	0,093
	1952	27,21	8,39	18,82	16,07	2,75	0,148
NaCl-d3-4	2058	25,24	8,39	16,86	16,07	0,78	0,581
	2058	25,92	8,39	17,53	16,07	1,46	0,363
	2058	25,39	8,39	17,00	16,07	0,93	0,524
Actovegin-d3-1	1982	32,62	9,60	23,02	16,07	6,95	0,008
	1982	32,85	9,60	23,25	16,07	7,18	0,007
	1982	32,39	9,60	22,79	16,07	6,71	0,010
Actovegin-d3-2	2063	27,65	9,60	18,05	16,07	1,98	0,253
	2063	27,80	9,60	18,20	16,07	2,13	0,229
	2063	27,73	9,60	18,13	16,07	2,06	0,240
Actovegin-d3-3	1983	27,70	9,60	18,10	16,07	2,03	0,245
	1983	27,06	9,60	17,46	16,07	1,39	0,381
	1983	27,18	9,60	17,58	16,07	1,51	0,351
Actovegin-d3-4	2064	28,76	9,60	19,16	16,07	3,09	0,118
	2064	28,13	9,60	18,53	16,07	2,45	0,182
	2064	38,14	9,60	28,54	16,07	12,47	0,000
Traumeel-d3-1	1988	29,19	9,65	19,54	16,07	3,47	0,090
	1988	28,99	9,65	19,35	16,07	3,27	0,103
	1988	29,59	9,65	19,95	16,07	3,88	0,068
Traumeel-d3-2	2069	28,34	9,65	18,69	16,07	2,62	0,162
	2069	28,34	9,65	18,69	16,07	2,62	0,163
	2069	28,75	9,65	19,10	16,07	3,03	0,122
Traumeel-d3-3	1989	28,41	9,65	18,77	16,07	2,69	0,154
	1989	28,24	9,65	18,59	16,07	2,52	0,174

	1989	29,21	9,65	19,56	16,07	3,49	0,089
Traumeel-d3-4	2070	25,89	9,65	16,24	16,07	0,17	0,890
	2070	25,68	9,65	16,04	16,07	-0,03	1,024
	2070	26,12	9,65	16,48	16,07	0,41	0,755
A+T-d3-1	1994						
	1994						
	1994						
A+T-d3-2	2089	27,90	12,69	15,21	16,07	-0,86	1,816
	2089	28,16	12,69	15,47	16,07	-0,61	1,522
	2089	28,02	12,69	15,32	16,07	-0,75	1,679
A+T-d3-3	1995	37,32	12,69	24,62	16,07	8,55	0,003
	1995	37,89	12,69	25,20	16,07	9,13	0,002
	1995	38,47	12,69	25,78	16,07	9,71	0,001
A+T-d3-4	2090	28,64	12,69	15,95	16,07	-0,12	1,089
	2090	27,85	12,69	15,16	16,07	-0,91	1,885
	2090	28,42	12,69	15,73	16,07	-0,34	1,267

**Tabelle 20: PCR-Daten Tag 3 Pax7**

## Tag 7

Gruppe	Präparat- nummer	18S	NCAM-1	MW 18S	$\Delta$ Ct NCAM-1	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct NCAM-1	x-fache Expression NCAM-1
Kontrolle-d7-1	2101	13,01	29,29	16,55	12,74	15,50		
	2101	12,97	29,21	16,55	12,66	15,50		
	2101	12,98	29,35	16,55	12,80	15,50		
Kontrolle-d7-2	2102	17,10	31,45	16,55	14,90	15,50		
	2102	17,23	32,83	16,55	16,28	15,50		
	2102	17,26	32,36	16,55	15,81	15,50		
Kontrolle-d7-3	2103	13,37	29,39	16,55	12,84	15,50		
	2103	12,49	29,53	16,55	12,97	15,50		
	2103	12,49	29,29	16,55	12,74	15,50		
Kontrolle-d7-4	2104	23,06	34,17	16,55	17,62	15,50		
	2104	23,56	38,25	16,55	21,70	15,50		
	2104	23,12	39,56	16,55	23,01	15,50		
NaCl-d7-1	1953							
	1953							
	1953							
NaCl-d7-2	2059	8,55	28,50	10,37	18,13	15,50	2,62	0,162
	2059	8,10	28,31	10,37	17,94	15,50	2,44	0,185
	2059	8,12	27,57	10,37	17,20	15,50	1,70	0,308
NaCl-d7-3	1954	12,64	28,48	10,37	18,11	15,50	2,60	0,164
	1954	11,74	28,26	10,37	17,89	15,50	2,39	0,191
	1954	12,51	28,57	10,37	18,20	15,50	2,70	0,154
NaCl-d7-4	2060	10,92	29,59	10,37	19,22	15,50	3,72	0,076
	2060	10,16	29,62	10,37	19,25	15,50	3,74	0,075
	2060	10,60	29,26	10,37	18,89	15,50	3,38	0,096
Actovegin-d7-1	1984	16,38	32,50	11,93	20,77	15,50	5,26	0,026
	1984	16,16	33,22	11,93	21,48	15,50	5,98	0,016
	1984	16,62	32,78	11,93	21,05	15,50	5,55	0,021
Actovegin-d7-2	2065	9,01	29,36	11,93	17,62	15,50	2,12	0,230
	2065	9,08	29,45	11,93	17,72	15,50	2,21	0,215
	2065	9,25	28,87	11,93	17,14	15,50	1,63	0,322
Actovegin-d7-3	1985	8,04	27,29	11,93	15,56	15,50	0,05	0,964
	1985	8,06	27,84	11,93	16,11	15,50	0,60	0,658
	1985	8,18	27,86	11,93	16,12	15,50	0,62	0,651
Actovegin-d7-4	2066	14,19	32,88	11,93	21,14	15,50	5,64	0,020
	2066	14,10	32,16	11,93	20,42	15,50	4,92	0,033
	2066	14,09	31,97	11,93	21,43	15,50	5,93	0,016
Traumeel-d7-1	1990	8,77	28,82	10,24	18,28	15,50	2,78	0,145
	1990	8,39	28,95	10,24	18,41	15,50	2,91	0,133
	1990	8,60	29,16	10,24	18,62	15,50	3,12	0,115
Traumeel-d7-2	2071	14,13	30,75	10,24	20,21	15,50	4,71	0,038
	2071	14,09	30,30	10,24	19,76	15,50	4,26	0,052
	2071	14,47	29,50	10,24	18,96	15,50	3,46	0,091

Traumeel-d7-3	1991	9,06	29,50	10,24	18,96	15,50	3,46	0,091
	1991	9,36	29,44	10,24	18,90	15,50	3,40	0,095
	1991	9,08	29,64	10,24	19,10	15,50	3,59	0,083
Traumeel-d7-4	2072	9,07	29,65	10,24	19,11	15,50	3,61	0,082
	2072	9,02	28,94	10,24	18,40	15,50	2,90	0,134
	2072	8,88	29,23	10,24	18,69	15,50	3,19	0,110
A+T-d7-1	1996							
	1996							
	1996							
A+T-d7-2	2091	17,33	32,26	15,02	17,23	15,50	1,73	0,301
	2091	16,68	32,30	15,02	17,28	15,50	1,78	0,292
	2091	17,04	31,90	15,02	16,87	15,50	1,37	0,387
A+T-d7-3	1997	13,32	29,63	15,02	14,61	15,50	-0,90	1,863
	1997	13,21	28,63	15,02	13,61	15,50	-1,90	3,726
	1997	12,90	29,03	15,02	14,01	15,50	-1,50	2,824
A+T-d7-4	2092	14,58	31,99	15,02	16,96	15,50	1,46	0,363
	2092	15,21	32,04	15,02	17,02	15,50	1,51	0,350
	2092	14,95	32,49	15,02	17,47	15,50	1,96	0,256

Tabelle 21: PCR-Daten Tag 7 18S und NCAM1

Gruppe	Präparat- nummer	Myosin	MW 18S	$\Delta$ Ct Myosin	MW $\Delta$ Ct KG	$\Delta\Delta$ Ct Myosin	x-fache Expression Myosin
Kontrolle-d7-1	2101	21,98	16,55	5,43	9,32		
	2101	22,11	16,55	5,56	9,32		
	2101	22,01	16,55	5,45	9,32		
Kontrolle-d7-2	2102	25,74	16,55	9,18	9,32		
	2102	26,12	16,55	9,57	9,32		
	2102	25,92	16,55	9,36	9,32		
Kontrolle-d7-3	2103	21,60	16,55	5,04	9,32		
	2103	21,57	16,55	5,01	9,32		
	2103	21,07	16,55	4,51	9,32		
Kontrolle-d7-4	2104	31,69	16,55	15,13	9,32		
	2104	31,49	16,55	14,93	9,32		
	2104	31,85	16,55	15,30	9,32		
NaCl-d7-1	1953						
	1953						
	1953						
NaCl-d7-2	2059	20,15	10,37	9,78	9,32	1,07	0,476
	2059	20,30	10,37	9,93	9,32	1,22	0,428
	2059	19,80	10,37	9,43	9,32	0,73	0,604
NaCl-d7-3	1954	23,32	10,37	12,95	9,32	4,24	0,053
	1954	24,37	10,37	14,00	9,32	5,29	0,025
	1954	27,12	10,37	16,75	9,32	8,05	0,004
NaCl-d7-4	2060	21,22	10,37	10,85	9,32	2,15	0,226
	2060	21,36	10,37	10,99	9,32	2,28	0,206

	2060	21,48	10,37	11,11	9,32	2,40	0,189
Actovegin-d7-1	1984	26,25	11,93	14,52	9,32	5,81	0,018
	1984	26,31	11,93	14,58	9,32	5,87	0,017
	1984	25,96	11,93	14,23	9,32	5,52	0,022
Actovegin-d7-2	2065	18,94	11,93	7,21	9,32	-1,50	2,830
	2065	19,27	11,93	7,53	9,32	-1,18	2,259
	2065	19,27	11,93	7,54	9,32	-1,17	2,246
Actovegin-d7-3	1985	18,28	11,93	6,55	9,32	-2,16	4,476
	1985	18,27	11,93	6,54	9,32	-2,17	4,498
	1985	18,12	11,93	6,39	9,32	-2,32	4,990
Actovegin-d7-4	2066	23,91	11,93	12,18	9,32	3,47	0,090
	2066	24,26	11,93	12,52	9,32	3,81	0,071
	2066	26,12	11,93	15,58	9,32	6,87	0,009
Traumeel-d7-1	1990	19,69	10,24	9,15	9,32	0,44	0,737
	1990	18,88	10,24	8,34	9,32	-0,37	1,289
	1990	19,14	10,24	8,60	9,32	-0,11	1,080
Traumeel-d7-2	2071	21,53	10,24	10,99	9,32	2,28	0,206
	2071	20,35	10,24	9,81	9,32	1,10	0,467
	2071	22,69	10,24	12,15	9,32	3,44	0,092
Traumeel-d7-3	1991	19,98	10,24	9,44	9,32	0,73	0,601
	1991	20,49	10,24	9,95	9,32	1,25	0,421
	1991	20,72	10,24	10,18	9,32	1,47	0,360
Traumeel-d7-4	2072	18,64	10,24	8,11	9,32	-0,60	1,518
	2072	18,79	10,24	8,25	9,32	-0,46	1,373
	2072	19,20	10,24	8,66	9,32	-0,05	1,035
A+T-d7-1	1996						
	1996						
	1996						
A+T-d7-2	2091	23,35	15,02	8,32	9,32	-0,38	1,305
	2091	23,94	15,02	8,91	9,32	0,20	0,868
	2091	23,72	15,02	8,70	9,32	-0,01	1,007
A+T-d7-3	1997	20,78	15,02	5,76	9,32	-2,95	7,736
	1997	21,05	15,02	6,03	9,32	-2,68	6,415
	1997	20,98	15,02	5,96	9,32	-2,75	6,734
A+T-d7-4	2092	22,11	15,02	7,09	9,32	-1,62	3,075
	2092	22,38	15,02	7,36	9,32	-1,35	2,549
	2092	21,45	15,02	6,42	9,32	-2,29	4,877

**Tabelle 22: PCR-Daten Tag 7 Myosin**



Gruppe	Präparat- nummer	Pax7Rn	MW 18S	$\Delta$ Ct Pax7Rn	MW $\Delta$ CT KG	$\Delta\Delta$ Ct Pax7Rn	x-fache Expression Pax7Rn
Kontrolle-d7-1	2101	29,98	16,55	13,43	17,13		
	2101	30,77	16,55	14,22	17,13		
	2101	30,28	16,55	13,72	17,13		
Kontrolle-d7-2	2102	33,95	16,55	17,39	17,13		
	2102	33,71	16,55	17,15	17,13		
	2102	37,76	16,55	21,21	17,13		
Kontrolle-d7-3	2103	30,36	16,55	13,81	17,13		
	2103	29,54	16,55	12,99	17,13		
	2103	30,32	16,55	13,76	17,13		
Kontrolle-d7-4	2104	38,09	16,55	21,53	17,13		
	2104	39,79	16,55	23,24	17,13		
	2104	39,68	16,55	23,13	17,13		
NaCl-d7-1	1953				17,13		
	1953				17,13		
	1953				17,13		
NaCl-d7-2	2059	29,15	10,37	18,78	17,13	1,65	0,319
	2059	28,36	10,37	17,99	17,13	0,86	0,551
	2059	28,62	10,37	18,25	17,13	1,12	0,461
NaCl-d7-3	1954	28,44	10,37	18,07	17,13	0,94	0,522
	1954	29,68	10,37	19,31	17,13	2,18	0,221
	1954	29,50	10,37	19,13	17,13	2,00	0,250
NaCl-d7-4	2060	28,93	10,37	18,56	17,13	1,43	0,371
	2060	30,02	10,37	19,65	17,13	2,52	0,175
	2060	29,68	10,37	19,30	17,13	2,17	0,222
Actovegin-d7-1	1984	33,05	11,93	21,32	17,13	4,18	0,055
	1984	33,88	11,93	22,15	17,13	5,01	0,031
	1984	33,39	11,93	21,65	17,13	4,52	0,044
Actovegin-d7-2	2065	28,71	11,93	16,98	17,13	-0,15	1,112
	2065	28,56	11,93	16,82	17,13	-0,31	1,239
	2065	28,37	11,93	16,64	17,13	-0,49	1,409
Actovegin-d7-3	1985	27,07	11,93	15,33	17,13	-1,80	3,486
	1985	27,24	11,93	15,51	17,13	-1,63	3,090
	1985	26,89	11,93	15,15	17,13	-1,98	3,939
Actovegin-d7-4	2066	32,41	11,93	20,67	17,13	3,54	0,086
	2066	31,48	11,93	19,75	17,13	2,61	0,163
	2066	32,01	11,93	21,47	17,13	4,34	0,049
Traumeel-d7-1	1990	26,69	10,24	16,15	17,13	-0,99	1,981
	1990	26,72	10,24	16,18	17,13	-0,95	1,934
	1990	26,84	10,24	16,30	17,13	-0,83	1,779
Traumeel-d7-2	2071	29,65	10,24	19,11	17,13	1,98	0,254
	2071	29,97	10,24	19,43	17,13	2,30	0,203
	2071	29,35	10,24	18,81	17,13	1,68	0,312
Traumeel-d7-3	1991	18,54	10,24	8,00	17,13	-9,13	560,793
	1991	17,82	10,24	7,29	17,13	-9,85	921,363

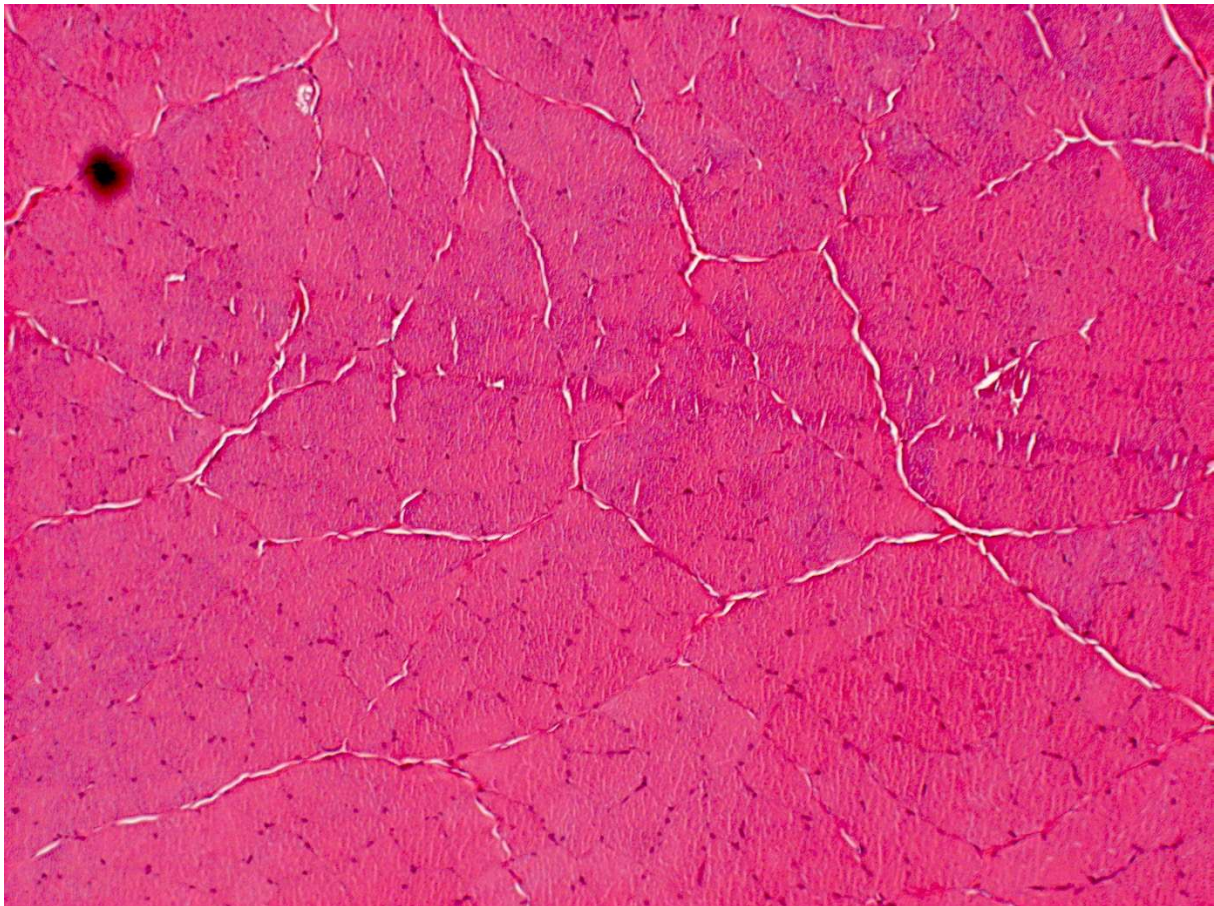
	1991	24,86	10,24	14,32	17,13	-2,82	7,038
Traumeel-d7-4	2072	28,03	10,24	17,49	17,13	0,36	0,778
	2072	28,20	10,24	17,66	17,13	0,53	0,692
	2072	27,99	10,24	17,45	17,13	0,31	0,804
A+T-d7-1	1996						
	1996						
	1996						
A+T-d7-2	2091	30,19	15,02	15,17	17,13	-1,97	3,911
	2091	31,16	15,02	16,14	17,13	-1,00	1,995
	2091	30,88	15,02	15,85	17,13	-1,28	2,425
A+T-d7-3	1997	27,65	15,02	12,63	17,13	-4,51	22,736
	1997	26,99	15,02	11,97	17,13	-5,17	35,925
	1997	27,52	15,02	12,50	17,13	-4,64	24,880
A+T-d7-4	2092	29,60	15,02	14,58	17,13	-2,56	5,880
	2092	29,85	15,02	14,83	17,13	-2,30	4,936
	2092	29,98	15,02	14,96	17,13	-2,17	4,515

**Tabelle 23: PCR-Daten Tag 7 Pax7**

## 4.2 Histologische Schnitte

In der qualitativen, histologischen Auswertung der HE-Schnitte wurden folgende Kriterien beurteilt: Leukozyteneinwanderung, Auflockerung durch Ödembildung, Nekrose, Einblutungen und bereits erfolgte Fibrose.

Abbildung 15 zeigt normales Muskelgewebe der Ratte ohne Defekt zum Vergleich. Man erkennt die einzelnen Muskelbündel im Querschnitt, in denen die Muskelfasern zusammengefasst sind. Zwischen den Muskelbündeln liegen einzelne Leukozyten. Die weißen Furchen sind Septen und Epimysium und teilen die einzelnen Bündel in Sekundärbündel auf.



**Abbildung 15: Muskelgewebe ohne Defekt, 10-fache Vergrößerung**

Die histologische Auswertung erfolgte qualitativ und ohne graphische Hilfsmittel.

#### 4.2.1 NaCl-Injektionen (Gruppe 1)

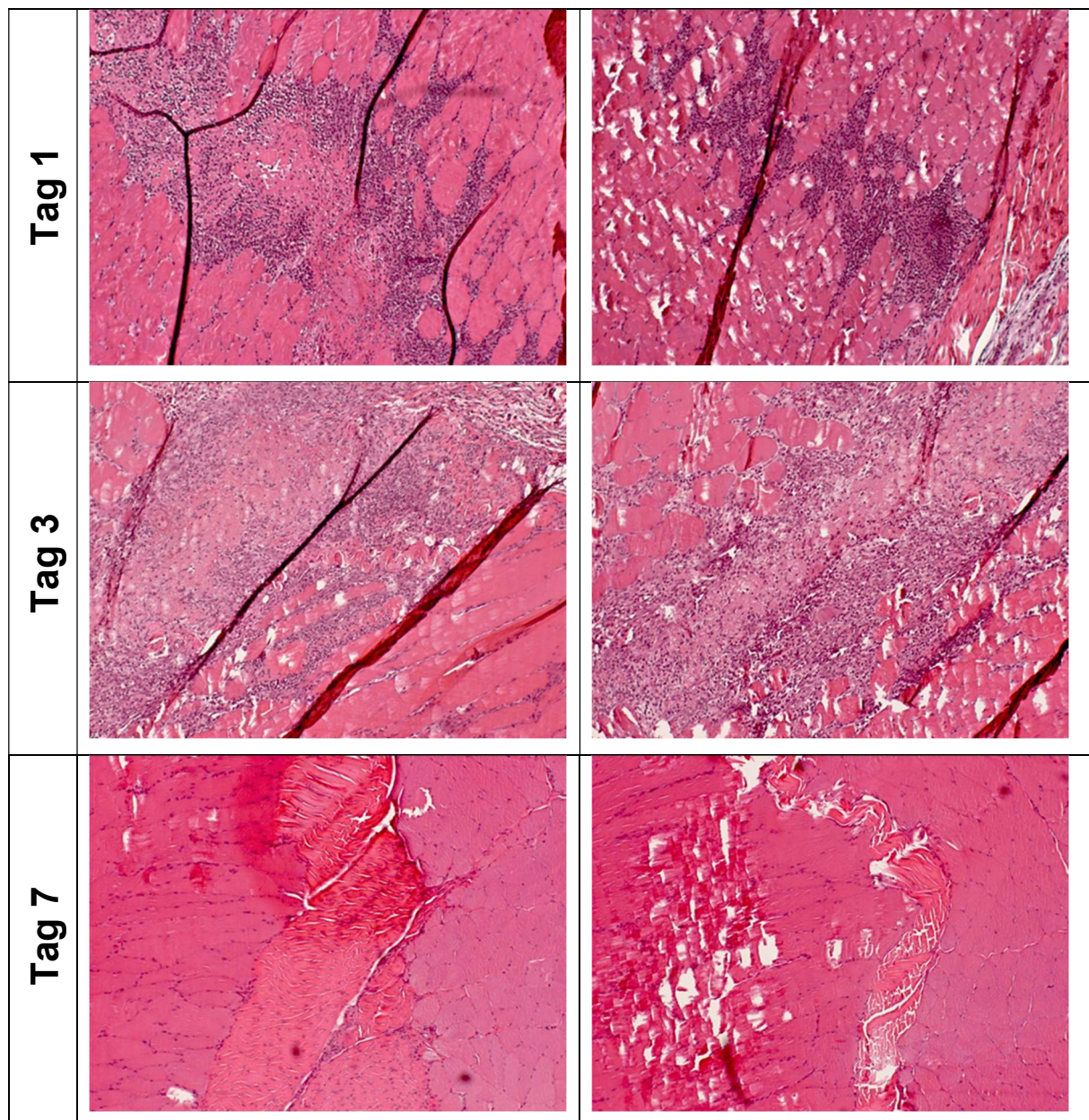


Abbildung 16: NaCl-Gruppe (Gruppe 1), 10-fache Vergrößerung

Gruppe 1, deren histologische Schnittbilder hier dargestellt werden, erhielt lediglich Injektionen mit physiologischer NaCl-Lösung. Am 1. Tag nach Setzen der Läsion sind zahlreiche Entzündungszellen im Muskelgewebe vorhanden. Im Läsionsareal erkennt man Zellexsudat und nekrotische Muskelbündel. Im gesamten abgebildeten Muskel ist aufgelockertes Gewebe als Zeichen für ein massives Ödem erkennbar.

Am 3. Tag nach Setzen der Läsion schreitet die Nekrosebildung fort. Es sind weiterhin zahlreiche Leukozyten nachweisbar. Leukozyten und nekrotische Areale bilden eine bandähnliche Struktur. Ein begleitendes Ödem ist noch flächig im gesamten Präparat zu erkennen.

Am 7. Tag nach operativer Läsion sind kaum noch Leukozyten zu erkennen. Das Läsionsareal ist immer noch von leichtem Ödem aufgelockert und zeigt nach wie vor ein flächiges nekrotisches Areal. Insgesamt wirkt die gesamte Muskelarchitektur im Vergleich zu Tag 1 und 3 nach Setzen der Läsion deutlich organisierter. Man kann den Stichkanal des Skalpells, der einen Muskelbündelriss simuliert, mikroskopisch gut erkennen und abgrenzen. In diesem Bereich dominiert zum Zeitpunkt der Untersuchung die Fibrosebildung. Zwischen den Muskelstümpfen hat sich ein fibrotisches Areal gebildet. Die Entzündung zeigt sich rückläufig.

#### 4.2.2 Actovegin-Injektionen (Gruppe 2)

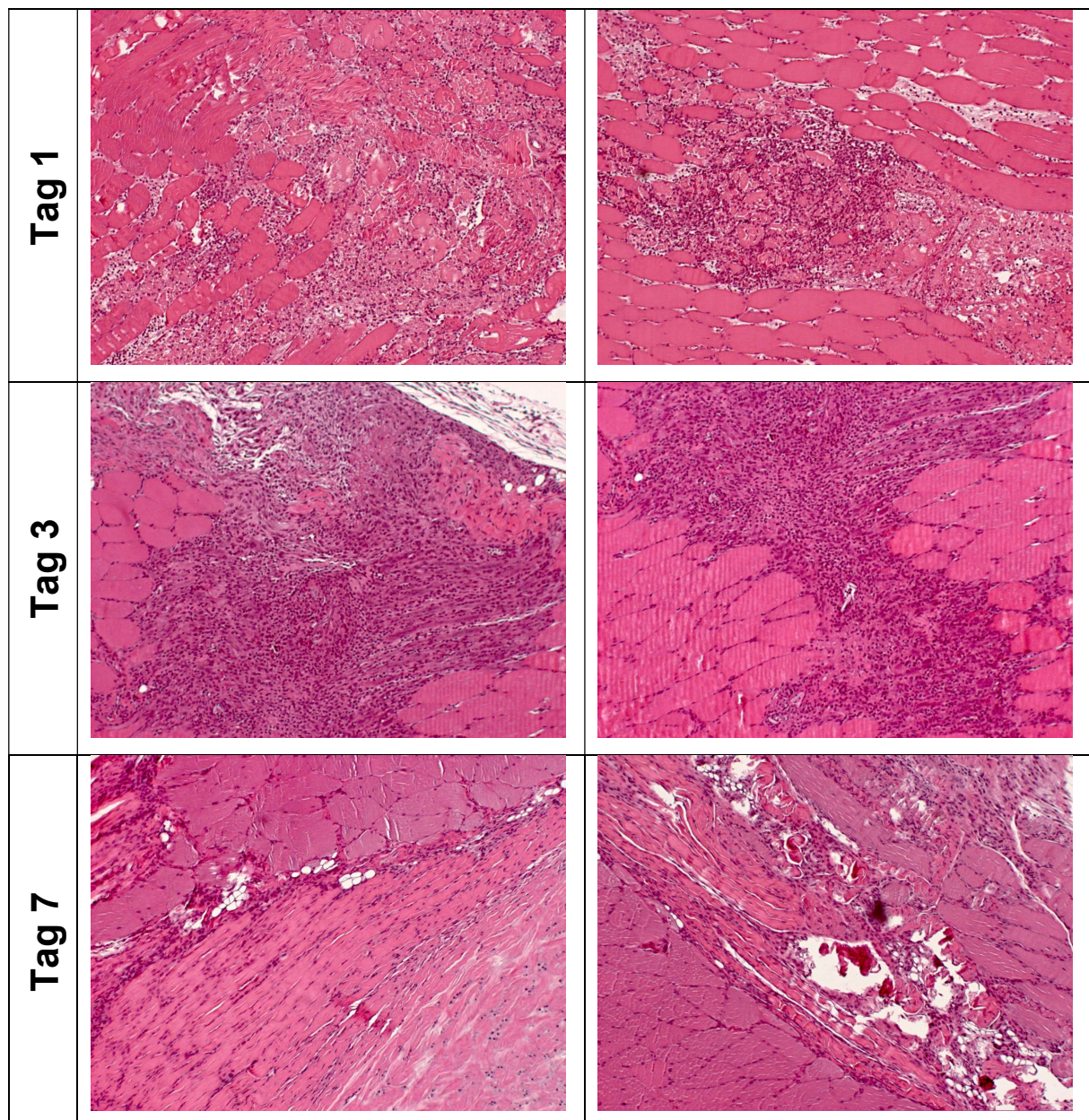


Abbildung 17: Actovegin-Gruppe (Gruppe 2), 10-fache Vergrößerung

Gruppe 2 bekam nur Actovegin in den simulierten Muskelbündelriss injiziert.

Direkt am Tag 1 nach dem Eingriff lässt sich kaum organisiertes Muskelgewebe ausmachen. Ein großes Ödem sowie das Einwandern zahlreicher Leukozyten als Ausdruck einer massiven Entzündungsreaktion dominieren das Bild.

Am 3. postoperativen Tag zeigt sich das Ödem leicht rückläufig. Die einzelnen Muskelbündel sind wieder näher zusammengerückt. Die Menge der Leukozyten scheint im Vergleich zum ersten postoperativen Tag angestiegen zu sein. Es sind großflächige nekrotische Bereiche zu erkennen.

Am 7.Tag nach der Operation finden sich optisch im Actovegin-Präparat mehr Leukozyten als im NaCl-Präparat. Insgesamt wirkt hier der Läsionsbereich jedoch besser organisiert. Der verbliebene Läsionsbereich erscheint kleiner als bei den Vergleichsgruppen. Des Weiteren scheint auch die Größe des verbliebenen Fibrose- und Nekrosebereichs geringer als in den Vergleichspräparaten.

Die Ergebnisse von Tag 7 weisen eine augenscheinlich bessere Heilungstendenz als die Kontrollgruppe ohne Injektionen auf. Gruppe 2 zeigt am 7. Tag nach Setzen der Läsion insgesamt weniger Fibrose und weniger Nekrose. Auch finden sich weniger Nekrose und Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 5).

#### 4.2.3 Traumeel-Injektionen (Gruppe 3)

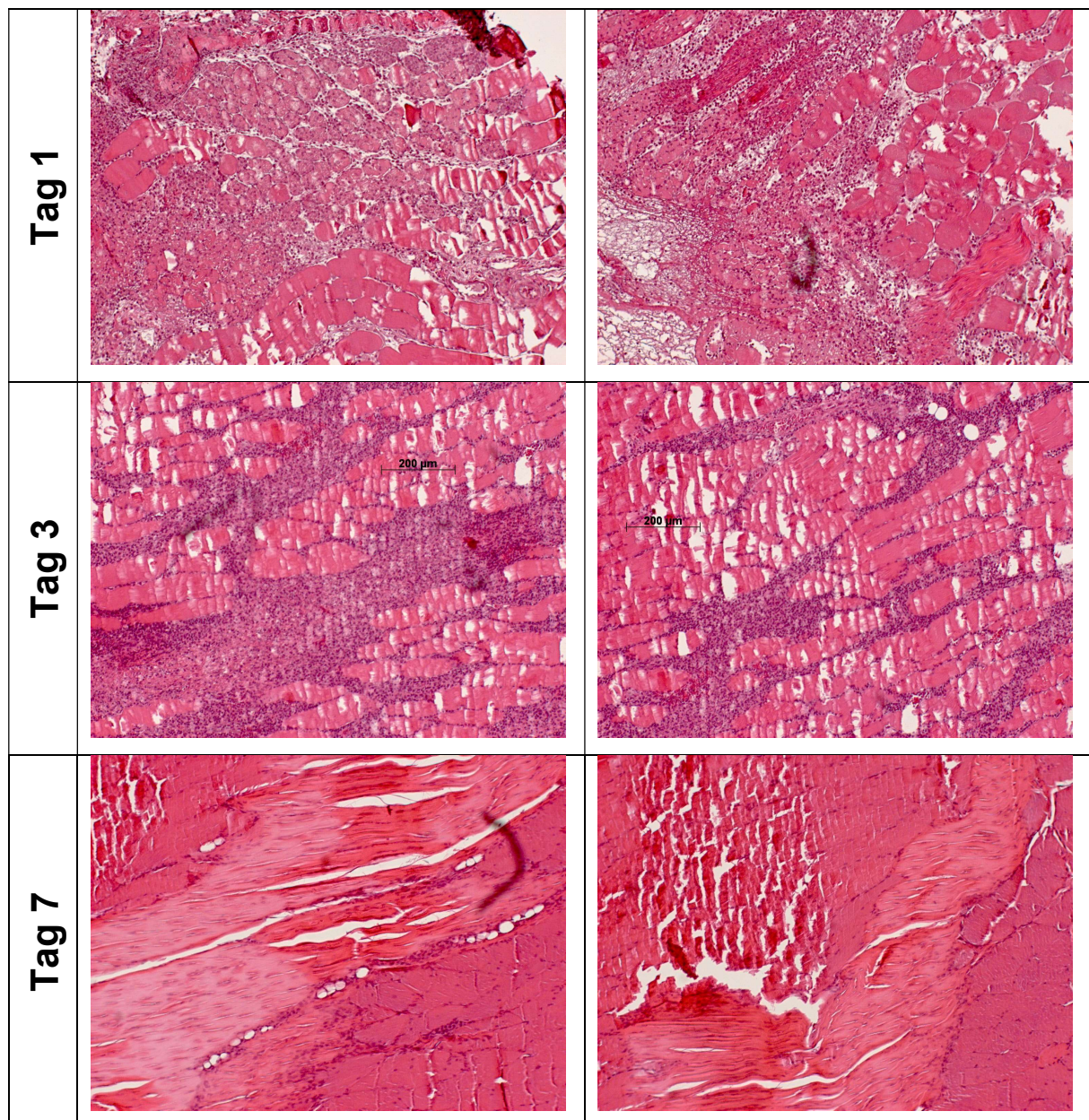


Abbildung 18: Traumeel-Gruppe (Gruppe 3), 10-fache Vergrößerung



Der folgende Abschnitt beschreibt die histologischen Ergebnisse, welche bei der 3. Gruppe, die nur Traumeel injiziert bekam, gewonnen werden konnten.

Am Tag 1 nach dem Eingriff findet sich wie in allen Präparaten dieses Zeitpunkts ein starkes Ödem. Das gesamte Gewebe erscheint aufgelockert und unorganisiert. Des Weiteren finden sich auch viele Leukozyten und eine omnipräsente, beginnende Nekrose. Ebenso lassen sich kleinere Einblutungen erkennen.

Im Verlauf erkennt man am Tag 3, dass sich zwischen den ödematös veränderten Muskelfasern weitere Leukozyten anreichern. Das Muskelgewebe ist weiterhin sehr unorganisiert, insbesondere im Vergleich mit Gruppe 1 und 2 an Tag 3. Es lassen sich vereinzelt erste Fibrosebildungen erkennen.

Der bandförmige Läsionsbereich ist am Tag 7 als deutliche Narbe mit Fibroblasten zu erkennen. Ein Restödem im umgebenden Gewebe ist noch vorhanden. Die Leukozyten sind weitestgehend aus dem Gewebe verschwunden, aber es bestehen weiterhin nekrotische Areale, welche noch nicht suffizient abgetragen wurden. Im Läsionsbereich zeigen sich keine Anhaltspunkte für eine höhergradige muskuläre Reorganisation, vielmehr überwiegt die Narbenbildung durch Fibrosierung. In Bezug auf die Kontrollgruppe, welche keine Injektionen erhielt, wirkt die Fibrosierung an Tag 7 in den Präparaten der Traumeel-Gruppe (Gruppe 3) ausgeprägter. Unter allen angefertigten Präparaten des Untersuchungszeitpunktes Tag 7 zeigt Gruppe 3 die deutlichste Fibrose.

#### 4.2.4 Kombinierte Actovegin & Traumeel-Injektionen (Gruppe 4)

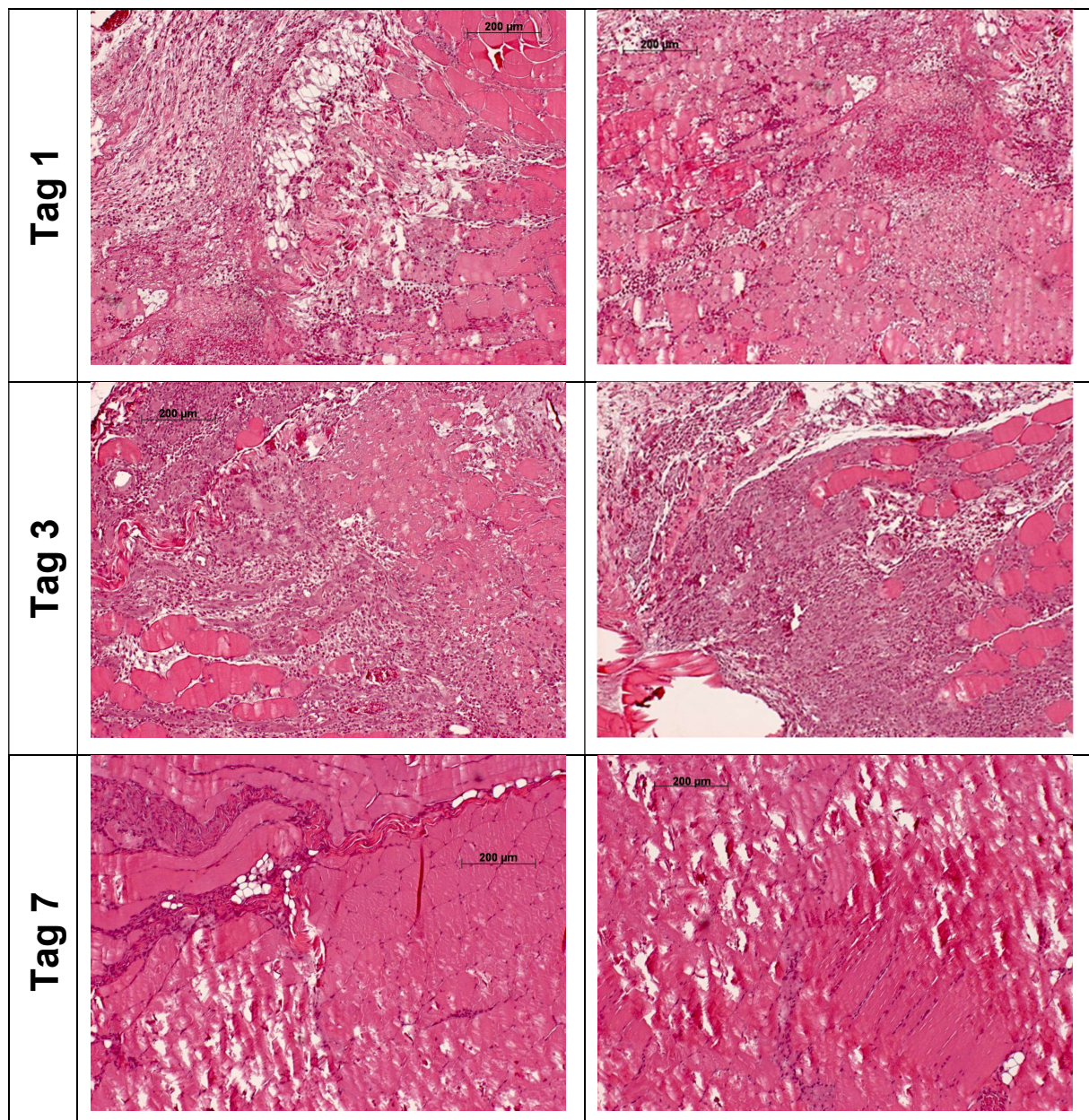


Abbildung 19: Actovegin und Traumeel-Gruppe (Gruppe 4), 10-fache Vergrößerung

Die hier dargestellten Ergebnisse sind die der Gruppe 4. Diese Gruppe erhielt kombinierte Injektionen mit Actovegin und Traumeel. Am ersten Tag nach Zufügen der Läsion sieht man auch in diesen Präparaten ein flächiges Ödem, Leukozyteneinwanderung und zahlreiche Nekrosen. Außerdem sind wie in den anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt auch kleinere Einblutungen zu erkennen.

An Tag 3 nach Operation zeigen sich die nekrotischen Bereiche leicht rückläufig. Auch das Ödem hat sich etwas zurückgebildet. Eine deutliche Infiltration mit Leukozyten ist noch vorhanden, erscheint aber geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ohne Injektionen. Nur in dieser Gruppe ist eine ab dem 3. Tag erkennbare Neovaskularisation vorhanden. Kleinere Gefäße mit Endothelzellen sind bereits erkennbar.

In den Präparaten des 7. Tages nach Setzen der Läsion ist das Gewebe zwar noch ödematös, aber es ist eine rückläufige Tendenz im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten erkennbar. Im Läsionsbereich lässt sich noch eine kleine Zone mit nekrotischem Zellmaterial erkennen. Des Weiteren finden sich noch einige Leukozyten sowie eine beginnende kleinflächige Fibrosierung im Apex des Läsionsgebiets. Die bereits an Tag 3 erkennbare Neovaskularisation zeigt sich an Tag 7 noch deutlicher. Kleinere Blutgefäße sprießen in das Läsionsareal ein.

Die mikroskopische Betrachtung legt den Schluss nahe, dass die Reorganisation und Neovaskularisation in diesem Präparat insgesamt am weitesten vorangeschritten ist zum Zeitpunkt des 7. Tags nach Setzen der Läsion.

4.2.5 Kontrollgruppe ohne Injektionstherapie (Gruppe 5)

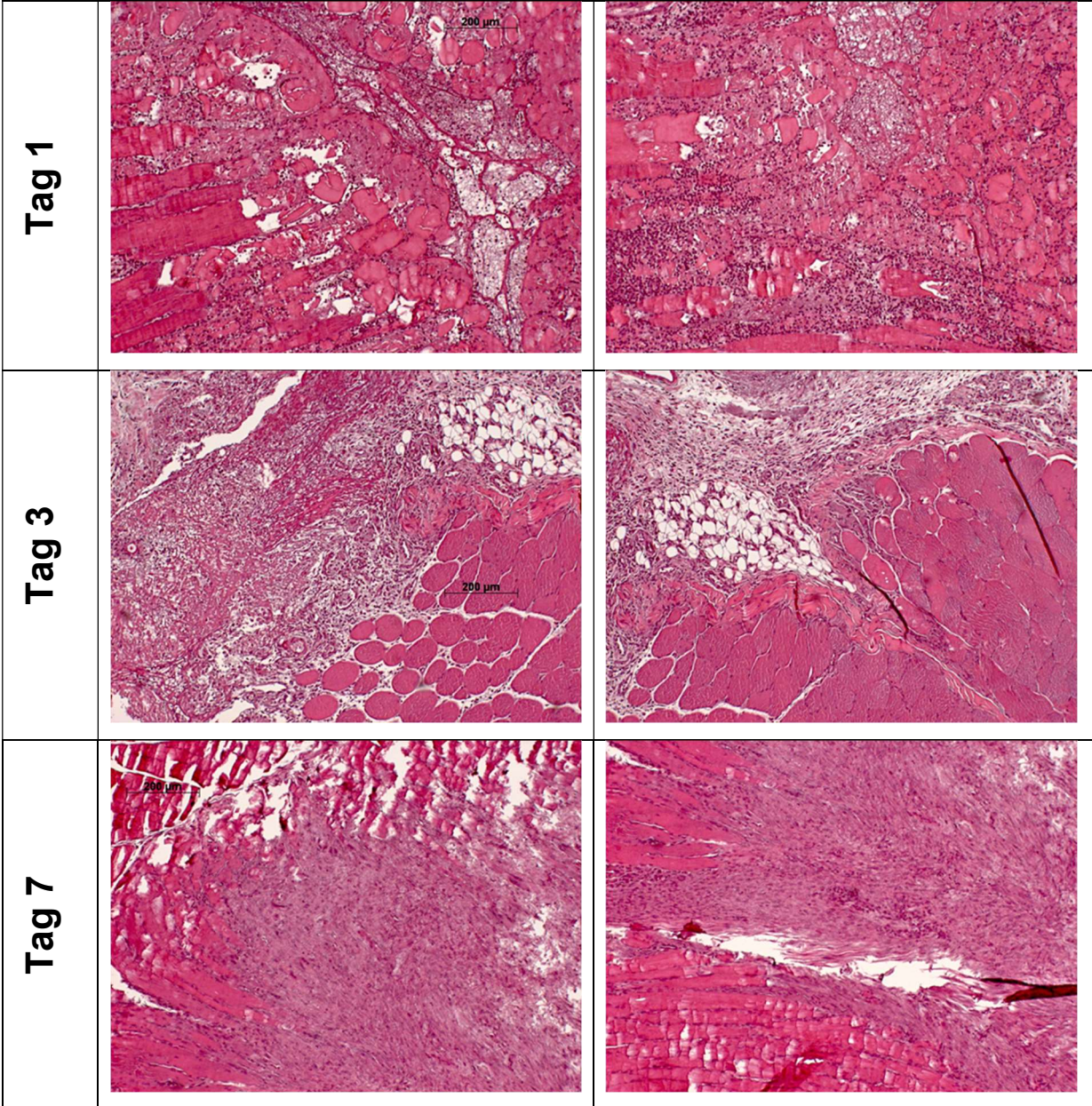


Abbildung 20: Kontrollgruppe (Gruppe 5) ohne Injektionen, 10-fache Vergrößerung

Die hier präsentierten Schnitte stammen von Gruppe 5. Diese erhielt keine Injektionen, sondern wird als Kontrollgruppe für eine physiologische Heilung herangezogen. Am Tag 1 nach Setzen der Muskelläsionen zeigen die histologischen Schnitte eine vollständige Zerstörung der Muskelgewebsarchitektur. In der Läsion sind flächig eingewanderte Leukozyten erkennbar. Insgesamt erscheint das Gewebe aufgelockert. Die einzelnen Muskelfasern erscheinen ödematös. Außerdem erkennt man viele nekrotische Bereiche. Im gesamten Präparat sind an unterschiedlichsten Stellen Einblutungen zu erkennen.

An Tag 3 sind die Einblutungen und das Ödem im Vergleich zum ersten Tag nach Setzen der Läsion rückläufig. Die Gesamtarchitektur des Muskelgewebes ist wieder besser erkennbar. Im gesamten Präparat lassen sich viele Leukozyten erkennen. Eine Randfibrosierung an den Kanten der Läsion hat begonnen.

Am Tag 7 nach dem Eingriff wurde das perimuskuläre Ödem weitestgehend aufgelöst. Lediglich die dargestellten Muskelfasern sind noch in sich ödematös aufgelockert. Man erkennt noch deutlich ein großes Nekroseareal, welches noch keine optischen Anzeichen der Reorganisation zeigt. Lediglich die Fibrosierung schreitet im Läsionsareal im Vergleich zu Tag 3 voran. Die Gewebsorganisation ist zwar erkennbar, jedoch ist das verbliebene Areal, welches die Läsion erzeugt hat, nach wie vor sehr groß.

#### 4.2.6 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

In der folgenden Tabelle sind die histologischen Ergebnisse anhand der Beurteilungskriterien (Blutung, Leukozyteneinwanderung, Nekrose, Ödem, Fibrose und Neovasularisation) zusammengefasst. Die einzelnen Kriterien wurden in einer Skala von + (geringes Vorkommen) bis ++++ (deutliches Vorkommen) dargestellt. Eine genaue Beschreibung sowie die Bebilderung finden sich in den jeweiligen Unterkapiteln der einzelnen Gruppen.

Gruppe	Tag 1						Tag 3						
	B	L	N	Ö	F	Neo	B	L	N	Ö	F	Neo	
1	+	+++	++	+++	/		+	+++	+++	+++	/		
2	++	+++	++	+++	/		+	++++	+++	++	/		
3	++	+++	++	+++	/		+	+++	+++	++++	+		
4	++	++	++	+++	/		++	++	++	++	/	NEO	
5	++	+++	++	++++	/		+	+++	+++	+++	/		
	Tag 7												
	B	L	N	Ö	F	Neo							
1	/	+	+	++	++								
2	/	++	++	++	+								
3	/	+	+++	+++	+++								
4	++	+	++	++	+	NEO							
5	/	++	+++	++	++								

**Tabelle 24: Übersicht der histologischen Ergebnisse. (B: Blutung, L: Leukozyten, N: Nekrose, Ö: Ödem, F: Fibrose NEO: Neovaskularisation; Gruppenaufteilung: 1: NaCl, 2: Actovegin, 3: Traumeel, 4: Actovegin und Traumeel, 5: keine Injektionen)**

Alle folgenden Vergleiche in diesem Abschnitt beziehen sich, sofern nicht anders beschrieben, auf die Kontrollgruppe (Gruppe 5), die keine Injektionen erhielt.

Gruppe 1, die eine Injektionstherapie mit physiologischer NaCl-Lösung erhielt, zeigte an Tag 1 im Vergleich kaum Unterschiede. Ebenso an Tag 3 nach Setzen der Läsion dominierten zahlreiche Leukozyten, große Nekroseareale sowie ein ausgeprägtes Ödem das Bild. Am 7. Tag nach Intervention zeigte sich jedoch eine geringere, noch bestehende Nekrose sowie eine leicht verminderte Leukozytenzahl.

Gruppe 2 erhielt eine Monotherapie mit Actovegin. Hier lassen sich am ersten Tag ebenfalls kaum Unterschiede zur physiologischen Heilung beobachten. An Tag 3 postoperativ zeigt sich eine etwas stärkere Leukozyteninvasion bei etwas geringerem Ödem. Am letzten histologischen Beobachtungstag lassen sich eine etwas geringere Fibrosebildung und eine nun leicht geringere Leukozytenmenge erkennen.

Gruppe 3, welche nur Traumeel injiziert bekam, zeigte am ersten Tag keinen bedeutenden Unterschied zur Kontrollgruppe. An Tag 3 postoperativ erkennt man

sogar eine stärkere Ödembildung sowie eine bereits beginnende Fibrose. Diese blieben auch am Tag 7 beobachtbar. Insgesamt scheint es, dass diese Gruppe an Tag 7 das schlechteste Ergebnis aufweist. In der histologischen Betrachtung scheint es, als würde Traumeel die Fibrosierung nach einer Verletzung begünstigen.

Gruppe 4 erhielt Actovegin und Traumeel in Kombination. Unter diesem Einfluss zeigten sich am ersten postoperativen Tag eine geringere Leukozyteneinwanderung sowie Ödembildung. Auch im weiteren Verlauf waren diese Tendenzen zu beobachten. Ab Tag 3 postoperativ ließ sich bereits eine Neovaskularisation darstellen und war an Tag 7 deutlich ausgeprägt. Das war so in keiner anderen untersuchten Gruppe zu erkennen. Des Weiteren wirkten sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 Leukozyteneinwanderung, Nekrosegröße und Ödembildung weniger stark ausgeprägt als in der Kontrollgruppe.

## 5 Diskussion

Es ist der 24.10.2017. Die Fußballmannschaft des 1. FSV Mainz 05 steht im Pokalspiel gegen Holstein-Kiel. Alle Spieler haben nur ein Ziel vor Augen: den Sieg. In der 38. Minute gelingt Holstein-Kiel ein direkter Schuss auf das Mainzer Tor. Torwart René Adler setzt zu einer Parade an. Er springt ab und hält den Ball auf. Danach fällt er auf den Rasen und steht nicht mehr auf. Adler windet sich vor Schmerzen liegend am Boden und hält sich den rechten Oberschenkel. Er kann nicht mehr weiterspielen und wird noch vom Spielfeld aus ins Krankenhaus gebracht. Für den Stammtorwart der Mainzer Mannschaft sieht es nicht gut aus. „Adler habe sich eine Verletzung der Muskulatur des rechten, hinteren Oberschenkels zugezogen und werde für längere Zeit nicht spielen können“, verkündet sein Trainer am nächsten Tag. Doch was hat diese Geschichte mit den 150 auch am Oberschenkel verletzten Ratten zu tun, um welche sich der Versuchsaufbau dieser Doktorarbeit dreht?

Verletzungen von der Art, wie sie Adler erlitten hat, sind langwierig und können kostspielig für Verein und Athlet sein. Einen einheitlichen und Erfolg versprechenden Therapieansatz gibt es derzeit noch nicht. Es gibt viele unterschiedliche Therapieansätze für intramuskuläre Injektionen nach einer Muskelverletzung [40, 41]. Eine eindeutige Empfehlung gibt es aber nicht. Aktuelle Studien relativieren beziehungsweise negativieren sogar die Effekte für bis dato erfolgversprechende Substanzen [42-44].

Zu Beginn dieser Studie musste ein geeignetes Tiermodell etabliert werden, welches in vivo einen Muskelbündelriss, wie er im Leistungssport häufig vorkommt, simuliert. Um zu untersuchen, ob die Therapie mit Actovegin und Traumeel eine Perspektive für Adler und alle zukünftig verletzten Sportler birgt, muss eine solche Verletzung möglichst standardisiert und analog im Tiermodell simuliert werden. Actovegin und Traumeel werden seit Jahren im Profisport angewendet [8, 37, 45]. Der gewählte Versuchsaufbau lehnt sich an bereits bestehende Modelle für die Erzeugung einer Muskelverletzung bei Ratten und Kleintieren an, wurde jedoch teilweise modifiziert und an die Anforderungen dieser Untersuchung im Speziellen angepasst.

Die histologischen und PCR-Ergebnisse wurden hinsichtlich der Beeinflussung von Injektionen mit Actovegin und/oder Traumeel auf die Muskelheilung nach einem Muskelbündelriss ausgewertet.



## 5.1 Etablierung des Tiermodells

Für simulierte Muskelverletzungen wurden bis dato unterschiedliche Kleintiere wie Mäuse [46] oder Kaninchen [47] eingesetzt. Für die Versuche, die dieser Dissertation zugrunde liegen, wurden Ratten gewählt. Da Ratten verhältnismäßig größer sind als Mäuse, ist auch der M. rectus des M. quadriceps femoris größer. Das macht die standardisierte Durchführung der Versuche einfacher und ermöglicht die ausreichende Gewinnung von Gewebe. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche an größeren Tieren durchzuführen, ist bei einer lediglich orientierenden Untersuchung unverhältnismäßig. Außerdem gibt es zahlreiche, bereits etablierte Modelle für Muskelverletzungen an Ratten wie das Modell nach Nakasa und Ishikawa [48] und somit ein breites Erfahrungsspektrum. Nakasa und Ishikawa haben in ihrem Tiermodell eine keilförmige, dreidimensionale Läsion in der Größe 6mmx4mmx5mm mit einem Skalpell am Musculus tibialis anterior gesetzt. Darauf folgte eine einmalige Injektion von miRNA oder Kontroll-siRNA.

Muskelverletzungen wurden nicht nur von Nakasa und Ishikawa simuliert. Garrett und Seaber beispielsweise untersuchten die Heilung von Muskeln nach Lazeration und Naht. Sie setzten in ihren Versuchen die Läsion am Musculus extensor digitorum longus von Kaninchen. Die Läsion erfolgte mittig im Muskelbauch, etwa 60% der Länge vom proximalen Ursprung des Muskels entfernt, was sehr nah am Nerveninnervationspunkt war. Garrett und Seaber unterteilten die Tiere in zwei Gruppen. Bei einer wurde mit dem Skalpell eine komplette Lazeration durchgeführt, bei der anderen eine partielle Lazeration von 50-75% [47].

Menetrey und Kasemkijwattana orientierten sich bei ihren Versuchen an diesem Modell, allerdings setzten sie nur eine partielle Lazeration bei Mäusen bei 60% der Gesamtlänge mit einer Breite von 75% der Gesamtbreite des Muskels und circa 50% der Gesamtdicke. Der operierte Muskel war der Musculus gastrocnemius. Im Anschluss an die Läsion nähten sie diese und injizierten Wachstumsfaktoren in die simulierte Verletzung [46, 49].

Für den Leistungssport sind komplette Lazerationen wie auch Teillazerationen als direkte Muskelverletzungen zwar relevant, aber deutlich seltener als Muskelbündelrisse, welche zu den indirekten Muskelverletzungen zählen und einen Großteil der Muskelverletzungen im Leistungssport ausmachen [50]. Außerdem unterscheidet sich das Therapieschema bei einem kompletten Muskelabriss von dem bei einem Muskelbündelriss. Deshalb sind die Modelle von Garrett und Seaber [47],

sowie von Menetrey und Kasemkijwattana [46, 49] nicht mit unserer Studie unmittelbar vergleichbar.

In unseren Versuchen, sollte ein in Größe, Ausprägung und Lokalisation standardisierter Muskelbündelriss simuliert werden, weshalb eine geringere Läsionsgröße, als in eben genannten Beispielen gewählt wurde. Die Lazeration erfolgte am M. rectus femoris des M. quadriceps femoris, da er besser zugänglich, größer und beim Leistungssportler, insbesondere beim Profifußballer, deutlich häufiger verletzt ist [51, 52].

Das Setzen der Läsion erfolgte bei Nakasa und Ishikawa [48] analog zu unserem Modell mit Hilfe eines Skalpell, welches eine Läsion im Muskel erzeugte. Eine genauere Technik wurde von den genannten Autoren nicht erläutert. Da unterschiedlich große Läsionen natürlich auch zeitlich unterschiedlich heilen, lag unser Fokus darauf möglichst standardisiert und zur Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen eine einheitliche Größe der Läsion zu erzeugen. In unserer Studie wurde jeweils ein 11-er Skalpell 3mm von der Spitze entfernt markiert und bei der Lazeration des Muskels bis exakt zu dieser Markierung in das Muskelgewebe versenkt. Somit entstand eine keilförmige Läsion, deren Dimension in die Breite und Tiefe stets gleich groß war. Auch wollten wir bei unseren gesetzten Läsionen keinen Spalt zwischen den Muskelstümpfen erzeugen, wie es bei Nakasa und Ishikawa der Fall war [48], da ein Muskelbündelriss in der Praxis am häufigsten aus einer inneren Ursache heraus entsteht und es hierbei nur selten zur Unterbrechung der Muskelfaszie kommt und umgebende Muskelbündel meist intakt bleiben [53].

Nach Setzen der Läsion sollten, wie im Therapieregime nach Müller-Wohlfahrt verankert, bis zu drei Injektionen der verwendeten Agentien durchgeführt werden. In der Literatur finden sich, beispielsweise bei Nakasa und Ishikawa [48], Modelle für einmalig postoperative therapeutische Injektionen. Daher musste eine Möglichkeit geschaffen werden, die Läsion ohne Eröffnen der Hautnaht möglichst genau zu lokalisieren. Theoretisch hätte für jede erneute Injektion die Naht geöffnet werden können, um unter Sicht die intramuskuläre Injektion vorzunehmen. Es wäre möglicherweise eine präzisere Lokalisation möglich gewesen, jedoch birgt jede erneute Operation auch die Gefahr, unsere Ergebnisse zu verfälschen. Es sei in diesem Zusammenhang auch erwähnt, dass jede Operation für die Tiere Stress und erneute Schmerzen bedeutet hätte. Des Weiteren kann ohne ein erneutes Öffnen der Hautnaht die mutmaßliche Rate der Wundinfektionen gesenkt werden. Innerhalb unserer Versuche trat keine postoperative Wundinfektion auf.

Wir wählten für die Landmarke zum Wiederauffinden der Läsion einen dicken, dicht proximal der Läsion sitzenden Knoten. Dieser ließ sich durch die Haut problemlos tasten, und bei gleicher Beinstellung wie intraoperativ konnte die Injektion auf einer gedachten Verbindungslinie zwischen Knoten und Patella knapp distal des tastbaren Knotens erfolgen. Außerdem konnte durch dieses Verfahren auf eine Allgemeinanästhesie zugunsten einer Kurznarkose durch schnell an- und abflutendes Isofluran verzichtet werden und somit auf die geringstmögliche Dauer beschränkt werden. Contreras-Munoz et al. untersuchten in einem Rattenmodell den Einfluss von Training und PRP-Injektionen auf die Muskelheilung nach einer Verletzung. Auch sie führten in ihrem Tiermodell postoperative Injektionen durch. Die Läsion wurde in den Musculus gastrocnemius mittels einer 18 Gauge starken Biopsienadel transversal gesetzt. Für folgende Injektionen wurde die Läsionsstelle mittels Ultraschallsonde aufgesucht [54]. Dies ist zwar per se weniger invasiv als das Einbringen einer Fadenmarkierung, jedoch bringt Letztere unserer Meinung nach mehrere Vorteile. Durch ein mögliches generalisiertes Ödem nach Läsion und Injektionen ist es denkbar, dass die kleine Läsionsstelle mittels Ultraschalls nicht präzise lokalisiert werden kann. Außerdem ermöglicht die Fadenmarkierung ein genaueres Auffinden des Läsionsbereich im Rahmen der Anfertigung der histologischen Schnitte, da strukturelle Muskelschäden sonographisch oft schon nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar und sichtbar sind [55].

Das Injektionsvolumen musste an die technischen Möglichkeiten angepasst werden. Das auf ein Rattengewicht von etwa 350 Gramm adaptierte Dosisvolumen von 8,5 µl wurde mittels physiologischer 0,9%-iger NaCl-Lösung auf 100 µl erweitert, da eine Injektion von 8,5µl durch das kleine Volumen sehr störanfällig ist, beispielsweise durch Rückstände in Spritze oder Kanüle. Mögliche Bedenken, dass der Muskel durch das im Vergleich doch große Volumen geschädigt wird, konnten rein nach Sichtung der histologischen Schnitte entkräftet werden. In diesen fanden sich keinerlei Anhaltspunkte hierfür.

Um eine interindividuelle Variation als mögliche Fehlerquelle in der Beurteilung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden sämtliche Operationen und die folgenden Injektionen stets von ein und derselben Person ausgeführt. Dies verhindert interpersonelle Abweichung aufgrund einer veränderten Beinhaltung, beispielsweise wegen einer unterschiedlichen Handgröße bei unterschiedlichen Operateuren.

Das in dieser Arbeit entwickelte Tiermodell hat sich als geeignet für unsere Fragestellung erwiesen. In den histologischen Untersuchungen konnten die

zugefügten Läsionen mikroskopisch eindeutig dargestellt werden. Die Komplikations- bzw. Mortalitätsrate in der Versuchsreihe war insgesamt mit 0,02% (3/150) niedrig und nach der retrospektiven Aufarbeitung durch keine der Präventivmaßnahmen kalkulierbar und somit vermeidbar.

Nach Prellung und Lazeration verläuft die Muskelheilung weitgehend identisch. Egal welche Art von Trauma der Verletzung zu Grunde liegt, solange ein Kontakt zwischen einzelnen Muskelfasern zügig wiederhergestellt wird und die Lücke nicht zu groß bleibt, werden die einzelnen Phasen der Heilung simultan durchlaufen [56]. Somit kann dieses Tiermodell, welches eine Lazerationsverletzung zeigt, durchaus repräsentativ für andere Verletzungstypen sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das somit verifizierte Ratten-Tiermodell es ermöglicht, Therapeutika an einer standardisierten strukturellen Muskelverletzung zu untersuchen.

## 5.2 In-vivo-Versuche

Die Myosinexpression ist bei Monotherapie mit Actovegin sowie bei der Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert. Eine gesteigerte Myosinsynthese ist ein Marker für Muskelregeneration. Dies bekräftigt eine Studie von Schiaffino et al., welche in einem Rattenmodell zeigte, dass das Myosin-heavy chain 1-Gen in sich regenerierenden Muskelfasern insbesondere in den ersten Tagen der Heilung gesteigert exprimiert ist [57]. Eine Steigerung der Myosinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Injektionstherapie in der frühen Heilung deutet also auf einen positiven Einfluss von Actovegin und Traumeel als Kombinationsbehandlung auf die Muskelheilung hin. Auch Actovegin als Monotherapie zeigt eine positive Beeinflussung.

In Gruppe 4, welche beide untersuchten Substanzen erhielt, ließ sich an Tag 1 und 7 eine gesteigerte NCAM1-Expression darstellen. NCAM1 ist, mit einigen anderen Markern, ein Oberflächenantigen von Satellitenzellen und Myoblasten [27]. Eine erhöhte Expression deutet auch hier auf einen positiven Effekt auf die Muskelregeneration durch eine Kombinationstherapie von Actovegin und Traumeel hin.

Pax7, welcher ein Marker für die Satellitenzellaktivität in Muskeln darstellt [21, 58], ist in der Gruppe, die mit Actovegin und Traumeel behandelt wurde, erhöht exprimiert. Fisher et al. zeigten, dass Satellitenzellen gehäuft in regenerierenden Arealen nach Verletzung auftreten und somit ein Wegweiser für die Heilung sind [59]. Dass bei Kombinationsbehandlung an Tag 1 und 7 diese Expressionssteigerung gesteigert ist, deutet ebenso auf einen pro-myogenen Effekt dieser Therapie hin.

Aus den Ergebnissen der PCR lautet die Schlussfolgerung, dass Actovegin in Monotherapie die Myosinexpression als unverzichtbarer Baustein für Muskelgewebe steigert. Die Kombinationstherapie aus Actovegin und Traumeel hingegen scheint sowohl die Myosinsynthese, als auch die Aktivität der Satellitenzellen positiv zu beeinflussen und somit die Muskelheilung nach einer Läsion zu fördern.

Interessant ist auch, dass eine Injektionstherapie mit NaCl ohne zugesetzten Wirkstoff sogar einen Nachteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigt. Hier sind alle Marker zu fast allen Zeitpunkten statistisch signifikant vermindert exprimiert. Die Muskelheilung scheint schlechter zu verlaufen als ohne Therapie. Eine in-vivo-Untersuchung von Graven-Nielsen hat gezeigt, dass die intramuskuläre Injektion von isotoner Kochsalzlösung zu einer intramuskulären Druckerhöhung führt, da die Lösung

sich im Muskelgewebe ansammelt [60]. Möglicherweise werden hierbei die heilungsfördernden Faktoren verdünnt und das Muskelgewebe durch zusätzlichen Druck geschädigt.

In der mikroskopischen Betrachtung der Schnittbilder zeigten sich an Tag 1, welcher die Entzündungsphase darstellt, keine relevanten, sichtbaren Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Entzündungsreaktion nach einer Muskelfaserverletzung lässt sich also durch die unterschiedlichen Agentien mikroskopisch nicht beeinflussen.

Am dritten Tag nach Läsion, welcher die frühe Regenerationsphase darstellt, zeigte sich in Gruppe 4 eine Neovaskularisation in den Schnittbildern. Diese ist sehr bedeutsam für die unterschiedlichen Endpunkte der Heilung. Mit einer Neovaskularisation kann neues, vitales Muskelgewebe gebildet werden. Sie kann als Ausdruck einer wirklichen Gewebeneubildung im Sinne einer Muskelheilung interpretiert werden. Eine zu beobachtende Gefäßneubildung dient nicht nur der Gewebsoxygenierung und Nährstoffversorgung, sondern hat auch durch den direkten Kontakt von Endothelzellen und Satellitenzellen pro-myogene Effekte [61].

Am letzten untersuchten Tag (Tag 7), welcher den Übergang von der Regenerationsphase hin zur Remodelling-/Fibrosephase markiert, zeigen sich erneut positive Ergebnisse für Gruppe 2 (Actovegin-Monotherapie) und Gruppe 4 (Kombinationstherapie Actovegin & Traumeel). Bei beiden Gruppen ist die Fibrosebildung geringer als bei den anderen Gruppen. Die bereits an Tag 3 beobachtbare Neovaskularisation geschieht weiter.

Da dieser positive Effekt nur in den beiden Gruppen, welche eine Actovegin-Therapie erhielten (Gruppe 2 und 4) nachgewiesen werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass Actovegin für die beobachteten Phänomene als Schlüsselsubstanz verantwortlich ist. Zwar bekam Gruppe 4 auch Traumeel in Kombination, allerdings gab es unter der Verwendung von Traumeel als Monotherapie (Gruppe 3) diese Effekte nicht.

Dass Actovegin die Muskelzellproliferation verbessert, zeigte auch eine in-vitro-Studie von Reichl et al. Sie kultivierten C2C12-Myoblasten in Medien mit unterschiedlichen Actovegin-Konzentrationen. In der Folge wurden der Proliferationsmarker Ki67 und schwere Myosinketten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Actovegin erhöhte Ki67 sowie die Myosinkettenexpression [45].

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da auch hier in der RT-PCR ein positiver Einfluss von Actovegin auf die Myosinexpression nachgewiesen werden

kann, für Traumeel als Monotherapie jedoch nicht. Eine mögliche Erklärung liefert Reichl in seiner Arbeit, in der er gezeigt hat, dass im Vergleich zum menschlichen Serum eines Erwachsenen in Actovegin die Konzentration einiger Stoffe höher und einiger geringer ist [45]. Möglicherweise sind gerade diese Konzentrationsunterschiede entscheidend für eine positive Beeinflussung der Muskelheilung.

Für Traumeel als Monopräparat konnte mikroskopisch keine positive Wirkung auf Muskelregeneration oder Angiogeneese nachgewiesen werden. In der RT-PCR zeigte Gruppe 3 lediglich an Tag 3 eine gesteigerte Myosinexpression (4-fach) und an Tag 7 eine gesteigerte Pax7-Expression (1,5 fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist allerdings nicht als statistisch signifikant zu werten. An allen anderen untersuchten Endpunkten zeigten sich sogar geringere Expressionswerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich sogar eine negative Auswirkung der Therapie mit Traumeel auf die Muskelregeneration. Hier war - sowohl im Vergleich zur physiologischen Heilung, als auch zu Gruppe 1 - eine früher und heftiger einsetzende Fibrose beobachtbar. Muders et al. untersuchten in einer doppelt verblindeten randomisierten klinischen Studie den Einfluss von Traumeel-Tabletten auf die inflammatorische Antwort nach forcierter, wiederholter körperlicher Belastung auf einem Fahrrad. Als laborchemische Marker dienten hierbei IL-1ra, IL-6, sowie weitere immunologische Marker und Marker für Muskelschädigung. Sie beschrieben in ihrer Arbeit einen pro-inflammatorischen Effekt von Traumeel [62]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass Traumeel keinen positiven Einfluss auf die Muskelheilung hat und möglicherweise durch pro-inflammatorische Zytokine die Heilung nach einem Muskelschaden zur Fibrosebildung hin beeinflusst.

Die Kombination aus Actovegin und Traumeel erbrachte die besten Ergebnisse im Hinblick auf Muskelregeneration und auf Angiogeneese. Möglicherweise unterstützt Traumeel die Wirkung von Actovegin und die beiden Mittel ergänzen sich hinsichtlich ihrer Wirkung. Dies ist ein interessanter Ansatz für eine weitere Untersuchung. Eine Metaanalyse hinsichtlich der Toxizität von Injektionstherapeutika nach Muskelverletzungen erbrachte keinen Hinweis, dass Actovegin oder Traumeel zytotoxisch nach intramuskulärer Injektion wirken [42].

Von einer rein qualitativen Analyse der histologischen Ergebnisse kann nur eine Wirkungstendenz abgelesen werden. Um eine detailliertere Aussage treffen zu

können, wäre es notwendig, die vorliegenden histologischen Präparate auch quantitativ auszuwerten. Dazu könnte man eine Färbung, beispielsweise die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung, vornehmen, die fibrotisches Narbengewebe von Muskelgewebe deutlicher farblich unterscheidet. Anhand der Farben könnte das Narbengewebe vom Muskelgewebe genau abgegrenzt werden und quantitativ ausgewertet werden. Diese Untersuchungen sind im Anschluss an diese Arbeit im Rahmen einer weiteren Dissertationsarbeit geplant.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein kleiner Teil der Faktoren untersucht, welche an dem komplexen Ablauf der Muskelheilung und -regeneration beteiligt sind. Da unter der Kombinationsbehandlung mit Actovegin und Traumeel eine Neovaskularisation beobachtet werden konnte, wären weitere Untersuchungen mit Analyse der Expression von pro-angiogenen Faktoren sinnvoll, um die Ergebnisse differenzierter beurteilen zu können.

Außerdem zeigen Ratten eine deutlich beschleunigte Heilung im Vergleich zum Menschen. Bereits 7 Tage nach einer Läsion zeigten sich nur noch geringe strukturelle Unterschiede im Vergleich zu einem unverletzten Muskel, weshalb Tag 7 nach der Läsion ein guter Endpunkt im Rattenmodell ist, um Unterschiede in der Heilung nach Ablauf der einzelnen Regenerationsphasen zu beurteilen [55]. In dieser Arbeit wird eine auf den Menschen ausgerichtete Therapie auf eine andere Spezies übertragen. Es sollten weitere klinische Studien durchgeführt werden, die die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse am Menschen prüfen. Hiermit könnte die klinische Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Actovegin und Traumeel weiter herausgearbeitet werden, um eine eindeutigere Empfehlung zur Heilungsbeschleunigung nach einer Muskelverletzung im Profisport zu treffen.

Außerdem wird in dieser Arbeit lediglich die Veränderung der Genexpression, sowie die mikroskopische Veränderung der Muskelarchitektur unter Einfluss der unterschiedlichen Therapeutika untersucht. In wie weit diese Einflüsse einen relevanten und messbaren Effekt auf die Muskelfunktion, Muskelkraft und die Rate an erneuten Verletzungen an der betroffenen Stelle haben, muss weiter klinisch untersucht werden.



## 6 Zusammenfassung

Muskelverletzungen gehören im Leistungssport zu den häufigsten Verletzungen und sind somit hauptverantwortlich für Trainings- und Wettkampfpausen. Bis dato gibt es keinen allgemeingültigen Konsens bezüglich einer medikamentösen Therapie. In der Sportmedizin werden Actovegin und Traumeel S trotz fehlender Evidenz seit Jahren als Injektionstherapie in der Behandlung von strukturellen Muskelverletzungen angewendet. Aktuell basiert somit die Anwendungsempfehlung auf der Erfahrung von Anwendern statt auf wissenschaftlich fundiertem Wissen.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Tiermodell für eine strukturelle Muskelverletzung etabliert und anhand dessen die Wirkung von Actovegin und Traumeel auf die Muskelheilung untersucht.

Es ließ sich mittels RT-PCR belegen, dass Actovegin in Kombination mit Traumeel positiven Einfluss auf die Aktivität der Gene von Myosin, Pax7 und CD56 nimmt. Actovegin als Monotherapie scheint ebenso die Myosinbildung zu begünstigen. Außerdem ergaben histologische Untersuchungen den Nachweis, dass die Anwendung von Actovegin und Traumeel in Kombination sich günstig auf die Neovaskularisation der verletzten Muskelregion auswirkt und im Vergleich zur physiologischen Heilung die Narbenbildung reduziert sowie eine echte Muskelreorganisation begünstigt. Auch für Actovegin in Monotherapie zeigten sich positive Ergebnisse.

Somit belegt diese in-vivo-Studie am Rattenmodell die Arbeitshypothese, dass die klinische Anwendung von Actovegin, ob als Monotherapie oder in Kombination mit Traumeel, tatsächlich eine sinnvolle Therapiealternative zur Behandlung von strukturellen Muskelverletzungen ist.

Die Absicht dieser Arbeit war eine Wirkungstendenz der beiden Medikamente herauszuarbeiten und ein hierfür geeignetes Tiermodell zu entwickeln. Im hier dargestellten Tiermodell konnte ein Überblick über die Beeinflussung der Heilung sowie eine Darstellung der Verletzung ermöglicht werden. Dazu zeigte diese Arbeit, dass Actovegin ein zukunftssträchtiges Medikament im Bereich der Muskelverletzungen sein kann und es ein durchaus lohnenswerter Ansatz ist, die genauere Wirkung zu untersuchen. Mit der Kombination von Actovegin und Traumeel könnte in Zukunft eine bessere Therapie von Muskelverletzungen im Profisport ermöglicht werden, da es offenbar die Muskelheilung über eine verbesserte Neovaskularisation positiv beeinflusst.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ekstrand, J., M. Hagglund, and M. Walden, *Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer)*. Am J Sports Med, 2011. **39**(6): p. 1226-32.
2. Müller-Wohlfahrt, H.-W., *Konservative Therapie-Muskelverletzungen. Muskeln und Sehnen. Diagnostik und Therapie von Muskelzerrungen und Muskelfaserrissen*. Sport-Orthopädie-Sport-Traumatologie, April 2001. **17**(1): p. 17-20.
3. Gille, J., et al., *Infiltrationsbehandlungen bei akuten Muskelverletzungen: Sinn oder Unsinn?* Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 2013. **64**: p. 98-102.
4. Harmon, K.G., *Muscle injuries and PRP: what does the science say?* Br J Sports Med, 2010. **44**(9): p. 616-7.
5. Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, *Muscle injuries and repair: current trends in research*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84**(5): p. 822-32.
6. Hotfield, T., et al., *Konservative Therapie von Muskelverletzungen – Beurteilung aktueller Behandlungskonzepte*. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie, 2016. **154**(03): p. 245-253.
7. Mueller-Wohlfahrt, H.W., et al., *Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement*. Br J Sports Med, 2013. **47**(6): p. 342-50.
8. Müller-Wohlfahrt, H.-W.U., P.; Hänsel, L., *Muskelverletzungen im Sport*. Vol. 3. 2018: Thieme. 488.
9. Schiebler, T. and H. Korf, *Anatomie*. 2007, Darmstadt: Steinkopff.
10. Klinke, R. and R. Baumann, *Physiologie*. 6. vollständig überarbeitete Auflage ed. 2010, Stuttgart: Thieme.
11. Lang, F. and P. Lang, *Basiswissen Physiologie*. 2, vollständig neu bearbeitete und aktualisierte Auflage ed. 2007, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
12. Pape, H., R. Klinke, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2010, Stuttgart: Thieme.
13. Schünke, M.S., E; Schumacher, U; et al., *PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Vol. 5., vollständig überarbeitete Auflage. 2018: Thieme.
14. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Phys Ther, 2001. **81**(11): p. 1810-6.
15. Pette, D. and R.S. Staron, *Transitions of muscle fiber phenotypic profiles*. Histochem Cell Biol, 2001. **115**(5): p. 359-72.
16. Slavotinek, J.P., G.M. Verrall, and G.T. Fon, *Hamstring injury in athletes: using MR imaging measurements to compare extent of muscle injury with amount of time lost from competition*. AJR Am J Roentgenol, 2002. **179**(6): p. 1621-8.
17. Connell, D.A., et al., *Longitudinal study comparing sonographic and MRI assessments of acute and healing hamstring injuries*. AJR Am J Roentgenol, 2004. **183**(4): p. 975-84.
18. Ryan, A., *Quadriceps strain, rupture and charlie horse*. Med Sci Sports. **1**: p. 106-111.
19. Chan, O., et al., *Acute muscle strain injuries: a proposed new classification system*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(11): p. 2356-62.
20. Prisk, V. and J. Huard, *Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation*. Histol Histopathol, 2003. **18**(4): p. 1243-56.
21. von Maltzahn, J., et al., *Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(41): p. 16474-9.
22. Wernig, A. and A. Irintchev, *Muskelstammzellen und Muskelregeneration*. Sport-Orthopädie-Sport-Traumatologie, April 2001. **17**(1): p. 17-20.

23. Verdijk, L.B., et al., *Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E151-7.
24. Zammit, P.S., et al., *Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers*. Exp Cell Res, 2002. **281**(1): p. 39-49.
25. Sabourin, L.A. and M.A. Rudnicki, *The molecular regulation of myogenesis*. Clin Genet, 2000. **57**(1): p. 16-25.
26. Francetic, T. and Q. Li, *Skeletal myogenesis and Myf5 activation*. Transcription, 2011. **2**(3): p. 109-114.
27. Peault, B., et al., *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 867-77.
28. Stewart, J.D., et al., *Characterization of proliferating human skeletal muscle-derived cells in vitro: differential modulation of myoblast markers by TGF-beta2*. J Cell Physiol, 2003. **196**(1): p. 70-8.
29. Liao, C.H., et al., *Ibuprofen inhibited migration of skeletal muscle cells in association with downregulation of p130cas and Crkl expressions*. Skelet Muscle, 2019. **9**(1): p. 23.
30. Guillodo, Y., et al., *Platelet-rich plasma (PRP) treatment of sports-related severe acute hamstring injuries*. Muscles Ligaments Tendons J, 2015. **5**(4): p. 284-8.
31. Engebretsen, L. and K. Steffen, *To PRP or not?* Br J Sports Med, 2010. **44**(15): p. 1071.
32. Buchmayer, F., et al., *Actovegin(R): a biological drug for more than 5 decades*. Wien Med Wochenschr, 2011. **161**(3-4): p. 80-8.
33. Lee, P., A. Kwan, and L. Nokes, *Actovegin--Cutting-edge sports medicine or "voodoo" remedy?* Curr Sports Med Rep, 2011. **10**(4): p. 186-90.
34. Obermaier-Kusser, B., et al., *Further evidence for a two-step model of glucose-transport regulation. Inositol phosphate-oligosaccharides regulate glucose-carrier activity*. Biochem J, 1989. **261**(3): p. 699-705.
35. de Groot, H., M. Brecht, and F. Machicao, *Evidence for a factor protective against hypoxic liver parenchymal cell injury in a protein-free blood extract*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1990. **68**(1): p. 125-8.
36. Lee, P., et al., *Our experience on Actovegin, is it cutting edge?* Int J Sports Med, 2011. **32**(4): p. 237-41.
37. Schneider, C., *Traumeel - an emerging option to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of acute musculoskeletal injuries*. Int J Gen Med, 2011. **4**: p. 225-34.
38. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
39. Belikan, P., et al., *Intramuscular Injection of Combined Calf Blood Compound (CFC) and Homeopathic Drug Tr14 Accelerates Muscle Regeneration In Vivo*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
40. Orchard, J.W., et al., *The early management of muscle strains in the elite athlete: best practice in a world with a limited evidence basis*. Br J Sports Med, 2008. **42**(3): p. 158-9.
41. Reurink, G., et al., *Therapeutic interventions for acute hamstring injuries: a systematic review*. Br J Sports Med, 2012. **46**(2): p. 103-9.
42. Reurink, G., et al., *Myotoxicity of injections for acute muscle injuries: a systematic review*. Sports Med, 2014. **44**(7): p. 943-56.

43. Reurink, G., et al., *Rationale, secondary outcome scores and 1-year follow-up of a randomised trial of platelet-rich plasma injections in acute hamstring muscle injury: the Dutch Hamstring Injection Therapy study*. Br J Sports Med, 2015. **49**(18): p. 1206-12.
44. Andia, I. and M. Abate, *Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(7): p. 987-99.
45. Reichl, F.X., et al., *Comprehensive Analytics of Actovegin(R) and Its Effect on Muscle Cells*. Int J Sports Med, 2017. **38**(11): p. 809-818.
46. Menetrey, J., et al., *Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model*. Am J Sports Med, 1999. **27**(2): p. 222-9.
47. Garrett, W.E., Jr., et al., *Recovery of skeletal muscle after laceration and repair*. J Hand Surg Am, 1984. **9**(5): p. 683-92.
48. Nakasa, T., et al., *Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(10): p. 2495-505.
49. Menetrey, J., et al., *Growth factors improve muscle healing in vivo*. J Bone Joint Surg Br, 2000. **82**(1): p. 131-7.
50. Ueblacker, P., H.W. Muller-Wohlfahrt, and J. Ekstrand, *Epidemiological and clinical outcome comparison of indirect ('strain') versus direct ('contusion') anterior and posterior thigh muscle injuries in male elite football players: UEFA Elite League study of 2287 thigh injuries (2001-2013)*. Br J Sports Med, 2015. **49**(22): p. 1461-5.
51. Cross, T.M., et al., *Acute quadriceps muscle strains: magnetic resonance imaging features and prognosis*. Am J Sports Med, 2004. **32**(3): p. 710-9.
52. Mendiguchia, J., et al., *Rectus femoris muscle injuries in football: a clinically relevant review of mechanisms of injury, risk factors and preventive strategies*. Br J Sports Med, 2013. **47**(6): p. 359-66.
53. Vatovec, R., Z. Kozinc, and N. Sarabon, *Exercise interventions to prevent hamstring injuries in athletes: A systematic review and meta-analysis*. Eur J Sport Sci, 2019: p. 1-13.
54. Contreras-Munoz, P., et al., *Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined*. Am J Sports Med, 2017. **45**(9): p. 2131-2141.
55. Borrione, P., et al., *Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing*. Blood Transfus, 2014. **12** Suppl 1: p. s221-8.
56. Jarvinen, T.A., et al., *Muscle injuries: biology and treatment*. Am J Sports Med, 2005. **33**(5): p. 745-64.
57. Schiaffino, S., et al., *Developmental myosins: expression patterns and functional significance*. Skelet Muscle, 2015. **5**: p. 22.
58. Zammit, P.S., et al., *Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1824-32.
59. Fisher, B.D.R., M., *An Overview of Muscle Regeneration Following Acute Injury*. Journal of Physical Therapies Science, 2006. **18**(1): p. 57-66.
60. Graven-Nielsen, T., et al., *In vivo model of muscle pain: quantification of intramuscular chemical, electrical, and pressure changes associated with saline-induced muscle pain in humans*. Pain, 1997. **69**(1-2): p. 137-43.
61. Latroche, C., et al., *Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages*. Stem Cell Reports, 2017. **9**(6): p. 2018-2033.

62. Muders, K., et al., *Effects of Traumeel (Tr14) on recovery and inflammatory immune response after repeated bouts of exercise: a double-blind RCT*. Eur J Appl Physiol, 2017. **117**(3): p. 591-605.

## 8 Anhang

### Zeitplan der Tierversuche

Tier-Nr.	Gruppe	OP-Datum & 1. Injektion	Datum der Euthanasie	2. Injektion	3. Injektion	Probenverwendung
1	NaCl	28.07.2014	04.08.2014	30.07.2014	01.08.2014	Histologischer Schnitt
2	NaCl	28.07.2014	04.08.2014	30.07.2014	01.08.2014	Histologischer Schnitt
3	NaCl	28.07.2014	04.08.2014	30.07.2014	01.08.2014	Histologischer Schnitt
4	NaCl	28.07.2014	04.08.2014	30.07.2014	01.08.2014	RNA Extraktion
5	NaCl	28.07.2014	04.08.2014	30.07.2014	01.08.2014	RNA Extraktion
6	NaCl	29.07.2014	01.08.2014	31.07.2014		Histologischer Schnitt
7	NaCl	29.07.2014	01.08.2014	31.07.2014		Histologischer Schnitt
8	NaCl	29.07.2014	01.08.2014	31.07.2014		Histologischer Schnitt
9	NaCl	29.07.2014	01.08.2014	31.07.2014		RNA Extraktion
10	NaCl	29.07.2014	01.08.2014	31.07.2014		RNA Extraktion
11	NaCl	30.07.2014	31.07.2014			Histologischer Schnitt
12	NaCl	30.07.2014	31.07.2014			Histologischer Schnitt
13	NaCl	30.07.2014	31.07.2014			Histologischer Schnitt
14	NaCl	30.07.2014	31.07.2014			RNA Extraktion
15	NaCl	30.07.2014	31.07.2014			RNA Extraktion
16	Actovegin	11.08.2014	18.08.2014	13.08.2014	15.08.2014	Histologischer Schnitt
17	Actovegin	11.08.2014	18.08.2014	13.08.2014	15.08.2014	Histologischer Schnitt
18	Actovegin	11.08.2014	18.08.2014	13.08.2014	15.08.2014	Histologischer Schnitt
19	Actovegin	11.08.2014	18.08.2014	13.08.2014	15.08.2014	RNA Extraktion
20	Actovegin	11.08.2014	18.08.2014	13.08.2014	15.08.2014	RNA Extraktion
21	Actovegin	12.08.2014	15.08.2014	14.08.2014		Histologischer Schnitt
22	Actovegin	12.08.2014	15.08.2014	14.08.2014		Histologischer Schnitt

23	Actovegin	12.08.2014	15.08.2014	14.08.2014		Histologischer Schnitt
24	Actovegin	12.08.2014	15.08.2014	14.08.2014		RNA Extraktion
25	Actovegin	12.08.2014	15.08.2014	14.08.2014		RNA Extraktion
26	Actovegin	13.08.2014	14.08.2014			Histologischer Schnitt
27	Actovegin	13.08.2014	14.08.2014			Histologischer Schnitt
28	Actovegin	13.08.2014	14.08.2014			Histologischer Schnitt
29	Actovegin	13.08.2014	14.08.2014			RNA Extraktion
30	Actovegin	13.08.2014	14.08.2014			RNA Extraktion
31	Traumeel	18.08.2014	25.08.2014	20.08.2014	22.08.2014	Histologischer Schnitt
32	Traumeel	18.08.2014	25.08.2014	20.08.2014	22.08.2014	Histologischer Schnitt
33	Traumeel	18.08.2014	25.08.2014	20.08.2014	22.08.2014	Histologischer Schnitt
34	Traumeel	18.08.2014	25.08.2014	20.08.2014	22.08.2014	RNA Extraktion
35	Traumeel	18.08.2014	25.08.2014	20.08.2014	22.08.2014	RNA Extraktion
36	Traumeel	19.08.2014	22.08.2014	21.08.2014		Histologischer Schnitt
37	Traumeel	19.08.2014	22.08.2014	21.08.2014		Histologischer Schnitt
38	Traumeel	19.08.2014	Verstorben			
39	Traumeel	19.08.2014	22.08.2014	21.08.2014		RNA Extraktion
40	Traumeel	19.08.2014	22.08.2014	21.08.2014		RNA Extraktion
41	Traumeel	20.08.2014	21.08.2014			Histologischer Schnitt
42	Traumeel	20.08.2014	21.08.2014			Histologischer Schnitt
43	Traumeel	20.08.2014	21.08.2014			Histologischer Schnitt
44	Traumeel	20.08.2014	21.08.2014			RNA Extraktion
45	Traumeel	20.08.2014	21.08.2014			RNA Extraktion
46	Actovegin + Traumeel	25.08.2014	01.09.2014	27.08.2014	29.08.2014	Histologischer Schnitt
47	Actovegin + Traumeel	25.08.2014	01.09.2014	27.08.2014	29.08.2014	Histologischer Schnitt
48	Actovegin + Traumeel	25.08.2014	01.09.2014	27.08.2014	29.08.2014	Histologischer Schnitt

49	Actovegin + Traumeel	25.08.2014	01.09.2014	27.08.2014	29.08.2014	RNA Extraktion
50	Actovegin + Traumeel	25.08.2014	01.09.2014	27.08.2014	29.08.2014	RNA Extraktion
51	Actovegin + Traumeel	26.08.2014	29.08.2014	28.08.2014		Histologischer Schnitt
52	Actovegin + Traumeel	26.08.2014	29.08.2014	28.08.2014		Histologischer Schnitt
53	Actovegin + Traumeel	26.08.2014	29.08.2014	28.08.2014		Histologischer Schnitt
54	Actovegin + Traumeel	26.08.2014	29.08.2014	28.08.2014		RNA Extraktion
55	Actovegin + Traumeel	26.08.2014	29.08.2014	28.08.2014		RNA Extraktion
56	Actovegin + Traumeel	27.08.2014	28.08.2014			Histologischer Schnitt
57	Actovegin + Traumeel	27.08.2014	28.08.2014			Histologischer Schnitt
58	Actovegin + Traumeel	27.08.2014	28.08.2014			Histologischer Schnitt
59	Actovegin + Traumeel	27.08.2014	28.08.2014			RNA Extraktion
60	Actovegin + Traumeel	27.08.2014	28.08.2014			RNA Extraktion
61	NaCl	13.10.2014	20.10.2014	15.10.2014	17.10.2014	Histologischer Schnitt
62	NaCl	13.10.2014	20.10.2014	15.10.2014	17.10.2014	Histologischer Schnitt
63	NaCl	13.10.2014	20.10.2014	15.10.2014	17.10.2014	Histologischer Schnitt
64	NaCl	13.10.2014	20.10.2014	15.10.2014	17.10.2014	RNA Extraktion
65	NaCl	13.10.2014	20.10.2014	15.10.2014	17.10.2014	RNA Extraktion
66	NaCl	14.10.2014	17.10.2014	16.10.2014		Histologischer Schnitt
67	NaCl	14.10.2014	17.10.2014	16.10.2014		Histologischer Schnitt
68	NaCl	14.10.2014	17.10.2014	16.10.2014		Histologischer Schnitt
69	NaCl	14.10.2014	17.10.2014	16.10.2014		RNA Extraktion
70	NaCl	14.10.2014	17.10.2014	16.10.2014		RNA Extraktion



71	NaCl	15.10.2014	16.10.2014			Histologischer Schnitt
72	NaCl	15.10.2014	16.10.2014			Histologischer Schnitt
73	NaCl	15.10.2014	16.10.2014			Histologischer Schnitt
74	NaCl	15.10.2014	16.10.2014			RNA Extraktion
75	NaCl	15.10.2014	16.10.2014			RNA Extraktion
76	Actovegin	20.10.2014	27.10.2014	22.10.2014	24.10.2014	Histologischer Schnitt
77	Actovegin	20.10.2014	27.10.2014	22.10.2014	24.10.2014	Histologischer Schnitt
78	Actovegin	20.10.2014	27.10.2014	22.10.2014	24.10.2014	Histologischer Schnitt
79	Actovegin	20.10.2014	27.10.2014	22.10.2014	24.10.2014	RNA Extraktion
80	Actovegin	20.10.2014	27.10.2014	22.10.2014	24.10.2014	RNA Extraktion
81	Actovegin	21.10.2014	24.10.2014	23.10.2014		Histologischer Schnitt
82	Actovegin	21.10.2014	24.10.2014	23.10.2014		Histologischer Schnitt
83	Actovegin	21.10.2014	24.10.2014	23.10.2014		Histologischer Schnitt
84	Actovegin	21.10.2014	24.10.2014	23.10.2014		RNA Extraktion
85	Actovegin	21.10.2014	24.10.2014	23.10.2014		RNA Extraktion
86	Actovegin	22.10.2014	23.10.2014			Histologischer Schnitt
87	Actovegin	22.10.2014	23.10.2014			Histologischer Schnitt
88	Actovegin	22.10.2014	23.10.2014			Histologischer Schnitt
89	Actovegin	22.10.2014	23.10.2014			RNA Extraktion
90	Actovegin	22.10.2014	23.10.2014			RNA Extraktion
91	Traumeel	27.10.2014	03.11.2014	29.10.2014	31.10.2014	Histologischer Schnitt
92	Traumeel	27.10.2014	03.11.2014	29.10.2014	31.10.2014	Histologischer Schnitt
93	Traumeel	27.10.2014	03.11.2014	29.10.2014	31.10.2014	Histologischer Schnitt
94	Traumeel	27.10.2014	03.11.2014	29.10.2014	31.10.2014	RNA Extraktion
95	Traumeel	27.10.2014	03.11.2014	29.10.2014	31.10.2014	RNA Extraktion

96	Traumeel	28.10.2014	31.10.2014	30.10.2014		Histologischer Schnitt
97	Traumeel	28.10.2014	31.10.2014	30.10.2014		Histologischer Schnitt
98	Traumeel	28.10.2014	31.10.2014	30.10.2014		Histologischer Schnitt
99	Traumeel	28.10.2014	31.10.2014	30.10.2014		RNA Extraktion
100	Traumeel	28.10.2014	31.10.2014	30.10.2014		RNA Extraktion
101	Traumeel	29.10.2014	30.10.2014			Histologischer Schnitt
102	Traumeel	29.10.2014	30.10.2014			Histologischer Schnitt
103	Traumeel	29.10.2014	30.10.2014			Histologischer Schnitt
104	Traumeel	29.10.2014	30.10.2014			RNA Extraktion
105	Traumeel	29.10.2014	30.10.2014			RNA Extraktion
106	Actovegin + Traumeel	03.11.2014	10.11.2014	05.11.2014	07.11.2014	Histologischer Schnitt
107	Actovegin + Traumeel	03.11.2014	10.11.2014	05.11.2014	07.11.2014	Histologischer Schnitt
108	Actovegin + Traumeel	03.11.2014	10.11.2014	05.11.2014	07.11.2014	Histologischer Schnitt
109	Actovegin + Traumeel	03.11.2014	10.11.2014	05.11.2014	07.11.2014	RNA Extraktion
110	Actovegin + Traumeel	03.11.2014	10.11.2014	05.11.2014	07.11.2014	RNA Extraktion
111	Actovegin + Traumeel	04.11.2014	07.11.2014	06.11.2014		Histologischer Schnitt
112	Actovegin + Traumeel	04.11.2014	07.11.2014	06.11.2014		Histologischer Schnitt
113	Actovegin + Traumeel	04.11.2014	Verstorben			
114	Actovegin + Traumeel	04.11.2014	07.11.2014	06.11.2014		RNA Extraktion
115	Actovegin + Traumeel	04.11.2014	07.11.2014	06.11.2014		RNA Extraktion
116	Actovegin + Traumeel	05.11.2014	06.11.2014			Histologischer Schnitt
117	Actovegin + Traumeel	05.11.2014	06.11.2014			Histologischer Schnitt

118	Actovegin + Traumeel	05.11.2014	06.11.2014			Histologischer Schnitt
119	Actovegin + Traumeel	05.11.2014	06.11.2014			RNA Extraktion
120	Actovegin + Traumeel	05.11.2014	06.11.2014			RNA Extraktion
121	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
122	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
123	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
124	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
125	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
126	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			Histologischer Schnitt
127	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			RNA Extraktion
128	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			RNA Extraktion
129	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			RNA Extraktion
130	Kontrolle	15.12.2014	22.12.2014			RNA Extraktion
131	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			Histologischer Schnitt
132	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			Histologischer Schnitt
133	Kontrolle	15.12.2014	Verstorben			
134	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			Histologischer Schnitt
135	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			Histologischer Schnitt
136	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			Histologischer Schnitt
137	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			RNA Extraktion
138	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			RNA Extraktion
139	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			RNA Extraktion
140	Kontrolle	15.12.2014	16.12.2014			RNA Extraktion
141	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt
142	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt

143	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt
144	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt
145	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt
146	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			Histologischer Schnitt
147	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			RNA Extraktion
148	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			RNA Extraktion
149	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			RNA Extraktion
150	Kontrolle	16.12.2014	19.12.2014			RNA Extraktion

**Tabelle 25: Zeitplan der Tierversuche**

## 9 Danksagung

**10 Lebenslauf**