

Aus dem Bereich  
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

**Funktionelle, bildmorphologische und histologische Analyse des  
murinen Kontusions- und Punktionstraumamodells**

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

2023

vorgelegt von

**Luis Haacke**

geb. am 22.07.1994 in Münster

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

1.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

2.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tim Meyer

Tag der Promotion: 09.11.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Zusammenfassung .....	7
1.1 Summary .....	9
2 Einleitung.....	11
2.1 Muskeltraumata .....	11
2.2 Muskelanatomie .....	12
2.3 Physiologische Muskelheilung.....	14
2.3.1 Degenerationsphase .....	15
2.3.2 Wiederherstellungsphase .....	15
2.3.3 Regenerationsphase .....	17
2.4 Therapieempfehlungen.....	18
2.4.1 Immobilisation.....	18
2.4.2 NSAR.....	18
2.4.3 Chirurgische Therapie .....	19
2.4.4 Injektionstherapie .....	19
2.5 Muskeltraumamodelle .....	20
2.5.1 Tiermodelle .....	20
2.5.2 Zellmodelle/In-vitro Modelle.....	21
2.6 Untersuchungsmethoden .....	22
2.6.1 MRT .....	22
2.6.2 Ultraschall/Photoakustik .....	22
2.6.3 Ganganalyse .....	23
2.6.4 Schieblehre.....	24
2.6.5 Histologie .....	24
2.7 Zielsetzung .....	26
2.8 Fragestellung.....	26

3	Material und Methoden.....	27
3.1	Intervention.....	27
3.1.1	Versuchsprotokoll.....	27
3.1.2	Tiermodell.....	28
3.1.3	Traumamodelle.....	29
3.1.4	MRT.....	30
3.1.5	hrUS/PAI.....	31
3.1.6	Schieblehre.....	33
3.1.7	Ganganalyse.....	33
3.1.8	Histologie.....	34
3.1.9	Immunhistochemie.....	34
3.1.10	Tötung der Tiere.....	35
3.1.11	Explantation des Muskels.....	35
3.2	Zielkriterien und Auswertung.....	35
3.2.1	MRT.....	35
3.2.2	hrUS/PAI.....	36
3.2.3	Ganganalyse.....	38
3.2.4	Schieblehre.....	39
3.2.5	Histologie/Immunhistochemie.....	39
3.3	Statistik.....	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Posttraumatischer Verlauf.....	41
4.2	Makroskopie.....	41
4.3	MRT.....	42
4.3.1	Hämatom/Ödem.....	43
4.4	hrUS.....	45
4.5	PAI.....	46
4.5.1	sO <sub>2</sub> .....	46
4.5.2	HbT.....	47

4.6	Schieblehre.....	47
4.7	Ganganalyse .....	49
4.7.1	Run Duration .....	49
4.7.2	Stand .....	49
4.7.3	Stride Length (SL) .....	50
4.7.4	Swing.....	51
4.7.5	Step Cycle (SC).....	52
4.7.6	Duty Cycle (DC).....	53
4.7.7	Print Area (PA) .....	55
4.7.8	Max Contact Area (MCA) .....	56
4.7.9	Max Contact Max Intensity (MCMAXI) .....	57
4.7.10	Max Contact Mean Intensity (MCMI) .....	58
4.8	Histologie.....	59
4.8.1	HE Färbung .....	59
4.8.2	CD-68 Färbung.....	61
4.8.3	Ki-67 Färbung.....	63
4.8.4	Caspase-3 Färbung.....	65
4.8.5	MPO Färbung .....	67
5	Diskussion .....	69
5.1	Diskussion der Methoden.....	69
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	75
5.3	Fazit.....	78
	Literaturverzeichnis .....	79
6	Danksagung/Publikationen.....	96
6.1	Publikationen .....	96
6.2	Danksagung .....	96
7	Lebenslauf.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
%	Prozent
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
avr.	Durchschnitt
Abb.	Abbildung
bspw.	beispielsweise
C-3	Caspase 3
ca.	circa
CD-68	Macrosialin
cO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
cm	Zentimeter
D	Durchmesser
dB	Dezibel
DICOM	Digital Imaging and Communication in Medicine
et al.	et alteri
Fig.	Figure
g	Gramm
G	Gauche
h	Stunde
hrUS	high resolution Ultrasound
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ki-67	Kiel-67-Antigen
M	Mittelwert

M.	Musculus
mg	Milligramm
MHZ	Megahertz
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnetresonanztomographie
mT	Millitesla
MTJ	muskulotendinöse Verbindung
µm	Mykrometer
nm	Nanometer
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ON	Ontario
PAI	Photoacoustic Imaging
PECH	Pause, Eis, Compression, Hochlagerung
RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
ROI	Region of interest
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
sO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
T	Tesla
Tab.	Tabelle
v.	Version
vgl.	vergleiche
V/Vol.	Volumen
vs.	Versus

UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WA	Washington
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Klassifikation akuter Muskelverletzungen [116]	12
Abbildung 2	Makroskopisch/histologischer Aufbau des Skelettmuskels [89]	14
Abbildung 3	Übersicht über Zeitverlauf und verwendete Methodik einzelner Untersuchungszeitpunkte	28
Abbildung 4	Aufbau Kontusionstraumamodell	29
Abbildung 5	Aufbau Punctionstraumamodell	30
Abbildung 6	9,4 T Kleintier MRT [194]	31
Abbildung 7	Aufbau hrUS/PAI Untersuchung	32
Abbildung 8	Aufbau und Messung Schieblehre	33
Abbildung 9	Messung des Muskel-/Ödemvolumens MRT	35
Abbildung 10	Messung des Muskel-/Ödemvolumens hrUS	36
Abbildung 11	Messung der sO <sub>2</sub> und HbT PAI Modus	37
Abbildung 12	Maus während eines Runs mit beschrifteten Pfotenabdrücken im CatWalk™ XT 10	39
Abbildung 13	Histologisches Präparat und Skizze histologische Auswertung	39
Abbildung 14	Gewicht Kontusions- und Punctionsgruppe	41
Abbildung 15	Volumetrische Auswertung Kontusions- und Punctionsgruppe MRT	42
Abbildung 16	Volumetrische Auswertung Traumahämatom Kontusion- und Punctionsgruppe MRT	43
Abbildung 17	Darstellung Kontusions- und Punctionstrauma MRT	44
Abbildung 18	Volumetrische Auswertung Kontusions- und Punctionsgruppe hrUS	45
Abbildung 19	Darstellung Kontusions- und Punctionstrauma hrUS	46
Abbildung 20	Auswertung sO <sub>2</sub> Kontusions- und Punctionsgruppe PAI	46
Abbildung 21	Auswertung HbT Kontusions- und Punctionsgruppe PAI	47
Abbildung 22	Auswertung Schieblehre Kontusions- und Punctionsgruppe	48
Abbildung 23	Auswertung Run Duration Kontusions- und Punctionsgruppe	49
Abbildung 24	Auswertung Stand Kontusions- und Punctionsgruppe	50
Abbildung 25	Auswertung Stride Length Kontusions- und Punctionsgruppe	51

Abbildung 26	Auswertung Swing Kontusions- und Punktionsgruppe	52
Abbildung 27	Auswertung Step Cycle Kontusions- und Punktionsgruppe	53
Abbildung 28	Auswertung Duty Cycle Kontusions- und Punktionsgruppe	54
Abbildung 29	Auswertung Print Area Kontusions- und Punktionsgruppe	55
Abbildung 30	Auswertung Max Contact Area Kontusions- und Punktionsgruppe	56
Abbildung 31	Auswertung Max Contact Max Intensity Kontusions- und Punktionsgruppe	57
Abbildung 32	Auswertung Max Contact Mean Intensity Kontusions- und Punktionsgruppe	58
Abbildung 33	Auswertung HE-Färbung Kontusions- und Punktionsgruppe	59
Abbildung 34	Darstellung Kontusions- und Punktionsstrauma HE-Färbung	60
Abbildung 35	Auswertung CD-68-Färbung Kontusions- und Punktionsgruppe	61
Abbildung 36	Darstellung Kontusions- und Punktionsstrauma CD-68-Färbung	62
Abbildung 37	Auswertung Ki-67-Färbung Kontusions- und Punktionsgruppe	63
Abbildung 38	Darstellung Kontusions- und Punktionsstrauma Ki-67-Färbung	64
Abbildung 39	Auswertung Caspase-3-Färbung Kontusions- und Punktionsgruppe	65
Abbildung 40	Darstellung Kontusions- und Punktionsstrauma Caspase-3-Färbung	66
Abbildung 41	Auswertung MPO-Färbung Kontusions- und Punktionsgruppe	67
Abbildung 42	Darstellung Kontusions- und Punktionsstrauma MPO-Färbung	68

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Einstellungsparameter MRT-Sequenzen	31
Tabelle 2	Einstellungsparameter hrUS/PAI	33
Tabelle 3	Einstellungsparameter CatWalk™ XT 10	34
Tabelle 4	Definitionen Messparameter hrUS/PAI	37
Tabelle 5	Definitionen Messparameter CatWalk™ XT 10	38

# 1 Zusammenfassung

Skelettmuskelverletzungen sind ein häufiges Krankheitsbild, insbesondere im Amateur- oder Profisport. Durch ein direktes oder indirektes Trauma wird die Muskelfunktion eingeschränkt. Neben einer Reihe etablierter Akutmaßnahmen (Pause, Eis, Kompression, Hochlagerung) existieren bisher keine kurativen, aber auch kaum evidenzbasierte symptomatische Therapiemöglichkeiten. Daher werden zur Erforschung der Muskelheilung sowie neuartiger Therapien reliable und realitätsnahe Modelle benötigt. Tiermodelle eignen sich zur multimodalen Untersuchung derzeit am besten.

In dieser Arbeit wurde ein in der Literatur etabliertes Kontusions- mit einem neuartigen Punktionstraumamodell verglichen. Bisher wurde das Punktionstraumamodell noch nicht zur Untersuchung der murinen Skelettmuskelheilung genutzt. Weiter erfolgte die Erforschung der Durchführbarkeit einer Kombination aus wiederholten posttraumatischen Analysen und die Auswirkung der Traumata auf das Gangbild.

Hierzu wurden 24 Mäuse in 2 Gruppen eingeteilt, wovon jeweils 12 Mäusen ein Kontusionstrauma und 12 Mäusen ein Punktionstrauma am M. gastrocnemius des linken Hinterlaufes erhielten. Das daraus resultierende Trauma und die Muskelheilung wurden posttraumatisch funktionell, bildmorphologisch und histologisch analysiert. Zur funktionellen Analyse erfolgte eine Ganganalyse per CatWalk XT 10 (Noldus, Wageningen, Niederlande) am Interventionstag und an Tag 1,4,7 und 14. Bildmorphologisch wurden sowohl MRT-Aufnahmen am Interventionstag und Tag 1,4,7 als auch sonographische Untersuchungen am Interventionstag und Tag 1,4,7,14 durchgeführt. Außerdem erfolgten an Tag 1,4,7 und 14 photoakustische in-vivo Messungen der Sauerstoffsättigung und des Hämoglobingehaltes des traumatisierten Muskels. Zur histologischen Analyse wurden an Tag 1,4,7 und 14 Standard HE-Färbungen sowie eine Immunhistochemie durchgeführt. Die Immunhistochemische Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen CD-68, Ki-67, Myeloperoxidase und Caspase-3.

In der Ganganalyse zeigten sich in beiden Gruppen posttraumatisch nur geringgradige Auswirkungen. In der Kontusionsgruppe wurde eine signifikante Verringerung der Abdruckkraft an Tag 7 beobachtet, ohne jedoch Einfluss auf das Gangbild oder die Belastung der traumatisierten Extremität zu nehmen. Die MRT-Untersuchungen konnten in beiden Gruppen Traumareaktionen nachweisen. In der Kontusionsgruppe zeigte sich ein zum Menschen analoges, „federartiges“ Hämatom sowie eine generalisierte Schwellung des traumatisierten Muskels. In der Punktionsgruppe konnte der durch das Trauma entstandene Stichkanal gezeigt werden. Im Zeitverlauf zeigte sich die Schwellung des traumatisierten Muskels in der Kontusionsgruppe bis Tag 7, in der Punktionsgruppe bis Tag 4 sukzessive rückläufig. Sonographisch wurden Schwellungen des traumatisierten Muskels in beiden Gruppen nachgewiesen. Das intramuskuläre Hämatom konnte in der Kontusionsgruppe

ebenfalls partiell dargestellt werden. In der Punktionsgruppe konnte das Traumahämatom nicht reproduzierbar dargestellt werden, bei oftmals sichtbarem Stichkanal. In den MRT-Untersuchungen, als auch in der Sonographie zeigte das Kontusionsmodell im Vergleich mit dem Punktionsmodell signifikant höhere Volumina über alle Beobachtungszeitpunkte. Photoakustisch zeigte sich in der Kontusionsgruppe posttraumatisch eine signifikant verringerte Hämoglobinkonzentration. Histologisch konnten in beiden Gruppen ebenfalls typische Merkmale der Muskelheilung beobachtet werden. An Tag 1 und 4 zeigte sich eine Invasion von Immunzellen, insbesondere Makrophagen und neutrophiler Granulozyten. Ab Tag 7 wurden in beiden Gruppen Defektzonen mit zentronukleären Zellen mit einer Hochregulation von Zellteilung und Apoptose nachgewiesen. In der Kontusionsgruppe zeigte sich in fast allen Untersuchungen signifikant höhere Zellzahlen sowie ausgeprägtere Befunde. Zusammenfassend kann das Punktionsmodell derzeit nicht als Alternative zum Kontusionsmodell für weiterführende murine Skelettmuskeltraumaforschung angesehen werden. Die gewählte Kombination der posttraumatischen Untersuchungen lässt eine gute Darstellung des Muskeltraumas und des darauffolgenden Heilungsverlaufes zu, wohingegen keines der Modelle einen beobachtbaren Einfluss auf das Gangbild zeigte.

## 1.1 Summary

### **Functional, image morphologic, and histologic analysis of the murine contusion and puncture trauma model.**

Skeletal muscle injuries are a common clinical picture, especially in amateur or professional sports. A direct or indirect trauma results in a functional limitation of a muscle. Apart from a number of established acute measures (rest, ice, compression, elevation), there are no curative, and hardly any evidence-based symptomatic therapy options. Therefore, reliable and realistic models are needed to explore muscle healing and novel therapies. Animal models are currently best suited for multimodal investigation.

In this work, a contusion model established in literature was compared with a novel puncture trauma model. To date, the puncture trauma model has not been used to study murine skeletal muscle healing. Further, the feasibility of a combination of repeated posttraumatic analyses and the effect of trauma on gait were explored.

For this purpose, 24 mice were divided into 2 groups, of which 12 mice each received contusion trauma and 12 mice each received puncture trauma to the gastrocnemius muscle of the left hind leg. The resulting trauma and muscle healing were analyzed post-traumatically by functional, image morphological, and histological means. For functional analysis, gait analysis was performed by CatWalk XT 10 (Noldus, Wageningen, The Netherlands) on intervention day and days 1,4,7 and 14. Image morphology included MRI scans on intervention day and day 1,4,7 as well as sonographic examinations on intervention day and day 1,4,7,14. In addition, in-vivo photoacoustic measurements of oxygen saturation and hemoglobin content of the traumatized muscle were performed on day 1,4,7 and 14. For histological analysis, standard HE staining and immunohistochemistry were performed on days 1,4,7 and 14. Immunohistochemical analysis was performed with antibodies against CD-68, Ki-67, myeloperoxidase and caspase-3.

Gait analysis showed only minor effects in both groups post-traumatically. In the contusion group, a significant reduction in imprint force was observed on day 7, but without affecting gait pattern or loading of the traumatized limb. MRI scans demonstrated trauma responses in both groups. The contusion group showed a "feather-like" hematoma analogous to that seen in humans, as well as generalized swelling of the traumatized muscle. In the puncture group, the puncture channel created by the trauma was demonstrated. Over time, the swelling of the traumatized muscle showed successive regression in the contusion group by day 7 and in the puncture group by day 4. Sonographically, swelling of the traumatized muscle was demonstrated in both groups. The intramuscular hematoma could also be partially visualized in the contusion group. In the puncture group, the trauma hematoma could not be reproducibly visualized, with often visible puncture canal. In the MRI examinations, as well as in the

sonography, the contusion model showed significantly higher volumes compared to the puncture model at all observation times. Photoacoustically, the contusion group showed significantly decreased hemoglobin concentration posttraumatically. Histologically, typical features of muscle healing were also observed in both groups. On days 1 and 4, there was an invasion of immune cells, especially macrophages and neutrophilic granulocytes. From day 7, defect zones containing centronuclear cells with upregulation of cell division and apoptosis were detected in both groups. The contusion group showed significantly higher cell counts in almost all examinations, as well as more pronounced findings.

In conclusion, currently the puncture trauma model cannot be considered as an alternative to the contusion trauma model for advanced murine skeletal muscle trauma research. The chosen combination of post-traumatic studies allows a good representation of the muscle trauma and the subsequent healing process, whereas none of the models showed an observable influence on the gait pattern.

## 2 Einleitung

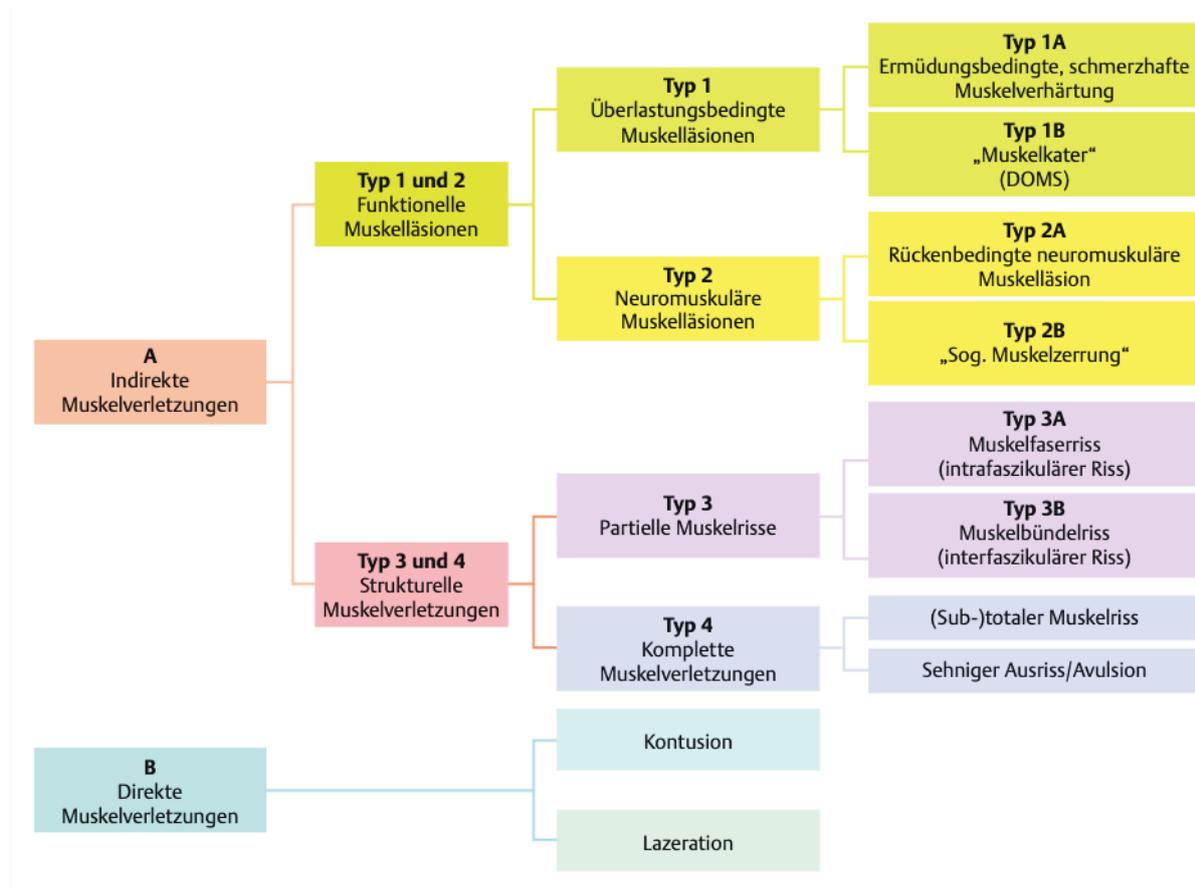
### 2.1 Muskeltraumata

Über 90% der Sportverletzungen werden ausgelöst durch Ermüdung, Überdehnung oder direkte Kontusion der Weichteile [75]. Ein Drittel aller Sportverletzungen fallen dabei auf Skelettmuskelverletzungen, welche weiterhin zu über 90% die untere Extremität betreffen [39]. Die meist betroffenen Muskelgruppen sind die ischiocrurale Muskulatur, der M. quadrizeps femoris, die Adduktoren sowie der M. gastrocnemius [41]. Die Prävalenz von Skelettmuskelverletzungen steigt zudem in Kontaktsportarten wie Fußball [5] [40] oder American Football [44]. Dies führt dazu, dass ein professionelles Fußballteam im Laufe einer Saison mit bis zu 15 Skelettmuskelverletzungen zu rechnen hat [40]. Die dadurch entstehenden Fehlzeiten und Kosten können für den Erfolg oder Misserfolg eines Vereines mitentscheidend sein [44].

Historisch werden Muskelverletzungen in Grad I (Riss einzelner Muskelfasern bei intakter Faszie, engl. „strain“), II (Riss mehrerer Muskelfasern bei intakter Faszie), III (Riss einer erheblichen Anzahl von Muskelfasern sowie (Teil-) Ruptur der Faszie) und IV- Verletzungen (Vollständiger Riss des Muskels) eingeteilt (Ryan et al., 1969). Diese Klassifikation wurde initial nur für den M. rectus femoris definiert, wurde jedoch bald auf alle Arten von Muskelverletzungen übertragen [147]. Im Laufe der Jahre wurde diese Klassifikation erweitert, beispielsweise durch Stoller [168], welcher die vorhandene Klassifikation um den MRT-Befund ergänzte. Chan et al. (2012), knüpfte den klinischen Befund an die Befunde aus MRT und Ultraschall [24]. Dadurch fokussierten sich die vorgeschlagenen Erweiterungen stark auf bildgebende Verfahren und legten nach Ansicht einiger Autoren einen zu geringen Fokus auf den klinischen Befund. Ekstrand et al. konnten 2012 zeigen, dass über 50% der Verletzungen, welche zu Ausfallzeiten von Profifußballern führten, im MRT lediglich ein Muskelödem ohne Verletzungen der Muskelstruktur aufwiesen [41].

Eine neuartige Klassifikation wurde als Ergebnis der Münchener Konsensuskonferenz zur Terminologie und Klassifikation von Muskelverletzungen 2011 vorgestellt. Hier wurde nun zwischen indirekten und direkten sowie strukturellen und funktionellen Muskeltraumata differenziert [116] (siehe Abb. 1). Die indirekten Muskelverletzungen, d.h. ohne externes Trauma, werden unterteilt in funktionelle Muskelläsionen ohne Hinweise auf strukturelle Schäden am Muskel (Typ 1 und 2) sowie strukturelle Muskelläsionen (Typ 3 und 4). Die funktionellen Muskelläsionen wiederum werden eingeteilt in überlastungsbedingte (Typ 1A und Typ 1B) und neuromuskuläre Muskelläsionen (Typ 2A und Typ 2B). Im Bereich der strukturellen Muskelläsionen sind Teile der klassischen Klassifikation zu finden, welche sich an der Quantität der verletzten Muskelfasern orientiert. Hierbei beschreibt eine Typ 3 Verletzung einen partiellen Muskelriss und eine Typ 4 Verletzung einen kompletten Muskelriss.

Demgegenüber stehen die direkten Muskelverletzungen, welche in Kontusions- und Lazerationsverletzungen eingeteilt werden [42]. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit den direkten und den strukturellen Muskelverletzungen.



**Abb. 1** zeigt die Klassifikation akuter Muskelverletzungen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Konsensus-Konferenz, München (2011) [116].

## 2.2 Muskelanatomie

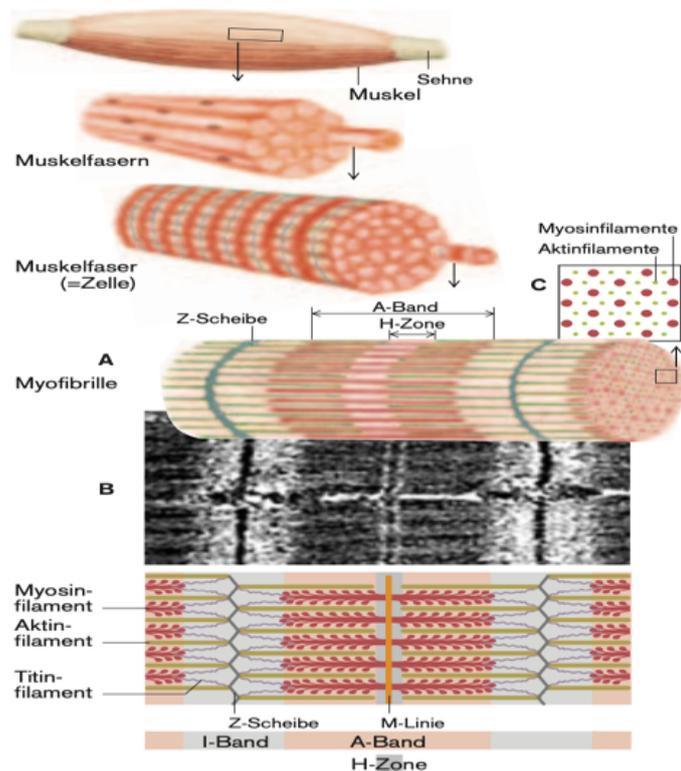
Muskeln lassen sich morphologisch in drei verschiedene Typen einteilen. Hierbei sind die willkürliche, quergestreifte Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatte Muskulatur abzugrenzen. In der hier vorliegenden Studie wird der Fokus auf die willkürliche, quergestreifte Skelettmuskulatur gelegt.

Mit einem Anteil von 40-45% des Körpergewichtes stellt die Skelettmuskulatur die größte Gewebemasse des menschlichen Körpers dar. Im Zusammenspiel mit den assoziierten Nerven, Gefäßen und Bindegewebsanteilen entsteht eine mehrschichtige Matrix, welche durch ihre Kontraktionsfähigkeit die gezielte Bewegung und Orientierung der menschlichen Gelenke im Raum sowie das Muskelwachstum und den Reparaturprozess nach Muskeltraumata ermöglicht [69].

Die Skelettmuskulatur setzt sich aus vielkernigen Muskelfasern mit einem Durchmesser von 10-100  $\mu\text{m}$  zusammen. Die Länge der einzelnen Muskelfaser kann mehrere Zentimeter erreichen [89]. In der embryonalen Entwicklung einer Muskelfaser werden mehrere einkernige Myoblasten zu einer Kette angeordnet, die daraufhin zu mehrkernigen Myotuben fusionieren. Hieraus differenziert sich die fertige Muskelfaser mit nicht teilungsfähigen Zellkernen. Dennoch verbleiben einige undifferenzierte Zellkerne für Reparations- und Regenerationsprozesse als Satellitenzellen in der Basalmembran [98]. Im Zytoplasma (im Muskel Sarkoplasma genannt) finden sich die Myofibrillen und neben Mitochondrien auch das sarkoplasmatische Retikulum. Die kleinste Einheit der Muskelfaser, welche auf mikroskopischer Ebene die Kontraktion eines Muskels durchführt, ist das Sarkomer. Durch die Wechselwirkung der vorherrschenden Proteine Aktin und Myosin besitzt das Sarkomer die Fähigkeit zur Kontraktion. In einer Muskelfaser sind die Sarkomere kettenartig aneinandergereiht und werden als Myofibrillen bezeichnet [89,98].

Im Muskel ist außerdem eine differenzierte Bindegewebsstruktur enthalten. Das Endomysium ummantelt die einzelne Muskelfaser und enthält retikuläre Fasern sowie die Basalmembran (Sarkolemm) [52]. Durch das Perimysium werden die Muskelfasern gruppiert und in so genannte Primär- und Sekundärbündel zusammengefasst. Außerdem dient das Perimysium mit seinen netzartigen Einziehungen in den Muskel als Leitungsbahn für Nerven und Gefäße. Das Epimysium bildet mit der darüber liegenden Faszie die äußerste Bindegewebshaut. Die epimysialen Anteile sind lockeres Bindegewebe, wohingegen die Faszie eine straffe Bindegewebsschicht bildet. Insgesamt bildet dieses Bindegewebe eine skelettartige Schicht, welche die Kontraktionen der einzelnen Muskelfasern zu einer geeinten Kontraktion bündeln und somit die gezielte Bewegung ermöglichen kann [75].

Die Muskelfasern und das Bindegewebe werden durch myotendinöse Übergänge miteinander verbunden. Hierbei sorgt ein Komplex aus Dystrophin und Glykoproteinen im Zusammenspiel mit Integrin und Laminin 2 für die Übertragung der Kraft aus dem Muskelgewebe auf die Kollagenfasern des Bindegewebes [21,98].



**Abb. 2** zeigt den typischen Aufbau eines Muskels bis hin zur kleinsten funktionellen Einheit des Muskels (Sarkomer) [89].

### 2.3 Physiologische Muskelheilung

Im Gegensatz zur knöchernen Frakturheilung, bei der eine vollständige Regeneration des Knochens erreicht wird, besitzt der Muskel nach einer direkten oder indirekten Traumatisierung mit Zerstörung der Basalmembran lediglich die Fähigkeit zur Reparation eines Defekts mit konsekutiver Ausbildung von Narbengewebe. Typischerweise gliedert sich der Heilungsprozess unabhängig von der Ätiologie des Traumas in drei Phasen, welche sich teilweise bedingen und größtenteils überlappend ablaufen [75,80,98,140]:

1. Degenerationsphase, charakterisiert durch Zerstörung und Nekrose der traumatisierten Muskelfasern, Entstehung eines Hämatomes zwischen den Muskelfasern und dem Beginn einer inflammatorischen Zellreaktion
2. Wiederherstellungsphase, bestehend aus der Phagozytose des nekrotisierten Gewebes, der Regeneration der Muskelfasern, der parallelen Bildung von Narbengewebe sowie Einsprießung von Gefäßen
3. Regenerationsphase, in der die neugebildeten Muskelfasern ausreifen und mit dem Narbengewebe neue muskulotendinöse Verbindungen eingehen und letztendes die Funktion des Muskels wiederhergestellt wird

### **2.3.1 Degenerationsphase**

Auf die initiale Muskelschädigung, bei der nicht nur die Muskelfasern, sondern oftmals das umliegende Bindegewebe sowie Gefäße beschädigt werden, folgt zunächst die Retraktion der Muskelfasern. Aufgrund der Gefäßschädigung füllt sich der nun entstandene Raum mit Hämatom [75]. Die rupturierten Muskelfasern durchlaufen nun an den betroffenen Enden eine Nekrosephase, welche durch den Kontakt von extrazellulären Bestandteilen aus den Muskelfasern mit dem umliegenden Gewebe induziert wird. Die ablaufende Nekrose und Phagozytosezone wiederum wird nach proximal und distal durch eine ca. 7h nach Trauma neu formierte basalamembran-ähnliche Struktur, auch „Kontraktionsband“ genannt, bestehend aus kondensierten, hyperkontrakten Myofibrillen begrenzt. Dadurch kann die Nekrosezone lokal eingegrenzt werden. Insgesamt erstreckt sich das Nekroseareal auf eine Distanz von ca. 0,9-1,5mm [71].

Aufgrund der parallelen Schädigung der Blutgefäße findet konsekutiv ein Kontakt der Verletzung mit im Blut befindlichen Entzündungszellen statt. So wird eine inflammatorische Reaktion initiiert, welche dann durch die im Muskel vorhandenen Satellitenzellen und durch die von nekrotisierten Muskelfasern sezernierten Wundhormone verstärkt wird [75]. Hierdurch wandern Leukozyten ein, welche jedoch schnell von Monozyten abgelöst werden, die sich normalerweise zu Makrophagen differenzieren und die Phagozytose des nekrotisierten Gewebes übernehmen [26]. Diese Reaktion entfernt das nekrotisierte Gewebe aus den betroffenen Muskelfasern vollständig, lässt dabei jedoch ein loses Gerüst aus Bestandteilen der ehemaligen Basalmembran zurück, welche die vorhandenen Satellitenzellen als Grundstein für den Muskelregenerationsprozess nutzen können [71,75].

### **2.3.2 Wiederherstellungsphase**

Nach der Destruktionsphase geht die Muskelheilung in die Wiederherstellungsphase über, in welcher zwei miteinander eng verwobene Prozesse stattfinden, die sich gegenseitig unterstützen, aber auch miteinander konkurrieren: die Regeneration der Muskelfasern und die Ausbildung eines narbigen Bindegewebes [59]. An den Enden der rupturierten Muskelfasern findet sich eine Zone, in der es aufgrund einer weitestgehend intakten Basalmembran durch Unterstützung von Satellitenzellen zur vollständigen Regeneration der Muskelfasern kommt. In der hämatomgefüllten Zone zwischen den retrahierten Muskelfasern bei nicht intakter Basalmembran führen die Heilungsprozesse zu einem Umbau des Hämatomes zu einer Bindegewebsstruktur, welche letztendlich narbig ausheilt [75].

### **2.3.2.1 Muskelfaserregeneration**

Trotz der vermeintlich endgültigen Ausdifferenzierung der Myofibrillen bietet sich doch eine Möglichkeit zur Regeneration bei entstandenem Schaden. Muskelfasern verfügen über ein Reservoir an undifferenzierten Stammzellen, welche man Satellitenzellen nennt. Diese können im Falle eines aufgetretenen Schadens an der Muskelfaser zu Myoblasten differenzieren und in Zusammenarbeit mit anderen ausdifferenzierten Stammzellen neue mehrkernige Muskelfasern bilden [106]. Diese neu formierten Muskelfasern besetzen daraufhin das von den Makrophagen vorbereitete basallämäre Gerüst an den Enden der traumatisierten Muskelfasern und beginnen in Richtung der zentral im Defekt befindlichen Bindegewebsnarbe zu proliferieren [75].

### **2.3.2.2 Zentrale Bindegewebsnarbe**

Im zentralen Bereich einer Muskelverletzung hinterlassen die traumatisierten Muskelfasern nach ihrer Retraktion einen Raum, welcher sich wegen der begleitenden Gefäßverletzungen typischerweise mit Blut füllt. Dieses Blut gerinnt zu einem Hämatom, das als Basis für die Ausbildung einer zentralen Bindegewebsnarbe dient. Das Hämatom wird schon am ersten Tag nach der Verletzung durch aus dem Blut eingewanderte Makrophagen abgebaut und durch Fibroblasten unter Zuhilfenahme von Fibrin und Fibronectin zu einem frühen Granulationsgewebe umgebaut [71,75]. Hierdurch wird schnell eine Widerstandsfähigkeit gegen die auf den traumatisierten Muskel einwirkenden Kräfte wiederhergestellt. Daraufgehend wird das Granulationsgewebe durch den Einfluss der Fibroblasten in Kollagen III, aber vor Allem Kollagen I Fasern umgewandelt und stark kondensiert. Dies führt einerseits zu einer deutlich erhöhten Reißfestigkeit des Bindegewebes und andererseits zu einer starken Reduzierung der Bindegewebsmasse. Nach ungefähr 10 Tagen wird so eine derartige Reißfestigkeit aufgebaut, dass im Falle einer Re-Ruptur eher die entspringenden Muskelfasern vom Bindegewebe abreißen, als die Bindegewebsnarbe selbst [75]. Je nach Größe des Schadens kann eine vollständige Abheilung und Resorption der Bindegewebsnarbe erreicht werden, bei großen Muskeltraumata jedoch verbleibt meist eine große Bindegewebsnarbe, sodass die ursprüngliche Formation des Muskels nicht wiederhergestellt werden kann [59].

### **2.3.2.3 Re-Vaskularisation und Re-Innervation**

Begleitend zu den oben genannten Prozessen läuft die Regeneration der Gefäße und Nerven ab [127]. Eine der ersten beobachtbaren Reaktionen des Organismus auf ein Muskeltrauma ist eine beginnende Rekapillarisation. Aus den verbleibenden Gefäßenden in den überlebenden Muskelfasern sprießen direkt im Anschluss an das Trauma erste neue Kapillaren, welche wichtig sind, um eine regelrechte Oxygenierung des sich neuformierenden Gewebes sowie eine ausreichende Energieversorgung zu gewährleisten [76]. Die Re-

Innervation des Muskels erfolgt ebenso parallel zur Re-Vaskularisation. Proximal der Verletzung sprossen aus den verbleibenden Axonen neue Axone in Richtung der sich neuformierenden distalen Muskelanteile. Dies verhindert eine im Verlauf sonst auftretende Atrophie des Muskels [23].

### **2.3.3 Regenerationsphase**

Der von einem Muskelfaserriss betroffene Muskel verliert seine Fähigkeit die durch eine Kontraktion entstehende Kraft von einem Sehnenansatzpunkt über den Muskel zum entgegengesetzten Sehnenansatzpunkt zu transportieren, da im Bereich des Traumas eine Unterbrechung der Muskelfaser stattgefunden hat [75]. Zur Wiedererlangung dieser Fähigkeit durchläuft der Muskel vorerst die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Phasen.

Zur endgültigen Regeneration des Muskels müssen nun die entstandene Bindegewebsnarbe und die sich regenerierenden Muskelfasern verbunden werden. Um die bei jeder neuen Kontraktion auf die neuen Muskelfasern wirkenden Kräfte zu balancieren und so gute Voraussetzungen für eine reibungslose Heilung der Fasern zu schaffen, gehen die Fasern lateralseitig unter Zuhilfenahme von Integrinen eine starke, temporäre Bindung mit der extrazellulären Matrix bzw. dem extrazellulären Bindegewebe ein [75]. So kann eine abermalige Retraktion der Muskelfasern verhindert werden. Dieser Prozess wird stark durch mechanische Reize durch Belastung getriggert [79].

Im weiteren Verlauf des Regenerationsprozesses bilden die neugebildeten Fasern eine Verbindung mit der Bindegewebsnarbe aus, welche mit dem normalen Muskel-Sehnen-Übergang zu vergleichen ist, innerviert durch ein gemeinsames Axon. So kann die Kraftübertragung von einem Muskelende zum anderen wiederhergestellt werden [78]. Gegen Ende der Regenerationsphase schrumpft die Bindegewebsnarbe auf ein Minimum zusammen und die neugebildeten Muskelfasern bilden eine durchgehende Einheit, ohne jedoch komplett zu fusionieren [177]. Parallel werden die unterstützenden lateralen Bindegewebsbrücken wieder abgebaut [75].

## **2.4 Therapieempfehlungen**

Für die Therapie der Akutphase hat sich unabhängig der Ätiologie des Muskeltraumas die PECH-Regel (Pause, Eis, Compression und Hochlagerung) als Methode der Wahl bewährt. Ein abschließender empirischer Beleg konnte bis dato noch nicht erbracht werden, allerdings sind einzelne Bestandteile des Therapieregimes durch zahlreiche Studien belegt [8,16,66,147,163].

Durch die sofortige Unterbrechung der Belastung (Pause) kann verhindert werden, dass ein im Falle eines strukturellen Muskelschadens entstandener Defekt vergrößert wird. Weiterhin reduziert die sofortige Immobilisation das Hämatom und somit auch konsekutiv die Bindegewebsnarbe [176]. Die Kühlung des Muskels (Eis) vermindert die Hämorrhagie sowie Inflammation zusätzlich. Durch Maßnahmen, welche eine Kompression (Compression) des Muskels erzeugen, wird der interstitielle Blutfluss deutlich vermindert. Das Prinzip der Hochlagerung folgt dem simplen physiologischen Mechanismus des Anhebens über Herzhöhe, was wiederum zu einem geringeren interstitiellen Druck und Volumen führt. Abschließend lässt sich postulieren, dass alle Akutmaßnahmen die Hämatombildung stoppen und entstandene Defekte in Grenzen halten sollen [75].

Nach Abschluss der Akutmaßnahmen ist das Ziel der Therapie die im vorherigen Abschnitt genannten Prozesse zu beschleunigen und insbesondere die bindegewebige Vernarbung des Muskels zu verhindern. Dadurch soll eine schnellstmögliche Wiederherstellung der Funktion und Rückkehr in den Wettkampf erfolgen [176].

### **2.4.1 Immobilisation**

Eine Immobilisation des betroffenen Muskels sollte sich auf die Akutphase beschränken (etwa 2-5 Tage) und nicht zu rigide durchgeführt werden. Hierbei sollte auf den Einsatz eines Gipses oder Unterarmgehstützen möglichst verzichtet werden. Zur regelrechten Immobilisation eines traumatisierten Muskels sollte ein semizirkulärer Tape-Verband angelegt werden [176]. Es hat sich gezeigt, dass eine frühe befundadaptierte Vollbelastung im Anschluss an die Akutphase der prolongierten Immobilisation überlegen ist. Durch die Belastung ist eine geförderte Neovaskularisation des Muskels, eine bessere parallele Ausrichtung der Muskelfasern sowie eine schnellere Rückkehr zur Belastbarkeit zu beobachten [73,75].

### **2.4.2 NSAR**

Der Einsatz von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wie Ibuprofen oder Diclofenac ist in der Therapie der Muskeltraumata weit verbreitet. Aktuell wird jedoch der Einsatz von NSAR zur Therapie der Muskelverletzungen kritisch diskutiert. Denn zum einen können NSAR durch deren schmerzlindernde Wirkung in Sportler/-innen eine falsche Interpretation der

befundabhängigen Belastungsgrenzen auslösen und zum anderen wird der Hemmung der Cyclooxygenase ein Einfluss auf die Muskelheilung zugeschrieben [128,157].

### **2.4.3 Chirurgische Therapie**

Die chirurgische Versorgung eines Muskeltraumas ist nur dann indiziert, wenn nicht davon auszugehen ist, dass die Muskelverletzung erfolgreich konservativ therapierbar ist. Etwa bei massivem intramuskulären Hämatom [139], (sub-) totalen Muskelrissen (Grad 4) [2], Avulsionen am Muskelansatz oder Sehnenrissen [116]. Eine notfallmäßige chirurgische Therapie wird bei bedrohlichen Komplikationen wie einem Kompartmentsyndrom durchgeführt [175] [178].

### **2.4.4 Injektionstherapie**

Ein weiterer Therapieansatz der Muskelheilung sind Injektionstherapien. Die therapeutischen Nutzen der hierbei genutzten Substanzen sind nur mit mäßiger Evidenz belegt [128]. Ziele der Injektionstherapie sind die Herabsetzung des Muskeltonus, die Schaffung von optimalen Bedingungen zur Muskelregeneration sowie die optionale Aspiration eines vorliegenden Traumahämatoms [176].

Zur Herabsetzung des Muskeltonus werden Lokalanästhetika mit lokal blockierender Wirkung der für das Aktionspotenzial wichtigen Natriumkanäle intramuskulär appliziert [116].

#### **2.4.4.1 Traumeel®**

Das Medikament Traumeel® ist ein homöopathisches Präparat bestehend aus 12 verschiedenen pflanzlichen Wirkstoffen, welches oral, topisch und intramuskulär appliziert werden kann [154]. Der genaue Wirkmechanismus des Medikamentes ist noch unbekannt, es wird jedoch eine inhibierende Wirkung auf die Ausschüttung von verschiedenen proinflammatorischen Substanzen vermutet [134].

#### **2.4.4.2 Actovegin®**

Actovegin® ist ein durch Hämodialyse gewonnenes, deproteinisiertes Präparat aus Kalbsblut, welches mehr als 200 niedrig molekulare Komponenten enthält. Dazu zählen Aminosäuren, Sphingolipide, Laktat, Succinate, Vitamine, Adenosin-Mono-Phosphat sowie Inositol-Phospho-Oligosaccharide [102]. Aufgrund dieser Komplexität an Substanzen war es bisher noch nicht möglich die biologisch aktiven Metaboliten eindeutig zu definieren [95]. Klinisch wird das Präparat seit mehr als 50 Jahren oral, topisch, intravenös oder intramuskulär zur Therapie bei verschiedenen Indikationen eingesetzt. Dazu zählen die diabetische Polyneuropathie, postpartale Hämorrhagien, Schlaganfälle und insbesondere Muskeltraumata [164]. Die genaue Wirkung des Präparates auf die Muskelheilung ist ebenfalls unklar, einzelne Studien

zeigen einen Einfluss auf die Muskelregeneration, Herabsetzung des Muskeltonus und Verkürzung der Return to play Zeit [176].

## **2.5 Muskeltraumamodelle**

Zur Erforschung der Physiologie und Pathologie der Muskeltraumata wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl an klinischen Studien durchgeführt. Dennoch liefern tierexperimentelle in-vivo und in-vitro Studien umfassende Erkenntnisse und beantworten Fragestellungen, welche im klinischen Studiensetting aufgrund ethischer Limitationen nicht bearbeitet werden können [61]. Daher ist eine Unzahl an Tiermodellen zur Erforschung von Muskeltraumata verfügbar. Passend zum jeweiligen Studiendesign und Fragestellung wurden hierzu Versuchstiere verschiedenster Größe und Anatomie ausgewählt. Hierunter zählen Kleintiere wie Maus [37,96,125] und Ratte [29,58], aber auch größere Säugetiere wie Hase [50,187,192] oder Hund [90]. Die Interpretation der Ergebnisse muss dabei immer die im Vergleich zum Menschen unterschiedliche Anatomie und Physiologie der Tiere berücksichtigen. Daher sollte die Übertragbarkeit auf den Menschen kritisch betrachtet werden [36,156]. Somit kann eine differenzierte Erforschung der Muskelphysiologie nur durch einen Konsens aus klinischen und tierexperimentellen Studien ermöglicht werden [137].

### **2.5.1 Tiermodelle**

#### **2.5.1.1 Maus**

Kleintiermodelle sind in der aktuellen Forschung ein etabliertes Mittel zur Durchführung von Studien mit Fragestellungen bezüglich Skelettmuskeltraumata. Aufgrund der genetischen Nähe [115] und ähnlichen Muskelphysiologie [72,86] zum Menschen eignet sich die Maus hervorragend als Versuchstier. Die Haltung und Zucht der Tiere ist kostengünstig und durch die Möglichkeit der Genmodulation der Maus existiert ein sehr breites Anwendungsspektrum. Nichtsdestotrotz wurden einige Unterschiede im Bereich der Muskelheilung zwischen Mensch und Maus wie zum Beispiel in der Aktivierung von Makrophagen [112] nach Trauma oder der Rekrutierung von Satellitenzellen [191] beschrieben und dürfen bei der Betrachtung der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden.

Zur Untersuchung von murinen Skelettmuskelverletzungen wurden bisher hauptsächlich Muskelkontusionsmodelle etabliert. Hierbei unterscheidet man das Muskelkontusionsmodell im Bereich des Unterschenkels (M. gastrocnemius) und im Bereich des Rückens unter Zuhilfenahme von Rückenhautkammern. In beiden Modellen wird die Muskelkontusion durch Aufsetzen eines Fallrohres und Fallenlassen eines Gewichtes auf den Zielmuskel verursacht [4,83,184]. Durch Amon et al. wurde ein Kontusionsmodell, bei dem ein Fallrohr (innerer Durchmesser 12mm) auf den M. gastrocnemius der Maus aufgesetzt wird und ein 30g

schweres Gewicht aus einer Höhe von 150mm auf die Extremität fallen gelassen wird, beschrieben [4].

Die bis dato publizierten Modelle zur Analyse von strukturellen Muskelverletzungen mit einhergehenden Rissen der Muskelfasern beziehen sich bisher nur auf Ratten als Versuchstiere. Contreras-Muñoz et al. beschrieben 2016 erstmals ein Punktionsmodell (18G Punktionsnadel) zur Induktion eines strukturellen Muskeldefektes. In der Studie wurde mittels einer 18G Punktionsnadel ein Defekt im Bereich des M. gastrocnemius der Ratte gesetzt und daraufhin per MRT-Untersuchung analysiert. Die MRT-Befunde korrelierten mit den MRT-Befunden humaner Sportler mit struktureller Muskelläsion [28]. Ein murines Modell zur Untersuchung dieser strukturellen Läsionen ist bisher nicht beschrieben.

#### **2.5.1.2 Ratte**

Ratten werden ebenfalls vielfach in der Muskeltraumaforschung als Versuchstier eingesetzt. Analog zur Maus werden verschiedene Modelle zur Trauma Applikation beschrieben, wie zum Beispiel Kontusions-, Lazerations- oder Überdehnungsmodelle [28,29,33,35,54,107]. Die größeren anatomischen Verhältnisse der Ratte sind dabei vorteilhaft und erleichtern etwaige Interventionen. Allerdings stellen Ratten einen deutlich höheren Zucht- und Haltungsaufwand dar [45].

#### **2.5.2 Zellmodelle/In-vitro Modelle**

In-vitro Modelle zur Muskeltraumaforschung sind in der Literatur weit verbreitet. Hierbei werden unter Zuhilfenahme etablierter Methoden wie z.B. (genmodulierter) Zellkulturen, zelluläre Mechanismen des Skelettmuskeltraumas und der Muskelregeneration erforscht [105] [123] [174]. Zum anderen können isolierte Parameter wie Reißfestigkeit, Dehnungsfähigkeit und Kontraktilität der Muskulatur untersucht werden [12] [103] [169]. Hier wird die Muskulatur des Versuchstiers z.B. extrahiert und in einer Nährlösung gelagert. Durch eine exzentrische Überdehnung während der Kontraktion wird dabei ein Muskeltrauma zugefügt [100].

## **2.6 Untersuchungsmethoden**

### **2.6.1 MRT**

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein weit verbreitetes, bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Struktur und Funktion verschiedener Gewebearten. Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der Kernspinresonanz [84]. Dabei werden gezielt magnetisch potente Atomkerne des zu untersuchenden Gewebes durch eine Kombination von statischen und hochfrequenten magnetischen Feldern angeregt. Bis zum Abklingen dieser Anregung kann eine Wechselfeldspannung gemessen werden, welche in ein optisches Signal umgewandelt wird [38].

In der exakten Diagnosestellung einer Muskelverletzung ist der klinische Befund wegweisend, jedoch ohne weiterführende Bildgebung durch MRT und Ultraschall keineswegs vollständig. Bei klinischem oder sonographischem Verdacht auf eine strukturelle Läsion, sollte eine MRT-Untersuchung des betroffenen Muskels durchgeführt werden. Hier kann zum einen das Ausmaß und die genaue Defektlokalisierung gezeigt werden und zum anderen, ob eine Beteiligung der Muskelsehne zu erwarten ist [175].

Zur Bildgebung von Kleintieren können die ubiquitär verfügbaren, klinischen MRT-Scanner nur bedingt herangezogen werden. Die Bildgebung von außerordentlich kleinen Gegenständen wie Versuchstieren (Mäuse, Ratten etc.) ist mit klinischen MRT-Geräten und einer Feldstärke von 1-3 Tesla (T) nur durch spezielle Spulen durchführbar. Kleintier-MRT mit kleiner Bohrung und einer verfügbaren Feldstärke von 4,7 bis 16,4 T erzielen hierbei deutlich bessere Auflösungen [20]. Neben den technischen Vorteilen der Kleintier-MRT bringt die Verfügbarkeit eines experimentellen Kleintier-MRT zahlreiche praktikable Aspekte, wie eine Verfügbarkeit zur tierexperimentellen Nutzung rund um die Uhr mit sich [87].

### **2.6.2 Ultraschall/Photoakustik**

Die Sonographie bzw. Ultraschall Diagnostik (US) ist ein bildgebendes Verfahren zur Untersuchung von Gewebe unter Zuhilfenahme von Ultraschallwellen. Hierbei werden mittels des piezoelektronischen Effektes Ultraschallwellen von einer Sonde emittiert, vom Gewebe reflektiert und schließlich von derselben Sonde aufgefangen. Da verschiedene Gewebearten die Wellen unterschiedlich reflektieren, kann so eine Differenzierung ermöglicht werden [181].

Die Ultraschall Diagnostik stellt ebenfalls einen wichtigen Teil der Diagnostik eines Muskeltraumas dar. Hier kann ein intramuskuläres Traumahämatom nachgewiesen werden. Zusätzlich kann durch eine Ultraschalluntersuchung des Muskels auch eine Differenzierung zwischen funktioneller oder struktureller Muskelverletzung erfolgen [64,116]. Die Ultraschalluntersuchung eines Muskels ist schnell verfügbar, kosteneffizient und dynamisch. Dies macht sie im Gegensatz zum MRT zu einem wertvollen Werkzeug für Folgeuntersuchungen [116].

In der Kleintierforschung wird ebenfalls hochauflösender Ultraschall (hrUS) genutzt. Weiterhin etabliert sich zunehmend, nach der Erstbeschreibung durch Needles et. al., photoakustisch induzierter Ultraschall (PAI). Im Gegensatz zum herkömmlichen Ultraschall wird hier das zu untersuchende Gewebe mit kurzen Laserimpulsen angeregt [104]. Durch die Anregung erfolgt eine thermoelastische Ausdehnung, wobei gewebespezifische Ultraschallwellen erzeugt werden, welche auf etabliertem Wege detektiert werden können. Dabei kann eine deutlich höhere Auflösung und Eindringtiefe ins Gewebe erreicht werden [126].

Außerdem können unter Zuhilfenahme des PA-Ultraschalls im experimentellen Rahmen *in vivo* nicht-invasive Messungen des Hämoglobingehaltes sowie der Sauerstoffsättigung mit einer Ultraschallbildgebung kombiniert werden [188]. Hierbei werden durch Laserimpulse mit einer Wellenlänge von 750-850nm oxygenierte sowie desoxygenierte Hämoglobinmoleküle angeregt und, wie oben beschrieben, durch thermoelastische Ausdehnung zur Emission von Ultraschall gebracht. Die emittierten Ultraschallwellen werden dann bei 750nm und 850nm erfasst und durch Ausnutzung der unterschiedlichen Lichtabsorptionsspektren von desoxygeniertem und oxygeniertem Hämoglobin spektral entmischt [120]. Die Gleichung, die den Absorptionskoeffizienten von Blut als lineare Kombination der Absorption der beiden Hämoglobinarten ausdrückt, wird für die Signale der beiden Wellenlängen gelöst, um die Konzentrationen von oxygeniertem (HbO<sub>2</sub>) und desoxygeniertem (Hb) Hämoglobin zu bestimmen [82]. So kann durch weitere Berechnungen die Sauerstoffsättigung (sO<sub>2</sub>) und der Hämoglobingehalt (HbT=Hb total) der Region of interest (ROI) berechnet und dargestellt werden. Hierdurch sind bildgebende Verfahren wie MRT oder hrUS/PAI in der Kleintierforschung unverzichtbar [28,53,97,189].

### **2.6.3 Ganganalyse**

Eine Ganganalyse dient zur Erfassung und Analyse des Ganges eines Probanden. Dabei kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Das Spektrum beinhaltet markerbasierte Analysen [22], kinematische Untersuchungen [9], kinetische Analysen [68], aber auch Untersuchungen im Bereich der Elektromyographie [88]. Heutzutage erfolgt standardmäßig eine videobasierte 3D-Analyse des Gangbildes [135]. Hierbei unterscheidet man wiederum markerbasierte System und Systeme, die gänzliche ohne Marker auskommen [117].

Im klinischen Alltag wird eine Ganganalyse aufgrund einer Vielzahl von Fragestellungen wie etwa als Baustein in der Indikationsstellung zum Gelenkersatz bei Arthrose [119,132] oder bei sportmedizinischen Analysen [138,160,179] durchgeführt.

Die Ganganalyse am Kleintiermodell kann ebenfalls durch verschiedene Methoden erfasst werden. Dabei unterscheidet man gezwungene Methoden [14] und Methoden, welche für die Tiere freiwillig durchführbar sind [13]. In der vorliegenden Studie wurde die nicht auf Zwang basierte Ganganalyse mittels CatWalk (Noldus, Wageningen, Niederlande) genutzt, entwickelt

1996 von Frank Hamers und veröffentlicht 2005 durch die Firma Noldus. Hierzu liegen in der Literatur eine Vielzahl von Studien zur Nutzung des CatWalks (Noldus, Wageningen, Niederlande) im Bezug auf ein breites Spektrum an Indikationen vor [13,51,55,70]. Es wurden bisher jedoch keine Untersuchungen hinsichtlich Gangbildveränderungen nach Muskeltraumata beschrieben.

#### **2.6.4 Schieblehre**

Die Messung des Muskeldurchmessers an einem klar definierten Bereich des M. gastrocnemius via Schieblehre ist eine simple, effiziente und zeitsparende Methode zur Quantifizierung einer Extremitätenschwellung im Kleintiermodell. Bisher wurde das Modell in der Erforschung von Lymphödemen eingesetzt [18,53]. Ein Einsatz zur Quantifizierung der Schwellung nach Muskeltrauma ist bisher nicht bekannt.

#### **2.6.5 Histologie**

##### **2.6.5.1 Histologie/Immunhistochemie**

Mit einer histologischen Untersuchung können die mikroskopische Anatomie und Pathologie eines Gewebes dargestellt werden. Hierzu werden die vorgesehenen Gewebeproben nach standardisierten Prozessen fixiert, in mikrometerdünne Scheiben geschnitten, gefärbt und dann unter einem Mikroskop untersucht und analysiert [98]. Zur differenzierten Analyse können durch Zugabe von Antikörpern spezifische immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden [92].

##### **2.6.5.2 HE Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ist die am häufigsten genutzte histologische Färbung und wird zur allgemeinen, histologischen Gewebedifferenzierung und Anfertigung von Übersichtsschnitten verwendet [7]. Dabei werden Zellkerne typischerweise blau dargestellt, das Zytoplasma, einschließlich Muskulatur und Erythrozyten, rot [98]. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, welcher aus dem Blauholzbaum gewonnen wird [183], Eosin hingegen ein synthetischer Farbstoff.

##### **2.6.5.3 CD-68 Färbung**

CD-68 oder auch Macrosialin ist ein membranständiges Glykoprotein, welches typischerweise auf der Oberfläche von menschlichen Monozyten sowie Makrophagen vorkommt, und somit als Zellmarker für diese Zellart dienen kann [67]. Macrosialin ist weiterhin genauso auf der murinen Zellmembran der Monozyten und Makrophagen zu finden und daher zum histologischen Nachweis dieser Zellgattung geeignet [32,37].

#### **2.6.5.4 Ki-67 Färbung**

Ki-67 (Ki-67) ist ein Protein, das von Zellen während der Zellteilung stark exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist es bei sich nicht teilenden Zellen nur im inneren Zellkern zu finden. Hierdurch kann die Expression von Ki-67 zum Nachweis einer Zellproliferation herangezogen werden [155]. Im klinischen Alltag wird Ki-67 bei der Tumordiagnostik eingesetzt [57].

#### **2.6.5.5 MPO Färbung**

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der neutrophilen Granulozyten und Monozyten und spielt eine Rolle in der unspezifischen Phagozytose von fremden Zellen und Mikroorganismen im Körper [93]. Mit der Myeloperoxidase kann eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten detektiert werden [111].

#### **2.6.5.6 Caspase-3 Färbung**

Die Caspase-3 ist eine Protease und hat ihre Funktion im Rahmen der Proteolyse während der Apoptose. Die Caspase-3 wurde in menschlichen Zellen, aber auch in Kleintiermuskelzellen nachgewiesen [133]. Nach Beginn des Apoptosesignalweges über den extrinsischen oder intrinsischen Weg der Zelle wird die Caspase-3 durch die Caspase-8 in ihre aktive Form gespalten [109]. Immunhistochemisch sind spezielle Antikörper zur Markierung dieser aktiven Form verfügbar. Hierdurch können Zellen im Stadium der Apoptose quantifiziert werden [150].

## **2.7 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit war die Analyse der Muskelheilung durch ein bereits in der Literatur etabliertes Kontusionsmodell und eines neuartigen Punktionsmodells. Dabei sollte untersucht werden, ob das Punktionsstrauma, im Gegensatz zum bereits mehrfach validierten Kontusionstrauma, eine adäquate Alternative für eine auf den Menschen übertragbare Untersuchung der Muskelheilung ermöglicht.

Zudem wurde die Durchführbarkeit wiederholter in-vivo Analysen zur Analyse der Muskelheilung mit hrUS, PAI, MRT und Ganganalyse sowie die Auswirkungen der verschiedenen Muskeltraumata auf die Ganganalyse erforscht.

## **2.8 Fragestellung**

Bisher ist eine Anwendung des Punktionsmodells in einer murinen Studie nicht bekannt. Weiter wurde die gewählte Kombination posttraumatischer Analysen bisher nicht durchgeführt und auf eine Durchführbarkeit überprüft. Zudem existieren nur vereinzelte Studien zur Auswirkung von Skelettmuskeltraumata auf das Gangbild.

Die Nullhypothesen  $H_0$  definieren sich wie folgt:

- I. Das Punktionstraumamodell ist nicht geeigneter zur Analyse der murinen Skelettmuskelheilung als das Kontusionstraumamodell.
- II. Die Kombination aus wiederholter Ultraschallmessung, PAI, MRT, Histologie und Ganganalyse ist zur posttraumatischen Analyse der murinen Muskelheilung nicht durchführbar.
- III. Verschiedene Muskeltraumamodelle haben keinen Einfluss auf die Ganganalyse.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Intervention**

#### **3.1.1 Versuchsprotokoll**

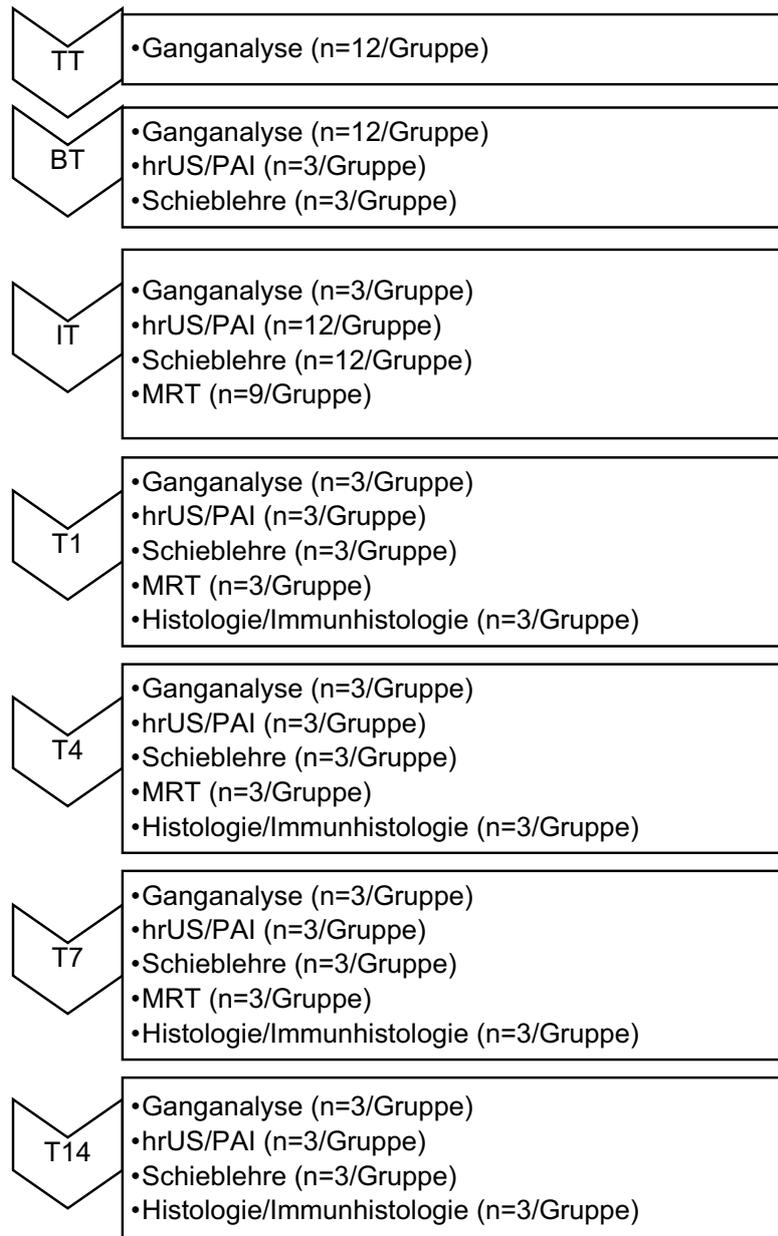
Unter Berücksichtigung der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes wurde der Tierversuch am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Das Projekt wurde unter der Versuchsnummer AZ 37/2017 von der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt.

Für die Durchführung des Versuches wurden insgesamt 24 Mäuse verwendet. Davon erhielten 12 ein Kontusionstrauma am linken M. gastrocnemius, weitere 12 erhielten ein Punktionstrauma des linken M. gastrocnemius. Als Kontrolle dienten die unverletzte rechte Seite sowie der prätraumatische Zustand des linken untersuchten M. gastrocnemius. Posttraumatisch und über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde eine analgetische Therapie mittels Tramadol (1mg/ml im Trinkwasser, Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) sichergestellt. Die Tiere hatten so einen dauerhaften Zugang zu analgetischer Therapie über das Trinkwasser.

Die funktionelle Auswertung mittels CatWalk wurde an Tag 0 prätraumatisch = Baselinetag = BT, Tag 0 posttraumatisch = Interventionstag = IT, Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 14 posttraumatisch durchgeführt. Es erfolgte zudem ein Trainingstag (TT) am Gerät an Tag -1.

Die volumetrisch-radiologische Auswertung erfolgte durch hrUS/PAI und Schieblehre an Tag 0 (BT) prätraumatisch, Tag 0 posttraumatisch (IT), Tag 1, Tag 4, Tag 7 & Tag 14 posttraumatisch sowie durch MRT an Tag 0 (IT), Tag 1, Tag 4 und Tag 7 posttraumatisch.

Die lichtmikroskopische und immunhistochemische Analyse erfolgte an Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 14 posttraumatisch.



**Abb. 3** Übersicht über Zeitverlauf und verwendete Methodik der einzelnen Untersuchungszeitpunkte. TT=Trainingstag, BT= Baselinetag, IT= Interventionstag

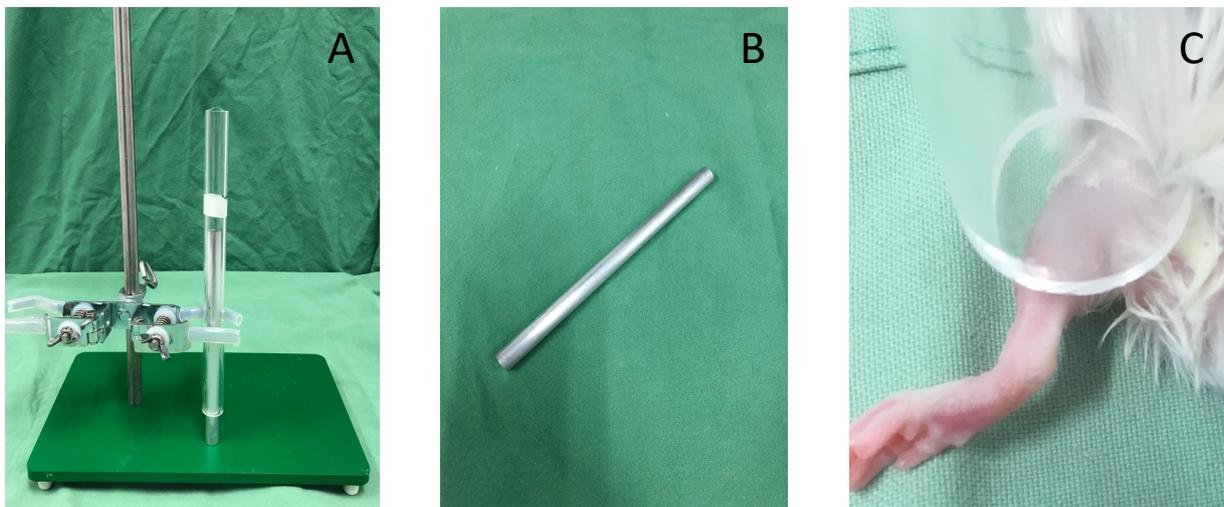
### 3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten C57BL/6N-Tyrc-Brd/BrdCrCl Mäuse. Diese wiesen ein Körpergewicht zwischen 25-35g auf. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg. Die Tiere wurden unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit 60%) mit einem 12-stündigen Tag-/Nachtrythmus in Käfigen bis zu 5 Mäusen gehalten. Ein Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform ad libitum sowie Wasser wurden bereitgestellt.

### 3.1.3 Traumamodelle

#### 3.1.3.1 Kontusionstrauma

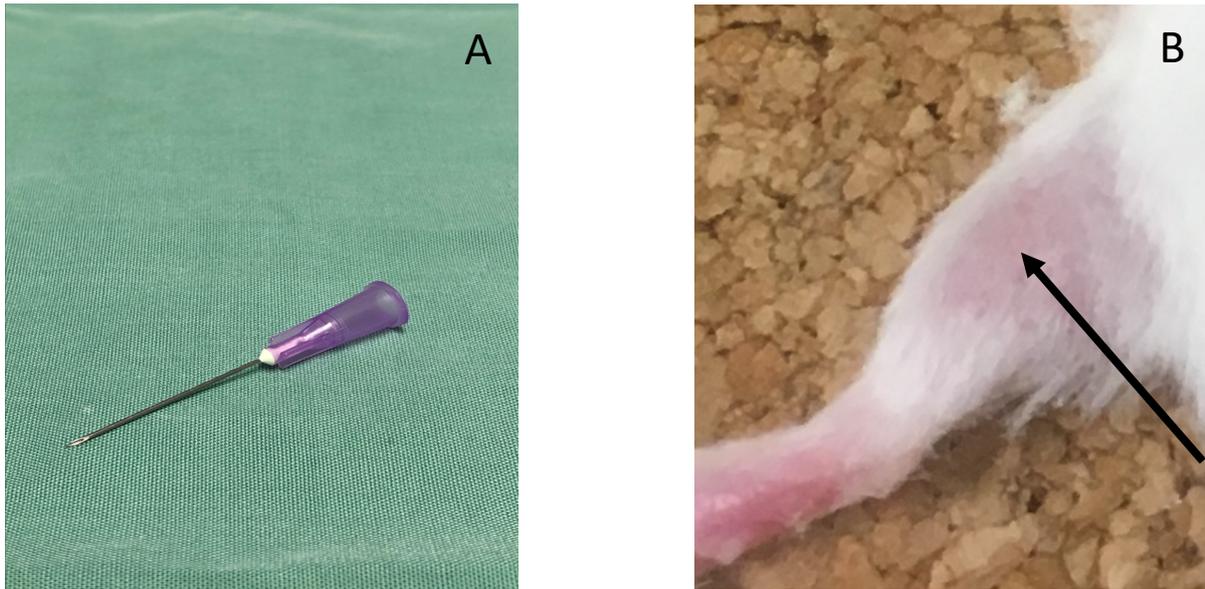
Zur Applikation des Kontusionstraumas erfolgte eine Isofluran-Narkose (Initialdosis: 4%, Erhaltungsdosis: 2%). Nach Rasur des linken Hinterlaufes erfolgte das Aufsuchen der richtigen Applikationsstelle an der Unterschenkelrückseite, indem das linke Kniegelenk in Extension und der Fuß in 90° Dorsalextension platziert und durch Leukosilk (Leukosilk®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) auf dem Untergrund fixiert wurde. Dort wurde nun ein Fallrohr (innerer Durchmesser 12mm) platziert. Durch das Fallrohr wurde ein 30g schwerer Metallzylinder aus einer Höhe von 150mm auf den linken M. gastrocnemius fallen gelassen.



**Abb. 4** (A) Fallrohr, (B) 30g Metallzylinder (DELWO Metall GmbH, Neunkirchen, Deutschland), (C) Positionierung des Fallrohres auf dem linken hinteren M. gastrocnemius

#### 3.1.3.2 Punktionstrauma

Zur Applikation des Punktionstraumas wurde eine Isofluran-Narkose (Initialdosis: 4%, Erhaltungsdosis: 2%) eingeleitet. Nach Rasur des linken Hinterlaufes erfolgte das Aufsuchen der richtigen Applikationsstelle an der Unterschenkelrückseite, indem das linke Kniegelenk in Extension und der Fuß in 90° Dorsalextension platziert und durch Leukosilk (Leukosilk®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) auf dem Untergrund fixiert wurde. Dann wurde der linke M. gastrocnemius unter sterilen Bedingungen mit einer 24G Kanüle (Sterican®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in einem Winkel von 90° punktiert.



**Abb. 5** (A) 24G Punktionsnadel (B) Stichführung bei Traumaapplikation am linken hinteren M. gastrocnemius

### 3.1.4 MRT

Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen erfolgten in Isofluran-Narkose (Initialdosis: 4%, Erhaltungsdosis: 2%) unter Überwachung von Atem- und Herzfrequenz (Graseby infant respiration sensor, Smiths Medical, Dublin, OH; Software: PC-SAM32, SA Instruments Inc., Stony Brookm NY) an einem 9,4 T Tier-MRT mit horizontaler Bohrung (BioSpec Avance III 94/20; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany) und einem BGA12S Gradientensystem (maximale Feldstärke 675mT/m, linear induktive Anstiegszeit 130 $\mu$ s, maximale Slew-Rate 4673 mT/m/s), administriert durch das Programm Paravision 6.0.1 (Bruker Biospin Inc., Billerica, MA, USA). Zur Durchführung wurde eine linear polarisierte Spule (innerer Durchmesser: 38mm), optimiert zur Darstellung des murinen Abdomens, benutzt. Die Bildgebung von Extremitäten ist anfällig für partielle Volumenstöreffekte, was durch ein wassergefülltes Phantom ausgeglichen wurde. So konnte eine zufriedenstellende Homogenität des Magnetfeldes gewährleistet werden. Alle Tiere wurden auf einer definierten Lagerungsschiene in Bauchlage mit dem Schwanz zuerst in das Gerät geschoben.



**Abb. 6** 9,4 T Kleintier-MRT (BioSpec Avance III 94/20; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany)[194]

### 3.1.4.1 MRT-Protokoll

Initial wurde ein „fast low angle shot based“ 3D localizer durchgeführt zur Kontrolle der richtigen Platzierung des Tieres im Isozentrum und Einstellung der Schichtgröße. Darauffolgend wurde ein sorgsames iteratives Shimmen in 8 verschiedenen Richtungen, zum Ausgleich von B0-Inhomogenitäten des Magnetfeldes, durchgeführt. Nach dem Shimmen wurden Larmor-Frequenz, Resonanzfrequenz, Radiofrequenzpulsstärke sowie Receiver Gain darauf abgestimmt. Die Akquisition der Bilder erfolgte durch ein T2-Turbo-RARE-Protokoll. Dabei wurden 2D-Aufnahmen in 3 Ebenen (coronar, transversal, axial), 2D Dünnschichtaufnahmen sowie 3D Aufnahmen durchgeführt (vgl. Tab 1.).

Sequenz	Protokoll	TR (ms)	TE (ms)	Flip angle (°)	Schichtdicke (mm)	NA
T2 2D	Turbo-RARE	4500	41	90	0,9	2
T2 2D D	Turbo-RARE	4500	41	90	0,4	2
T2 3D	Turbo-RARE	1000	45	90	0,125	1

**Tab. 1** MRT-Sequenz Parameter; T2 2D D: T2-Dünnschichtaufnahme, TR: Repetitionszeit, TE: Echozeit, NA: number of averages

### 3.1.5 hrUS/PAI

Zur Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere in Isofluran Narkose (Initialdosis 4%, Erhaltungsdosis: 2%) versetzt und in Bauchlage unter Temperatur- und Herzfrequenzmonitoring (Temperatur- und Herzfrequenzmonitoring-System für Mäuse THM-100, Indus Instruments, Houston, TX, USA) auf einer Heizplatte fixiert. Darauffolgend wurde die Untersuchungsstelle am M. gastrocnemius der Maus durch Enthaarungscreme enthaart. Dies dient dazu Interferenzen während der Ultraschalluntersuchung durch im Fell vorhandene

Luft zu vermeiden. Zur Untersuchung wurde, den gesamten Messbereich umfassend, Ultraschallgel (Aquasonic 100, Parker, Fairfield, NJ, USA) aufgetragen. Die Messung wurde durch das Visual Sonics Vevo 2100 small animal ultrasonography system (FUJIFILM Visual Sonics, Toronto, Canada) mit einem 40MHz Schallkopf durchgeführt. Die Photoakustik erfolgte durch das Vevo LAZR photoacoustics Imaging System (FUJIFILM Visualsonics, Toronto, Canada).

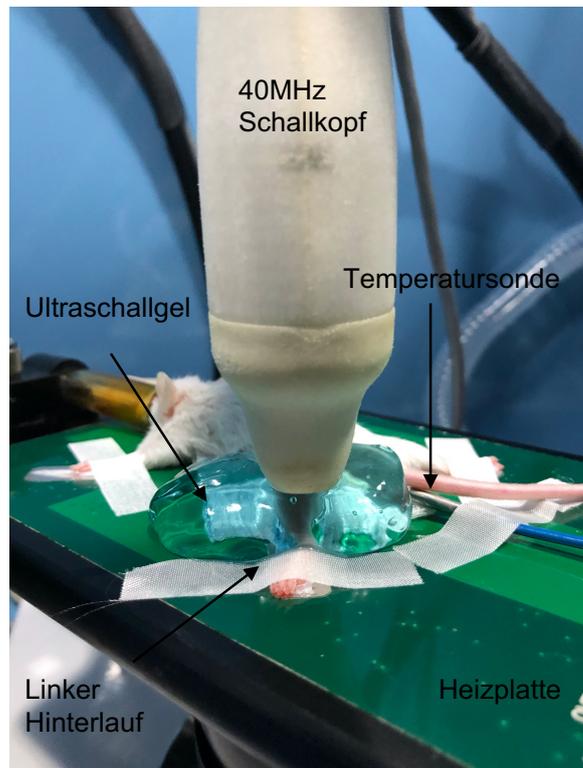


Abb. 7 Aufbau der hrUS/PAI Untersuchung

### 3.1.5.1 hrUS/PAI-Protokoll

Nachdem die Unterschenkelhinterseite der Maus im Fokus fixiert wurde, wurde die Ultraschalluntersuchung gestartet. Hierzu wurde der 40MHz-Schallkopf mit einer motorisierten Gleitschiene in einer linearen Bewegung über den M. gastrocnemius bewegt. Dies erzeugte (saggito-)transversale 2D-Schnitte in einem Abstand von  $100\mu\text{m}$ , welche im konventionellen B-Mode dargestellt werden können. Aus diesen Schnitten konnte im nächsten Schritt ein 3D-Model rekonstruiert werden.

Die photoakustischen Messungen erfolgten daraufhin im OxyHemo Modus des Vevo LAZR Systems. Wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben erfolgte die Messung des oxygenierten und desoxygenierten Hämoglobins durch Laserimpulse im Bereich einer Wellenlänge von 750-850nm. Hieraus wurde dann eine Sauerstoffsättigungskarte rekonstruiert in der rote und blaue Pixel stark sauerstoffangereicherte Regionen bzw. weniger sauerstoffangereicherte Regionen darstellen. Diese wiederum wurde mit Graustufen-B-Mode-Ultraschallbildern überlagert, die gleichzeitig mit der PAI aufgenommen wurden. Äquivalent erfolgte die Darstellung der

Gesamthämoglobinkonzentration (HbT) im untersuchten Gewebe. Die Bildparameter wurden zwischen den Tieren und Untersuchungszeitpunkten konstant gehalten (vgl. Tab. 2).

Untersuchung	Frequenz	Gain	Wellenlänge	Schichtdicke
hrUS	40MHz	2dB	680-970nm	100 $\mu$ m
PAI	40MHz	45dB	750/850nm	100 $\mu$ m

Tab. 2 Geräteinstellungen hrUS/PAI

### 3.1.6 Schieblehre

Durch eine elektronische Schieblehre wurde während der gesamten Untersuchungszeitpunkte der Unterschenkeldurchmesser der Mäuse beidseitig gemessen. Die Messung wurde während der Aufwachphase aus der Isoflurannarkose nach der Ultraschalluntersuchung in transversaler Technik standardisiert durchgeführt. (vgl. Abb. 9).

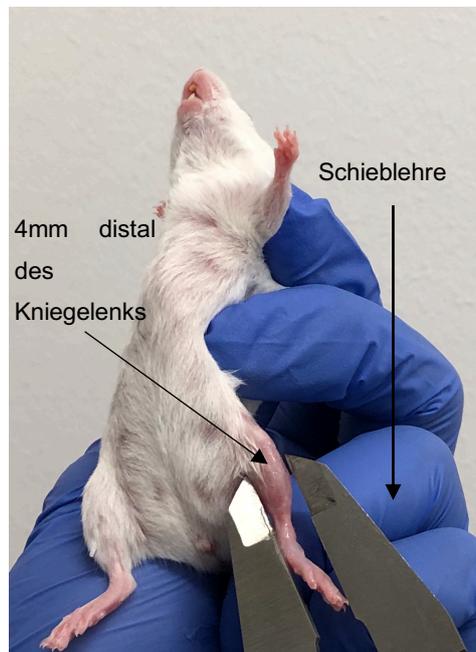


Abb. 8 Messung des Extremitätendurchmessers am Hinterlauf der narkotisierten Maus 4mm distal des Kniegelenkes mit der Schieblehre

### 3.1.7 Ganganalyse

Die Analyse des Gangbildes der Versuchstiere erfolgte in regelmäßigen Abständen ab Tag 0 prätraumatisch (BT), Tag 0 (IT), Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 14 posttraumatisch mittels CatWalk XT 10 (Noldus, Wageningen, Niederlande). Um die Versuchstiere an das CatWalk zu gewöhnen erfolgte an Tag 1 prätraumatisch (TT) ein Trainingsdurchlauf am Gerät. Die Kalibrierung der Kamera erfolgte gemäß Herstellerangaben und nach aktueller Literatur (vgl. Tab.3)[15,65,130]. Weiterhin sind die Kriterien für einen erfolgreichen Lauf in Tabelle 3

zusammengefasst. Läufe, die außerhalb der definierten Kriterien aufgezeichnet wurden, wurden nicht gewertet. Aus fünf gültigen Läufen einer Maus wurden die zur Analyse des Gangbildes relevanten Parameter errechnet.

Kameraeinstellungen				Runkriterien		
Camera gain (dB)	Green Intensity Threshold	Red Ceiling Light (V)	Green Walkway light (V)	Durchlaufzeit (s)	Max. Speed Variability (%)	Anzahl gültiger runs/Maus
13,80	0,2	17,7	16,5	0,5-5	60	5

**Tab. 3** Kalibrierungs- und Durchführungsparameter des CatWalk XT10

Die Messungen wurden in einem abgedunkelten und ruhigen Raum entsprechend der Herstellerempfehlungen und im Vergleich zu aktuellen Studien durchgeführt. Zur Durchführung einer Messung wurde die Maus in das CatWalk XT10 gesetzt. Die Maus durchlief hierbei einen Gang (Länge: 130cm, Breite 4 cm) in dessen Boden sich eine Glasplatte befindet. In der Mitte des Ganges befindet sich unterhalb der Glasplatte eine Hochgeschwindigkeitskamera (Abstand: 34cm). Die Glasplatte im Boden des Ganges wird zudem dauerhaft durch grünes Licht bestrahlt, welches jedoch, wenn sich kein Hindernis auf der Glasplatte befindet, vollständig absorbiert wird. Wird das Licht durch die Pfote einer Maus reflektiert entsteht für die Dauer des Kontaktes ein Abdruck auf der Glasplatte. Durch die Hochgeschwindigkeitskamera wurden nun, während des Auf- und Ablaufens im CatWalk XT10, die jeweiligen Pfotenabdrücke innerhalb eines umschriebenen Bereiches aufgezeichnet. Um einen möglichst natürlichen Gang der Mäuse zu erzielen wurden keine Lockmittel eingesetzt und die Mäuse konnten sich frei von Seite zu Seite bewegen.

### 3.1.8 Histologie

Zur histologischen Untersuchung wurden die entnommenen Muskelpräparate in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die so entstandenen Blöcke wurden daraufhin durch ein Rotationsmikrotom (Leica RM2125RT, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) in 1µm große Schichten geschnitten, nach standardisiertem Verfahren auf einen Glasobjektträger aufgebracht und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### 3.1.9 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Standardprotokollen bestehend aus den Teilschritten Gewebepreparation, Antikörperinkubation und Visualisierung durch die Streptavidin-Biotin-Methode durchgeführt. Hierbei wurden als Antikörper Anti-Myeloperoxidase (ab9535, Abcam, Cambridge, UK 1:100), Anti-Caspase-3 (9664, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, 1:100), Anti-CD-68 (ab125212, Abcam, Cambridge, UK, 1:200) und Anti-Ki-67 (12202, Cell Signaling, Danvers, MA, 1:500) verwendet.

### 3.1.10 Tötung der Tiere

Die Tiere wurden zum Ende des jeweiligen Untersuchungszeitpunktes, um weitere Analysen zu ermöglichen, unter CO<sub>2</sub>-Narkose gestreckt und damit durch Genickbruch getötet.

### 3.1.11 Explantation des Muskels

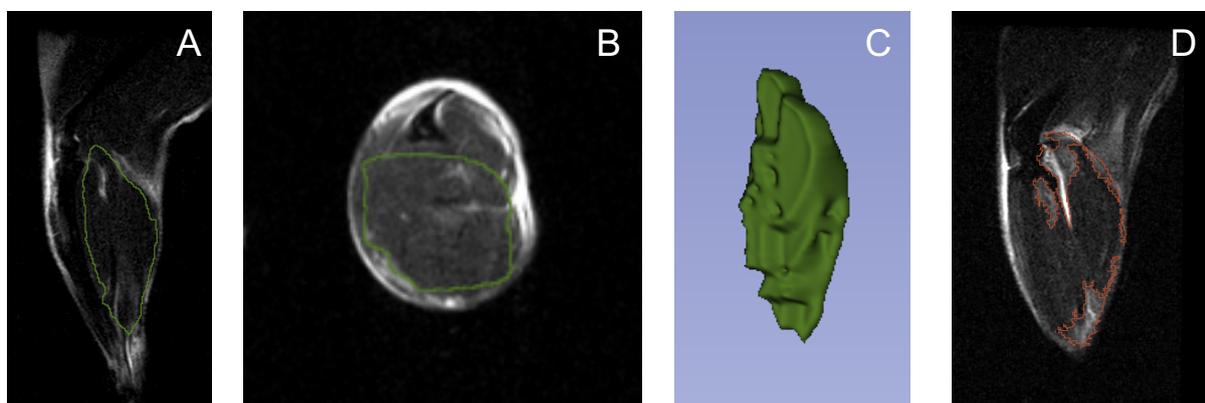
Zur Explantation des Muskels post mortem wurde die Haut am Unterschenkel der Länge nach eröffnet. Mit Skalpell und Schere wurde der Muskel an seinem Ursprung am Kniegelenk und Ansatz an der Achillessehne präpariert und abgesetzt. Daraufhin wurde der Muskel gänzlich explantiert und in Formalin fixiert. Die Explantation erfolgte beidseitig.

## 3.2 Zielkriterien und Auswertung

### 3.2.1 MRT

Nach Akquisition der Daten wurden diese durch die Betriebssoftware des MRTs (Paravision 6.0.1, Bruker Biospin Inc., Billerica, MA, USA) als 2D- und 3D-Aufnahmen rekonstruiert und als DICOM-Dateien zur weiteren Auswertung exportiert. Die Auswertung der DICOM-Daten erfolgte durch die open source medical imaging computing platform 3DSlicer (3DSlicer v.10.2, <http://www.slicer.org>, abgerufen 2020 Okt. 8)[43].

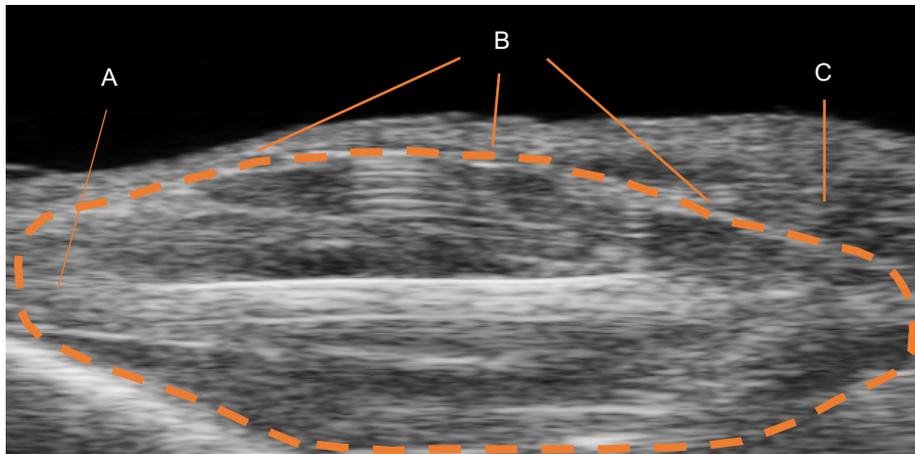
Die Volumenmessung des M. gastrocnemius wurde durch manuelles Abzeichnen des Muskelumfanges durchgeführt. Dabei wurde der Muskel in seinem gänzlichen Umfang vom Ursprung am Kniegelenk bis zum Beginn des Ansatzes der Achillessehne anhand der axialen und sagittalen Bilder schichtweise umfahren und ausgemessen. Aus den so erhaltenen Daten wurde durch 3DSlicer ein dreidimensionales Volumen rekonstruiert, welches auch als dreidimensionales Modell dargestellt werden kann. Durch die Level-tracing-Funktion des Segment Editors von 3D Slicer wurde zudem das Volumen des posttraumatischen Hämatoms bestimmt. (vgl. Abb. 9).



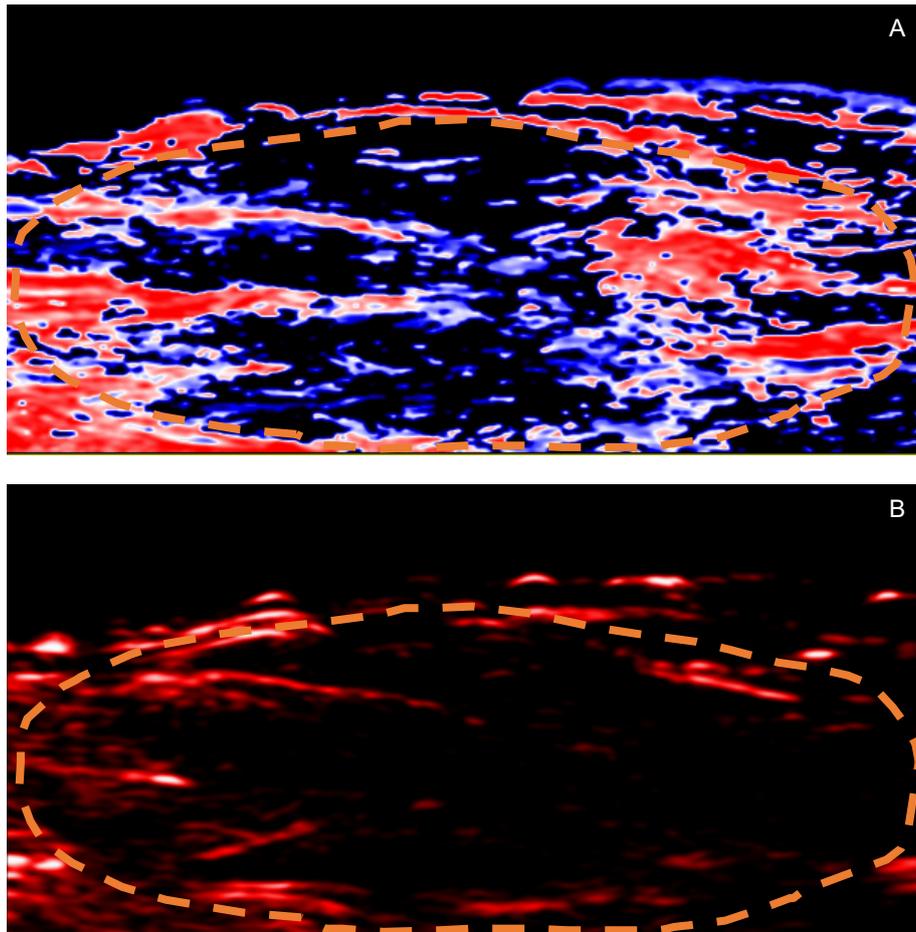
**Abb. 9** Ausmessung des Muskelvolumens durch Umfahren der ROI im (A) Saggital- und (B) Axialschnitt, (C) 3D-Rekonstruktion der ROI, (D) Umfahren des Traumahämatomes

### 3.2.2 hrUS/PAI

Die erhobenen Ultraschall-Daten wurden gespeichert und exportiert. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm Vevo Lab (Vevo Lab v. 3.1.1, FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, ON, Canada). Durch schichtweises Identifizieren des gesamten Muskelumfanges wurde durch die volumetrische Analysefunktion des Programmes das Volumen des Muskels bestimmt. Zur besseren Orientierung erfolgte die Etablierung einiger anatomischer Landmarks (vgl. Abb. 8). Die weiterführenden Analysen beinhalteten die Erfassung des durch PAI gemessenen sO<sub>2</sub> und HbT (HemoMeazure und OxyZated, Visual Sonics Inc., Toronto, Canada) Gehalts im untersuchten Gewebe. Zur Erfassung des HbT Gehaltes des Muskels wurde der Hämoglobingehalt durch das erfasste Muskelvolumen geteilt (HbT/ROI (1/ mm<sup>3</sup>)).



**Abb. 10** B-Bild, transverso-sagittale Schnittführung des M. gastrocnemius, eingezeichnete Landmarks: (A) Beginn der Achillessehne, (B) dorsale Muskelfaszie, (C) Kniekehle, gestrichelte Linie: ROI.



**Abb. 11** PAI-Modus (A) Sauerstoffsättigungskarte (sO2) mit oxygenierten (rot) und desoxygenierten (blau) Anteilen, (B) Darstellung der Hämoglobinkonzentration HbT (rot) im untersuchten Gewebe. Gestrichelte Linie: ROI

Parameter	Definition
Vol. mm <sup>3</sup>	Volumen der ROI
sO2 avr. 3D %	Sauerstoffsättigung des gesamten Bildausschnittes
sO2 avr. tot. 3D %	Sauerstoffsättigung in der ROI
HbT avr. 3D	Gesamtzahl des Hämoglobins bestehend aus Oxygeniertem und Desoxygeniertem Hämoglobin
HbT/mm <sup>3</sup>	Gesamthämoglobin bezogen auf die ROI

**Tab. 4** Definitionen der gemessenen Parameter von hrUS/PAI

### 3.2.3 Ganganalyse

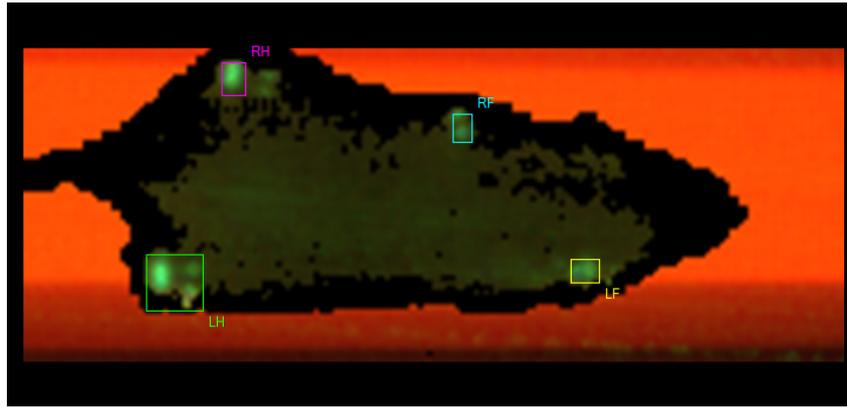
Nach Ablauf der jeweiligen Messung wurden die aufgenommenen Bilder mittels der Software des CatWalk XT10 (Noldus, Wageningen, Niederlande) ausgewertet. Primär erfolgte eine automatische Auswertung des Gangbildes, bei welcher dem jeweiligen Pfotenabdruck der Maus die richtige Orientierung (vorne, hinten, links, rechts) zugeordnet wurde (vgl. Abb. 12). Im nächsten Schritt erfolgte die sorgsame Kontrolle der Auswertung durch den Untersucher. Die erhobenen Daten konnten dann nach folgenden Parametern weiter analysiert werden (Vgl. Tab.5).

---

<b>Parameter</b>	<b>Definition</b>
<b>Run duration (s)</b>	Länge eines einzelnen Laufes
<b>Stand (s)</b>	Kontaktdauer der Pfote mit der Glasplatte
<b>Stride length (cm)</b>	Gemessene Distanz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pfotenabdrücken
<b>Swing(s)</b>	Schwungphase der Pfote ohne Kontakt zur Glasplatte
<b>Step cycle (s)</b>	Zusammengesetzt aus Stand und Swing, gemessen bei Erstkontakt der Pfote
<b>Duty cycle (%)</b>	Anteil der Belastungsphase eines Schrittzklus
<b>Print area (cm<sup>2</sup>)</b>	Oberflächenmessung des vollständigen Pfotenabdruckes
<b>Max Contact area (cm<sup>2</sup>)</b>	Maximale Kontaktfläche einer Pfote
<b>Max Contact Max Intensity (pixel)</b>	Maximale Intensität bei maximalem Kontakt einer Pfote
<b>Max Contact Mean Intensity (pixel)</b>	Beschreibt die mittlere Intensität gemessen bei maximalem Kontakt

---

**Tab. 5** Definitionen der gemessenen Parameter im CatWalk XT 10 (Noldus, Wageningen, Niederlande)



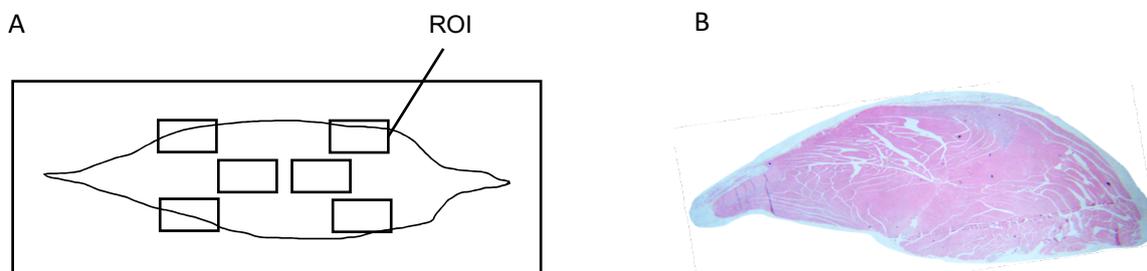
**Abb. 12** Maus während eines Runs mit beschrifteten Pfotenabdrücken RH=right hind, RF=right front, LH=left hind, LF=left front

### 3.2.4 Schieblehre

Durch die elektronische Schieblehre wurde der Durchmesser (mm) des jeweiligen Hinterlaufes der Maus beidseitig erfasst und durch ein Tabellenkalkulationsprogramm (Office Excel v.16.39, Microsoft, Redmond, WA, USA) ausgewertet.

### 3.2.5 Histologie/Immunhistochemie

Die histologischen und immunhistologischen Schnitte wurden in 6 regions of interest (ROI) aufgeteilt. Davon befanden sich 4 im Randbereich des Präparates und 2 im Zentrum (vgl. Abb. 13). So wurden die Präparate in Auflichtmikroskopietechnik (BX-60, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung durch eine Kamera (DP73, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) festgehalten und durch die verbundene Imaging Software (cellSens Dimension 1.6, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) gespeichert. Zur weiteren Analyse wurden die Bilder in die open-source plattform for biological-image analysis Fiji (Fiji v.2.1.0, <https://imagej.net/Fiji>, abgerufen 2020 Oktober 14)[153] exportiert. Mit dem Cell-Counter-Plugin wurden nun die vorhandenen Zellen pro ROI gezählt.



**Abb. 13** (A) schematische Darstellung der histologischen Untersuchung, (B) Präparat des M. gastrocnemius, ROI= region of interest

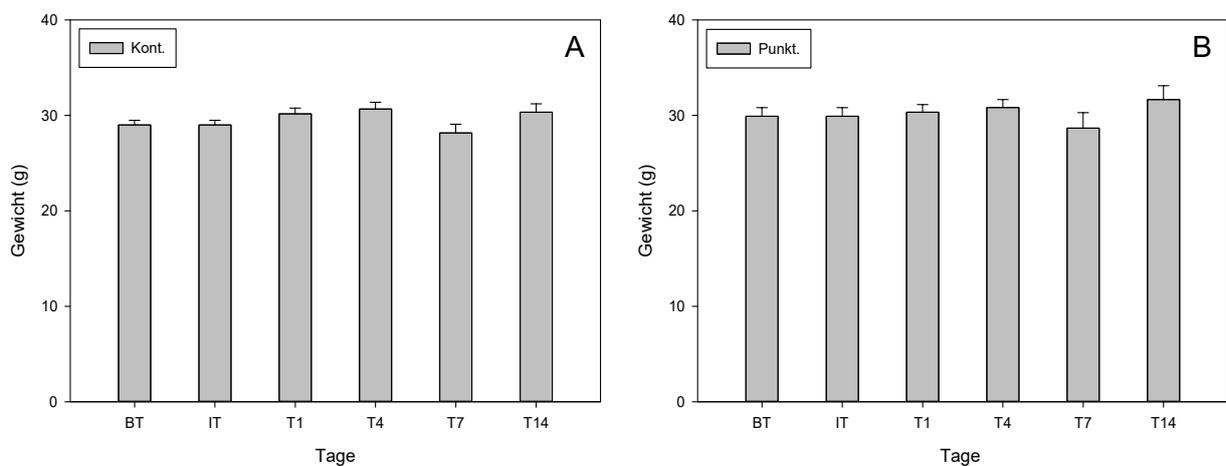
### **3.3 Statistik**

Sämtliche statistischen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der Vergleich innerhalb einer Versuchsgruppe erfolgte durch einen einseitigen repeated measure ANOVA-Test unter Ausgleich des Alphafehlers und bei ermittelter Signifikanz einem darauffolgendem Student-Newman-Keuls Post-Hoc-Test. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde der Rank-Sum-Test als initialer Test verwendet. Zum Vergleich der Versuchsgruppen (Kontusion vs. Punktion, Traumaseite vs. Kontrollseite) wurde ein t-Test für zwei unabhängige Gruppen verwendet. Die Erstellung der Statistik wurde mittels des Programmes SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) durchgeführt, wobei die statistische Signifikanz auf ein  $p < 0,05$  festgelegt wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Posttraumatischer Verlauf

Während des gesamten posttraumatischen Beobachtungszeitraumes konnten keine relevanten Komplikationen beobachtet werden. Es zeigte sich auch kein Anhalt für eine Infektion in der Traumazone. Zum Monitoring des allgemeinen Gesundheitsstatus der Mäuse wurde das Gewicht (in g) sowohl prätraumatisch als auch im gesamten posttraumatischen Beobachtungszeitraum gemessen. In keiner Versuchsgruppe konnte im Verlauf eine signifikante Zu- oder Abnahme des Gewichts festgestellt werden.



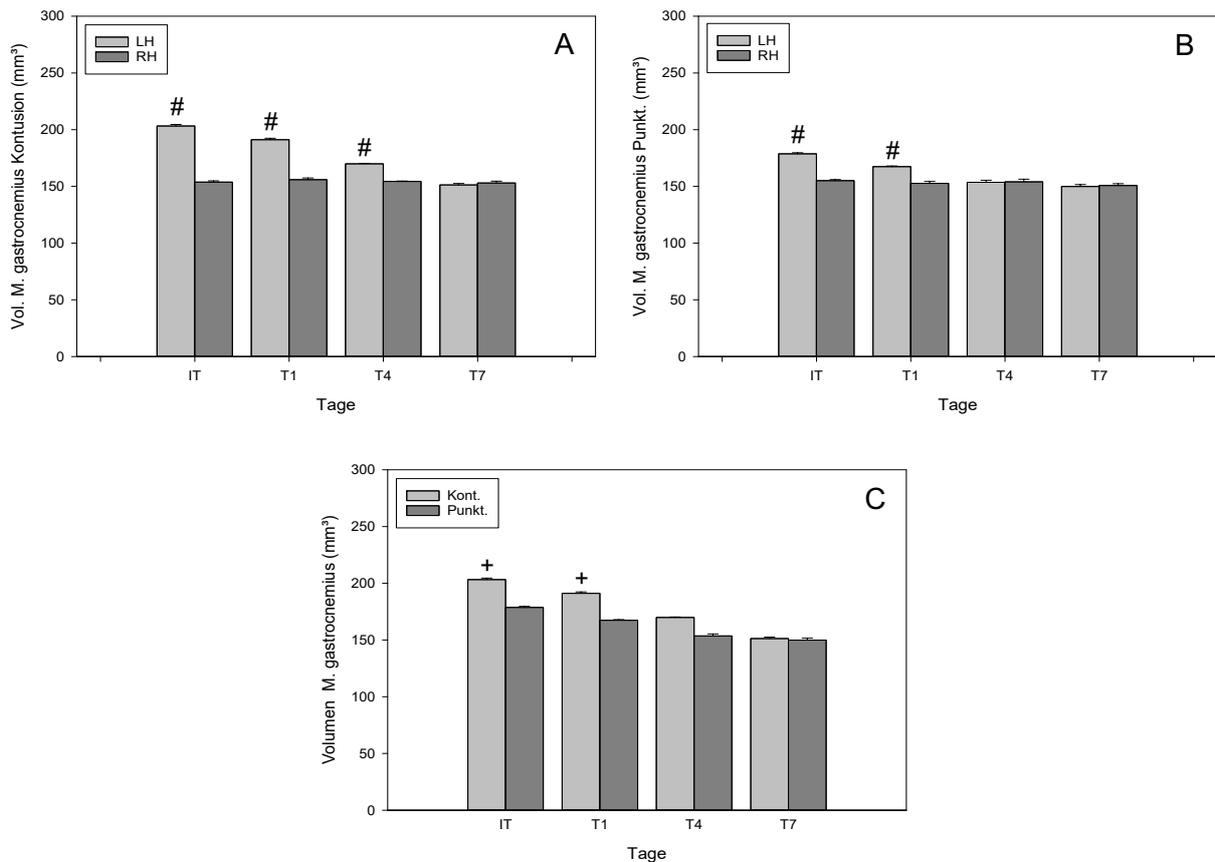
**Abb. 14** (A) Gewicht (g) Kontusionsgruppe, (B) Gewicht (g) Punktionsgruppe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 4.2 Makroskopie

Die eingeschlossenen Tiere in Kontusions- sowie Punktionsgruppe zeigten im Vergleich mit der Gegenseite alle eine deutliche Umfangszunahme ohne Anzeichen einer Infektion an der traumainduzierten Extremität.

### 4.3 MRT

In der schichtweisen volumetrischen Auswertung der MRT-Diagnostik des traumatisierten und nicht traumatisierten M. gastrocnemius zeigten sich signifikante Volumenunterschiede in und zwischen beiden Versuchsgruppen. Innerhalb der Kontusionsgruppe konnte am linken Hinterlauf an IT ( $p < 0,001$ ), Tag 1 ( $p < 0,001$ ) und Tag 4 ( $p < 0,001$ ) ein signifikant größeres Volumen im Vergleich zur Gegenseite nachgewiesen werden. Im posttraumatischen Zeitverlauf sank das Volumen kontinuierlich ab, bis an Tag 7 ( $p > 0,05$ ) keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden. Die Punktionsgruppe zeigte an IT ( $p < 0,001$ ) und an Tag 1 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Gegenseite ebenfalls signifikant höhere Volumina an der traumatisierten Extremität. Das Volumen sank im posttraumatischen Zeitverlauf kontinuierlich ab, an Tag 4 und Tag 7 wurde kein signifikanter Volumenunterschied mehr nachgewiesen. Beim Vergleich der linken Hinterläufe beider Gruppen konnte an IT ( $p < 0,001$ ) und Tag 1 ( $p < 0,001$ ) in der Kontusionsgruppe ein signifikant höheres Volumen gemessen werden. Beim Vergleich der Kontrollgruppen von Kontusion und Punktion wurde an keinem der posttraumatischen Beobachtungszeitpunkte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen.

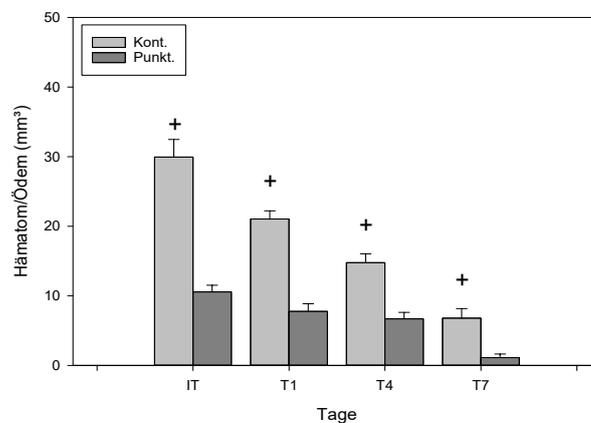


**Abb. 15** MRT, Volumetrische Auswertung M. gastrocnemius (mm<sup>3</sup>) (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (+  $p < 0,05$  vs. Punkt., #  $p < 0,05$  vs. RH) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

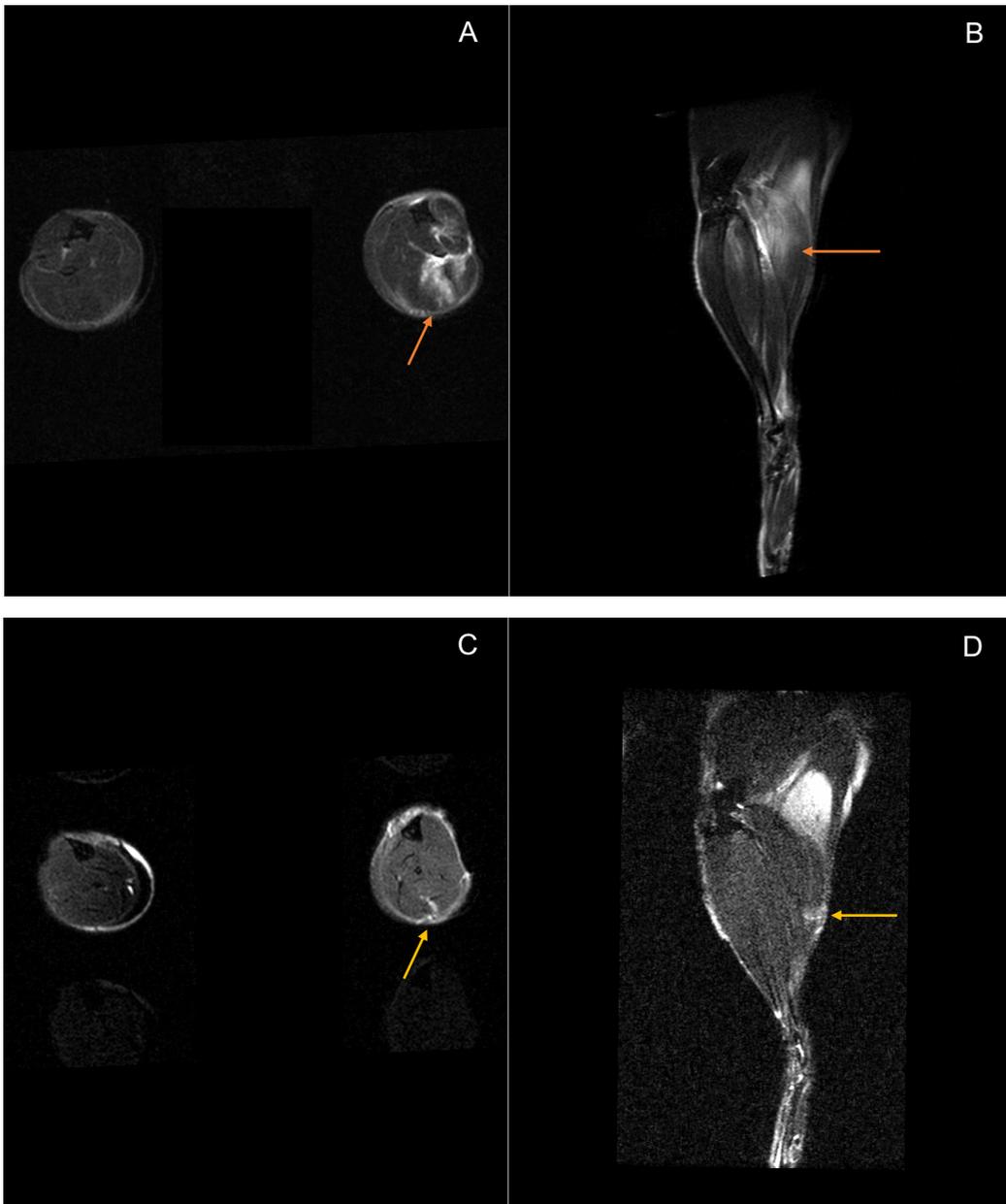
### 4.3.1 Hämatom/Ödem

Durch die schichtweise durchgeführte Identifizierung des durch das Trauma entstandenen Hämatoms/Ödems in den axialen und saggitalen MRT-Schichten konnte ein 3D Model des Traumahämatoms/Ödem erzeugt und volumetrisch ausgemessen werden. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der traumatisierten Extremität der Kontusions- und Punktionsgruppe.

Es konnten an allen Untersuchungszeitpunkten signifikant höhere Volumina in der Kontusionsgruppe im Vergleich zur Punktionsgruppe nachgewiesen werden. Beide Gruppen zeigten zudem eine kontinuierliche Abnahme des Volumens im Zeitverlauf.



**Abb. 16** MRT, Volumetrische Auswertung Traumahämatom, Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (+  $p < 0,05$  vs. Punkt.) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



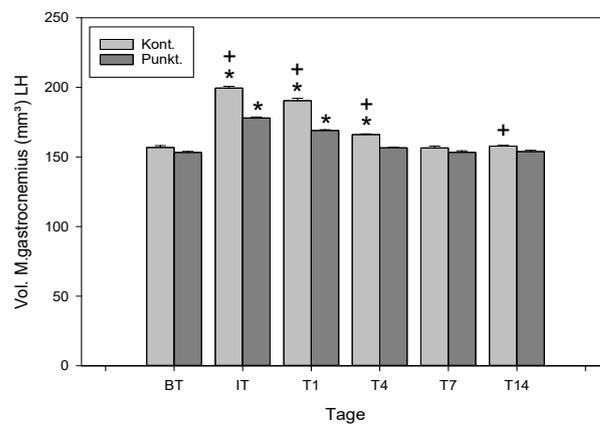
**Abb. 17** MRT, Kontusionstrauma IT (A) axiale Schnittführung (B) sagittale Schnittführung, Punctionstrauma IT (C) axiale Schnittführung, (D) sagittale Schnittführung; orange Pfeile: „federartiges“ Hämatom/Ödem, gelbe Pfeile: Stichkanal mit umgebendem Hämatom/Ödem.

#### 4.4 hrUS

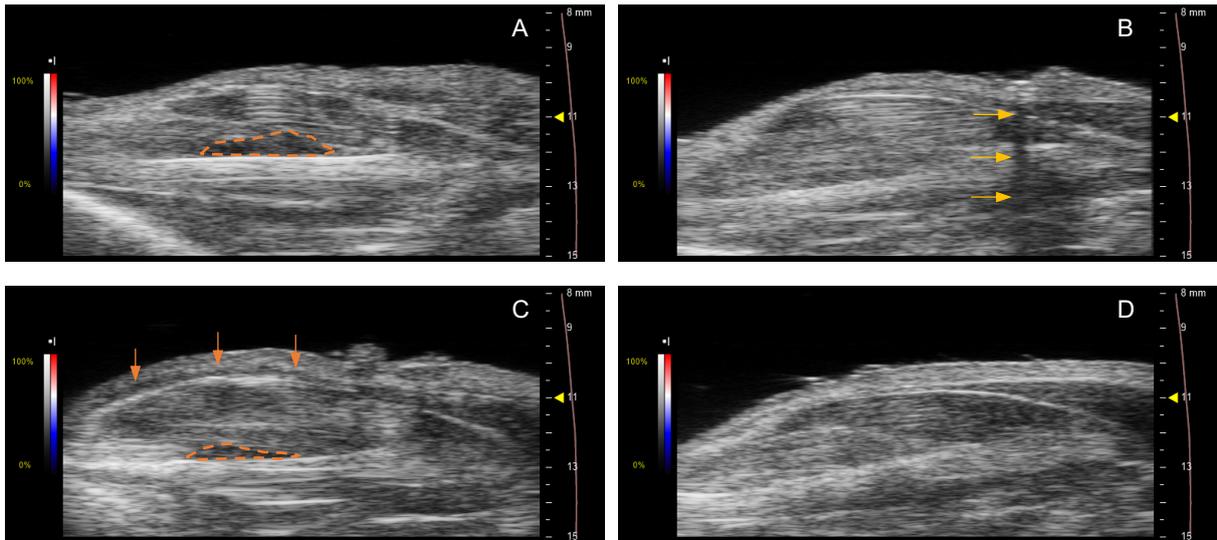
Die schichtweise volumetrische Auswertung der transverso-sagittalen Schnitte im hrUS am M. gastrocnemius des traumatisierten Hinterlaufes zeigten signifikante Unterschiede innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen. Innerhalb der Kontusionsgruppe zeigten sich im Vergleich zu BT an IT ( $p < 0,001$ ), Tag 1 ( $p < 0,001$ ) und an Tag 4 ( $p < 0,001$ ) signifikant höhere Volumina des M. gastrocnemius. Das Volumen sank im posttraumatischen Verlauf kontinuierlich, sodass ab Tag 7 im Vergleich zu BT keine signifikante Volumenänderung mehr nachgewiesen werden konnte.

In der Punktionsgruppe konnten im Vergleich zu BT an IT ( $p < 0,001$ ) und Tag 1 ( $p < 0,001$ ) signifikant höhere Volumina nachgewiesen werden. Das Volumen sank posttraumatisch ebenfalls kontinuierlich und es konnte ab Tag 4 kein signifikanter Unterschied zu BT gemessen werden.

Der Vergleich von Kontusions- und Punktionsgruppe zeigte an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten in der Kontusionsgruppe an IT ( $p < 0,001$ ), Tag 1 ( $p < 0,001$ ), Tag 4 ( $p < 0,001$ ) und Tag 14 ( $p < 0,05$ ) signifikante höhere Volumina.



**Abb. 18** hrUS, Volumetrische Auswertung M. gastrocnemius, Kontusionsgruppe linker Hinterlauf vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punktion) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

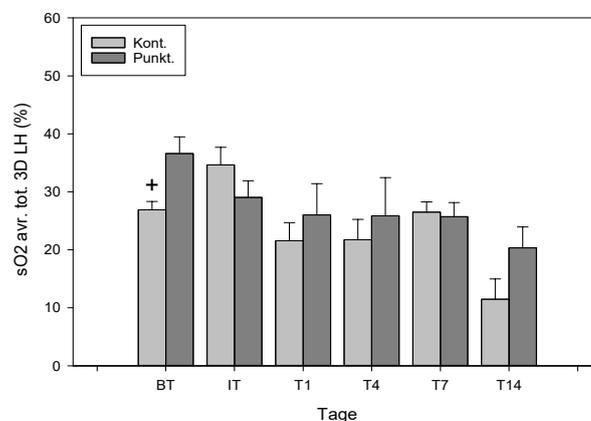


**Abb. 19** hrUS, B-Bild, transverso-sagittale Schnittführung, (A) Kontusionsgruppe T1, (B) Punktionsgruppe T1, (C) Kontusionsgruppe T4, (D) Punktionsgruppe T4, orange Markierung: intramuskuläres Hämatom, orange Pfeile: subkutanes Hämatom, gelbe Pfeile: Stichkanal.

## 4.5 PAI

### 4.5.1 sO<sub>2</sub>

In der Auswertung der photoakustischen Messungen der sO<sub>2</sub>-Sättigung der ROI zeigte sich in der Kontusionsgruppe im Vergleich zum BT zunächst am IT eine Erhöhung der sO<sub>2</sub>-Sättigung. An Tag 1 und Tag 4 fiel diese unter den Normwert und stieg an Tag 7 wieder auf einen mit BT vergleichbaren Wert. An Tag 14 zeigte sich abermals ein Abfall der sO<sub>2</sub> unter das Niveau von BT. Keine der beschriebenen Änderungen zeigte sich in der statistischen Auswertung signifikant. Die Punktionsgruppe startete an BT mit einem signifikant höheren sO<sub>2</sub> Wert ( $p < 0,05$ ). In den darauffolgenden Untersuchungszeitpunkten sank die sO<sub>2</sub> an IT, Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 14 ( $p > 0,05$ ) unter den Ausgangswert an BT, ohne jedoch signifikante Unterschiede nachzuweisen.

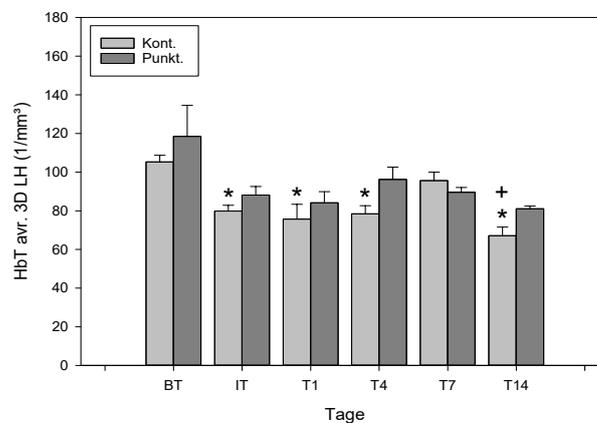


**Abb. 20** hrUS, PAI-Modus, Auswertung M. gastrocnemius sO<sub>2</sub> (%), Kontusionsgruppe linker Hinterlauf vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (+  $p < 0,05$  vs. Punkt.) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.5.2 HbT

Die Auswertung der photoakustisch gemessenen Anzahl von Hämoglobinmolekülen bezogen auf das Volumen (HbT/ mm<sup>3</sup>) der ROI erbrachte in der Kontusionsgruppe signifikante Unterschiede. Bezogen auf den BT zeigten sich signifikant erniedrigte Werte an IT (p<0,05), Tag 1 (p<0,05), Tag 4 (p<0,05) und an Tag 14 (p<0,05). In der Punktionsgruppe konnten im Vergleich zu BT über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Beim Vergleich der Kontusion- und Punktionsgruppe wurde an Tag 14 (p<0,05) in der Kontusionsgruppe ein signifikant erniedrigter HbT/mm<sup>3</sup> nachgewiesen.



**Abb. 21** hrUS, PAI-Modus, Auswertung M. gastrocnemius Parameter HbT (1/mm<sup>3</sup>), Kontusionsgruppe linker Hinterlauf vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (\* p<0,05 vs. BT, + p<0,05 vs. Punkt.) Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

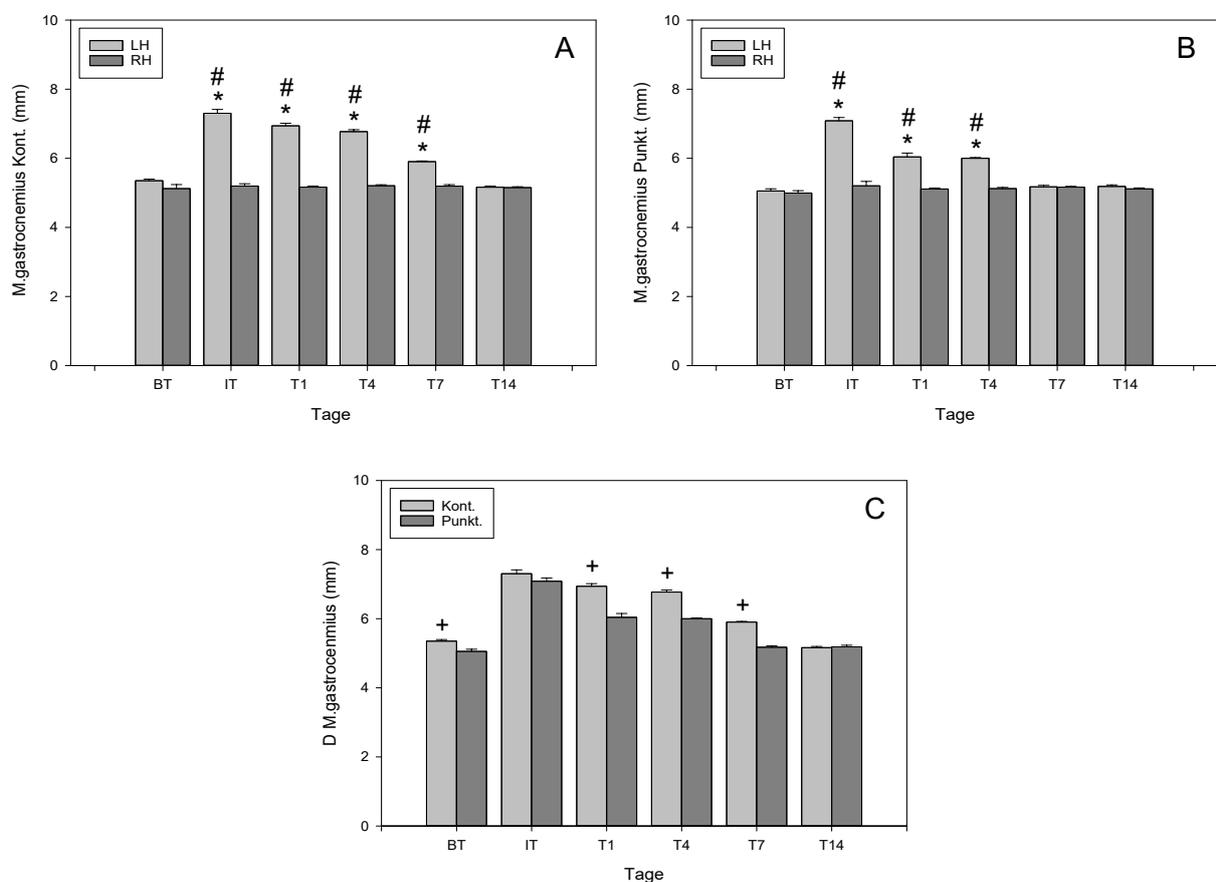
#### 4.6 Schieblehre

In der Auswertung des durch Schieblehre gemessenen Unterschenkeldurchmessers zeigte sich in der Kontusionsgruppe im Vergleich zum BT am IT (p<0,001) ein signifikant erhöhter Durchmesser, welcher sich über Tag 1 (p<0,001), Tag 4 (p<0,001) und Tag 7 (p<0,001) stetig verminderte. Bis an Tag 14 (p>0,05) wieder der Durchmesser des prätraumatischen Zustandes erreicht wurde. Im Vergleich mit der nicht traumatisierten Extremität zeigte sich ebenfalls am IT (p<0,001), Tag 1 (p<0,001), Tag 4 (p<0,001) und Tag 7 (p<0,001) signifikant höhere Durchmesser. An Tag 14 (p>0,05) konnte kein Unterschied zur Gegenseite nachgewiesen werden.

In der Punktionsgruppe konnte im Vergleich zum prätraumatischen Zustand ein signifikant höherer Durchmesser an IT (p<0,001), Tag 1 (p<0,001) und Tag 4 (p<0,001) nachgewiesen werden, welcher bis zum Tag 7 das prätraumatische Niveau erreichte. Im Vergleich zur Gegenseite zeigte sich ebenfalls am IT (p<0,001), Tag 1 (p<0,05) und Tag 4 (p<0,001) ein

signifikant erhöhter Durchmesser der traumatisierten Extremität. An Tag 7 und Tag 14 konnte kein signifikanter Unterschied mehr zur Gegenseite nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der kontusionierten mit der punktierten Extremität zeigte sich, am IT kein signifikanter Unterschied des angestiegenen Unterschenkeldurchmessers. Während des restlichen Beobachtungszeitraums zeigten sich ab Tag 1 ( $p < 0,05$ ) signifikante Unterschiede zwischen der Kontusions- und Punktionsgruppe. Hierbei zeigte sich der Durchmesser der punktierten Extremität im Verlauf an Tag 4 ( $p < 0,001$ ) und Tag 7 ( $p < 0,001$ ) signifikant erniedrigt. Ab Tag 14 ( $p > 0,05$ ) konnten keine signifikanten Unterschiede der Durchmesser nachgewiesen werden.

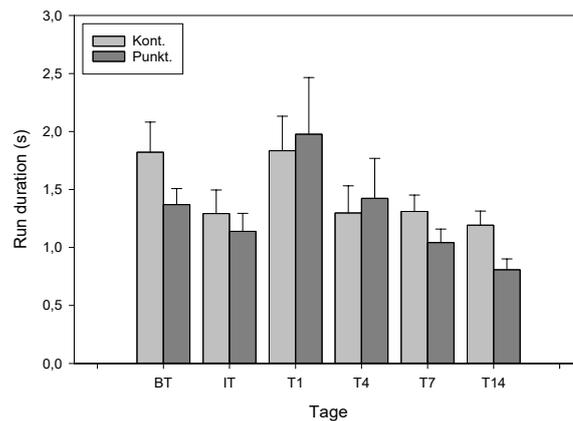


**Abb. 22** Schieblehre, Durchmesser M. gastrocnemius Schieblehre (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## 4.7 Ganganalyse

### 4.7.1 Run Duration

Nach Auswertung des Parameters Run duration (s) zeigte sich über den gesamten posttraumatischen Beobachtungszeitraum innerhalb und zwischen den einzelnen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 23** CatWalk, Run duration (s) Kontusions- und Punktionsgruppe. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

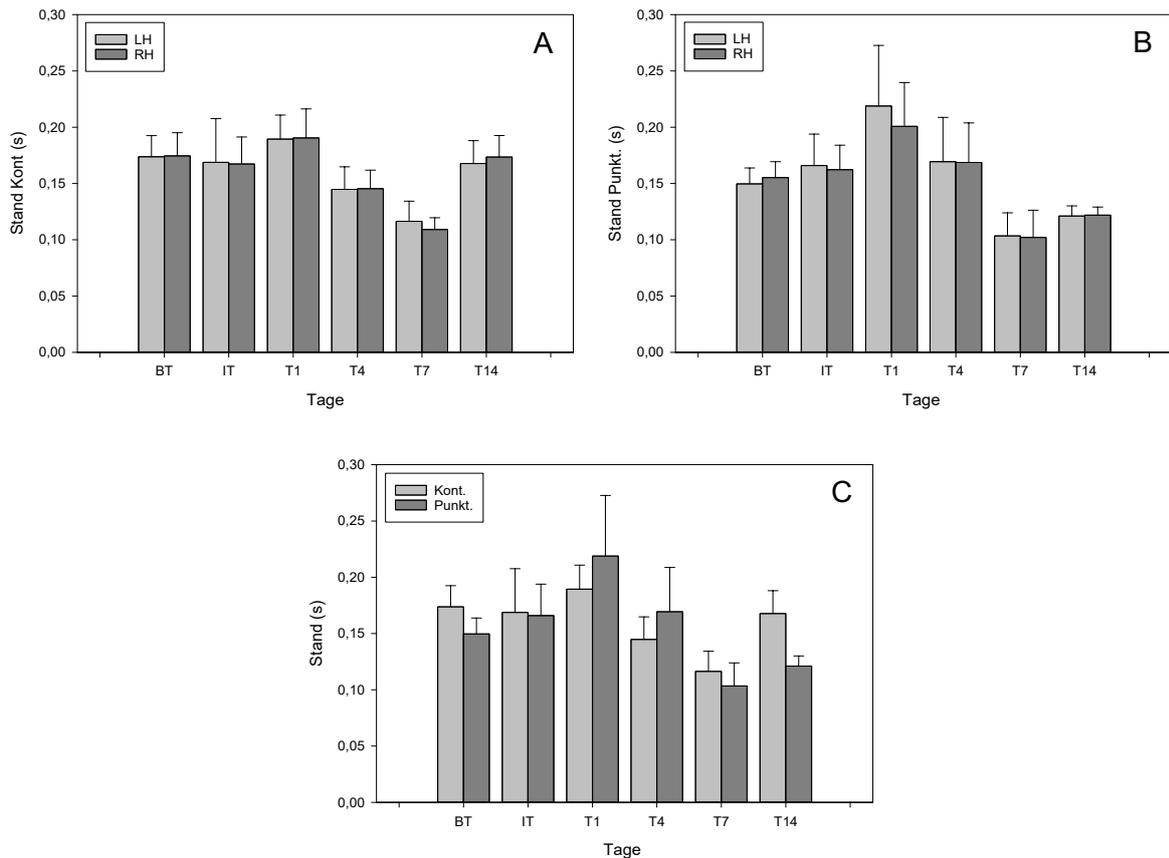
### 4.7.2 Stand

Die Auswertung des Parameters Stand zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch bis zum Tag 1 eine Zunahme des Stands mit einer darauffolgenden beidseitigen Abnahme bis zu einem Minimum an Tag 7. Es konnte jedoch an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten An Tag 1 ebenfalls beidseits ihr Maximum, worauf ein Abfall bis zum Tag 7 erfolgte. Ferner wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



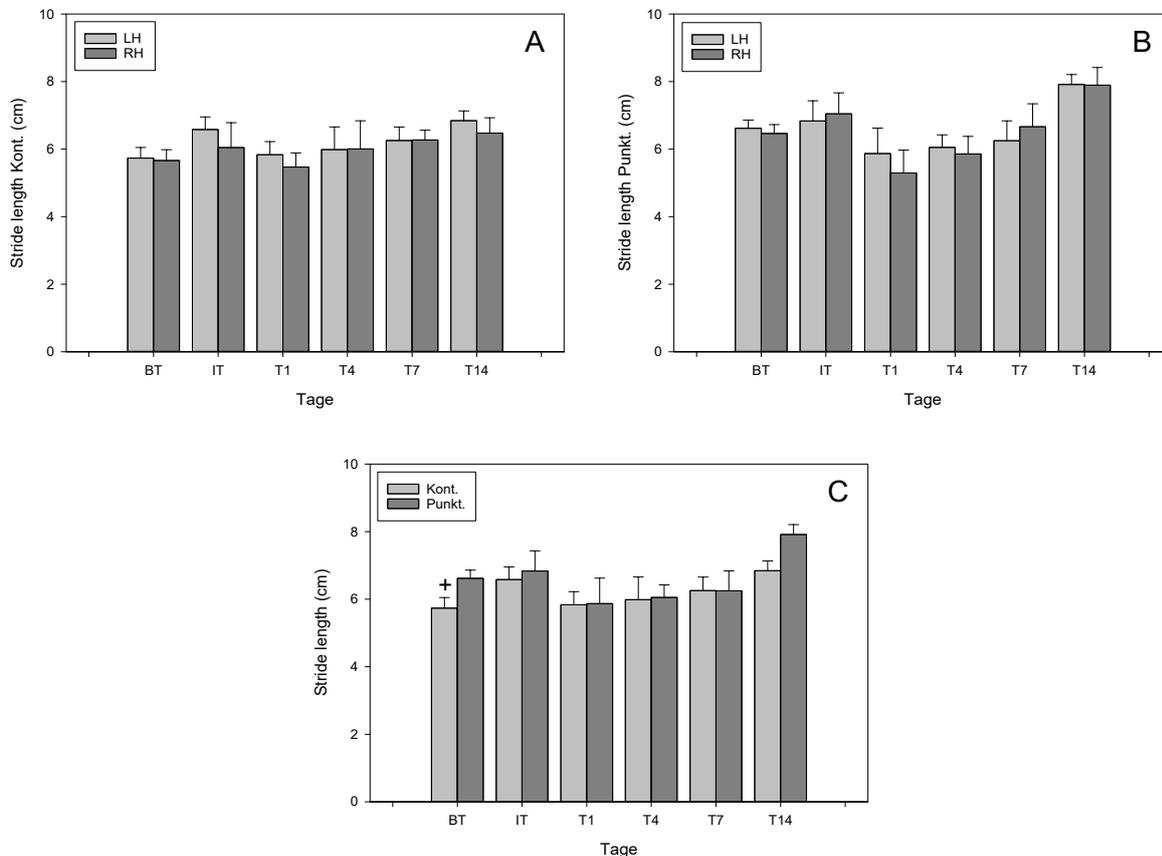
**Abb. 24** CatWalk, Stand (s), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7.3 Stride Length (SL)

In der Kontusionsgruppe zeigte sich in der Auswertung des Parameters Stride length (SL) posttraumatisch an IT eine Zunahme der Schrittlänge mit einer darauffolgenden Rückkehr auf das Niveau von BT ab Tag 4. Es konnte an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten an IT ebenfalls beidseits ihr Maximum, worauf ein Abfall an Tag 1 erfolgte. Ab Tag erreichte die SL wieder Werte vergleichbar mit BT. Ferner wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an BT ( $p < 0,05$ ) eine signifikant höhere SL in der Punktionsgruppe. Im restlichen posttraumatischen Beobachtungszeitraum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 25** CatWalk, Stride length, (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

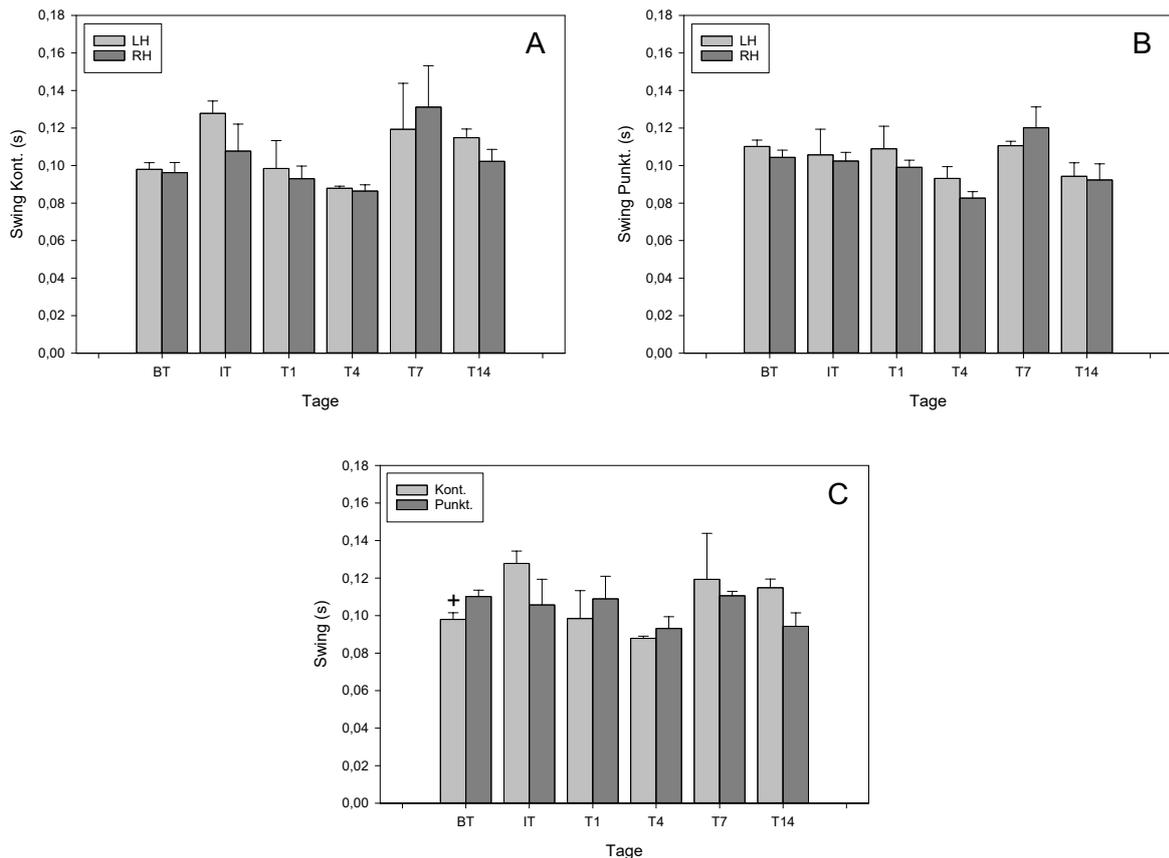
#### 4.7.4 Swing

In der Kontusionsgruppe zeigte sich in der Auswertung des Parameters Swing (s) posttraumatisch beidseits an IT eine Zunahme des Swing mit einer darauffolgenden Abnahme bis auf ein Minimum an Tag 4. An Tag 7 zeigte sich der Swing beidseits abermals verlängert. Ab Tag 14 wurden Werte vergleichbar mit BT erreicht. Es konnte jedoch an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte zeigten sich bis Tag 4 auf dem Niveau von BT. An Tag 4 zeigte sich beidseits eine Verkürzung des Swing. Darauf stieg der Swing an Tag 7 beidseits über BT, worauf an Tag 14 eine Rückkehr zum Ausgangsniveau erfolgte. Ferner

wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an BT ( $p < 0,05$ ) eine signifikant höhere Swingzeit in der Punktionsgruppe. Im restlichen posttraumatischen Beobachtungszeitraum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 26** CatWalk, Swing (s), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

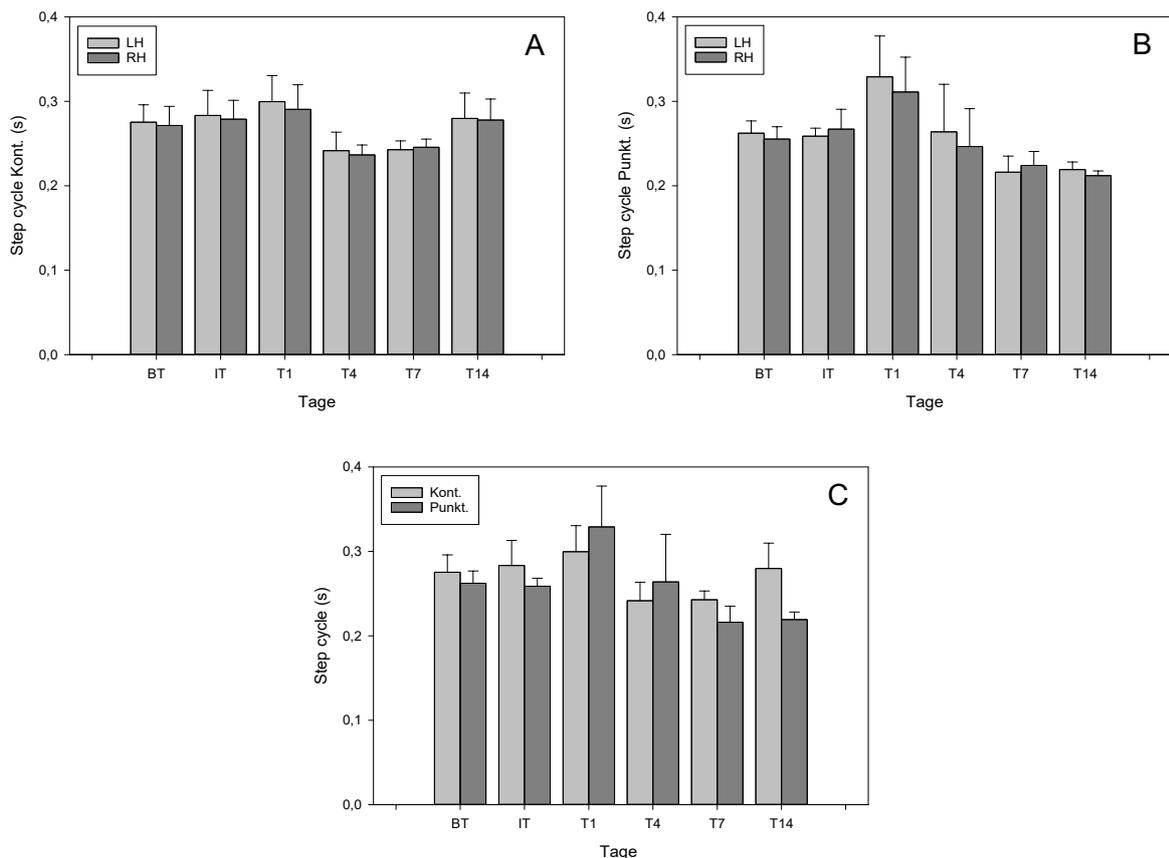
#### 4.7.5 Step Cycle (SC)

Die Auswertung des Step cycle (s) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch bis zum Tag 1 eine Verlängerung des Step cycle mit einer darauffolgenden beidseitigen Abnahme bis zu einem Minimum an Tag 7. Es konnte jedoch an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten An Tag 1 ebenfalls beidseits ihr Maximum, worauf ein Abfall bis zum Tag 7 erfolgte. Weiter wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



**Abb. 27** CatWalk, Step cycle (s), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7.6 Duty Cycle (DC)

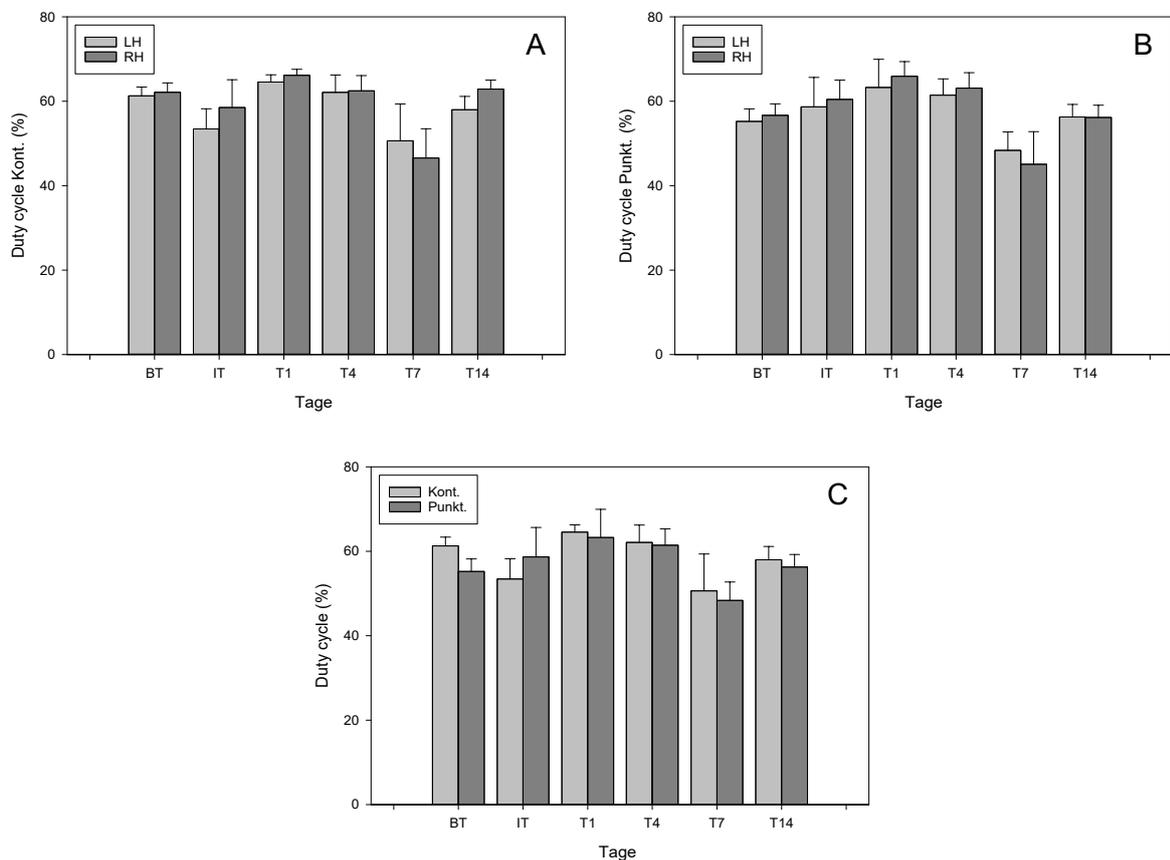
Die Auswertung des Parameters Duty cycle (%) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch primär an IT eine Abnahme des DC. Im Verlauf nahm der DC hingegen zu und erreichte am Tag 1 sein Maximum. Bis zum Tag 7 erfolgte beidseits eine Abnahme des DC und erreichte hier sein Minimum. Ab Tag 14 erreichte

der DC dann wieder das Niveau von BT. Es konnte an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten An Tag 1 ebenfalls beidseits ihr Maximum, worauf ein Abfall bis zum Tag 7 erfolgte. An Tag 14 wurden wieder Ausgangswerte erreicht. Ferner wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



**Abb. 28** CatWalk, Duty cycle (%), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

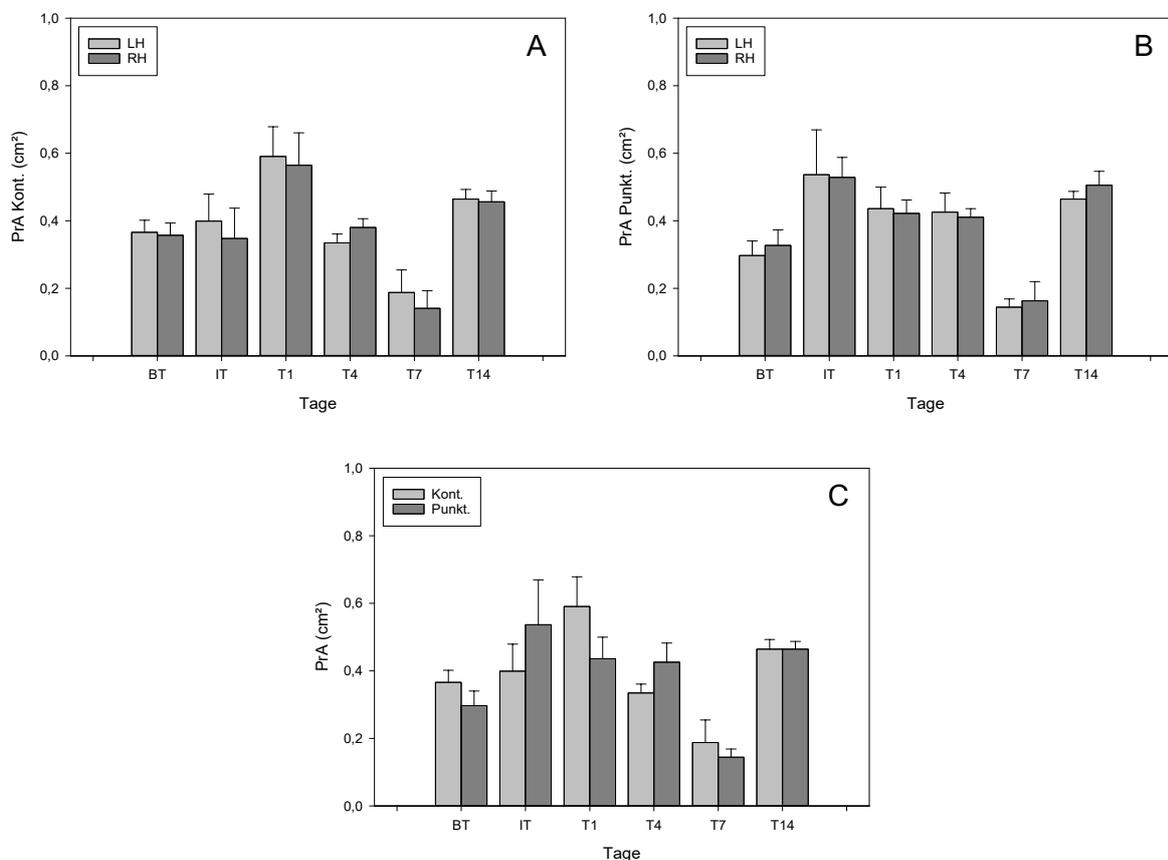
#### 4.7.7 Print Area (PA)

Die Auswertung des Parameters Print area (cm<sup>2</sup>) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch bis zum Tag 1 eine Zunahme der Print area mit einer darauffolgenden beidseitigen Abnahme bis zu einem Minimum an Tag 7. Es konnte jedoch an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten an IT beidseits ihr Maximum, worauf ein Abfall bis zum Tag 7 erfolgte. Ab Tag 14 wurden Werte auf dem Niveau von BT erreicht. Ferner wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



**Abb. 29** CatWalk, Print area (PA) (cm<sup>2</sup>), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\*p<0,05 vs. BT, + p<0,05 vs. Punkt, # p<0,05 vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

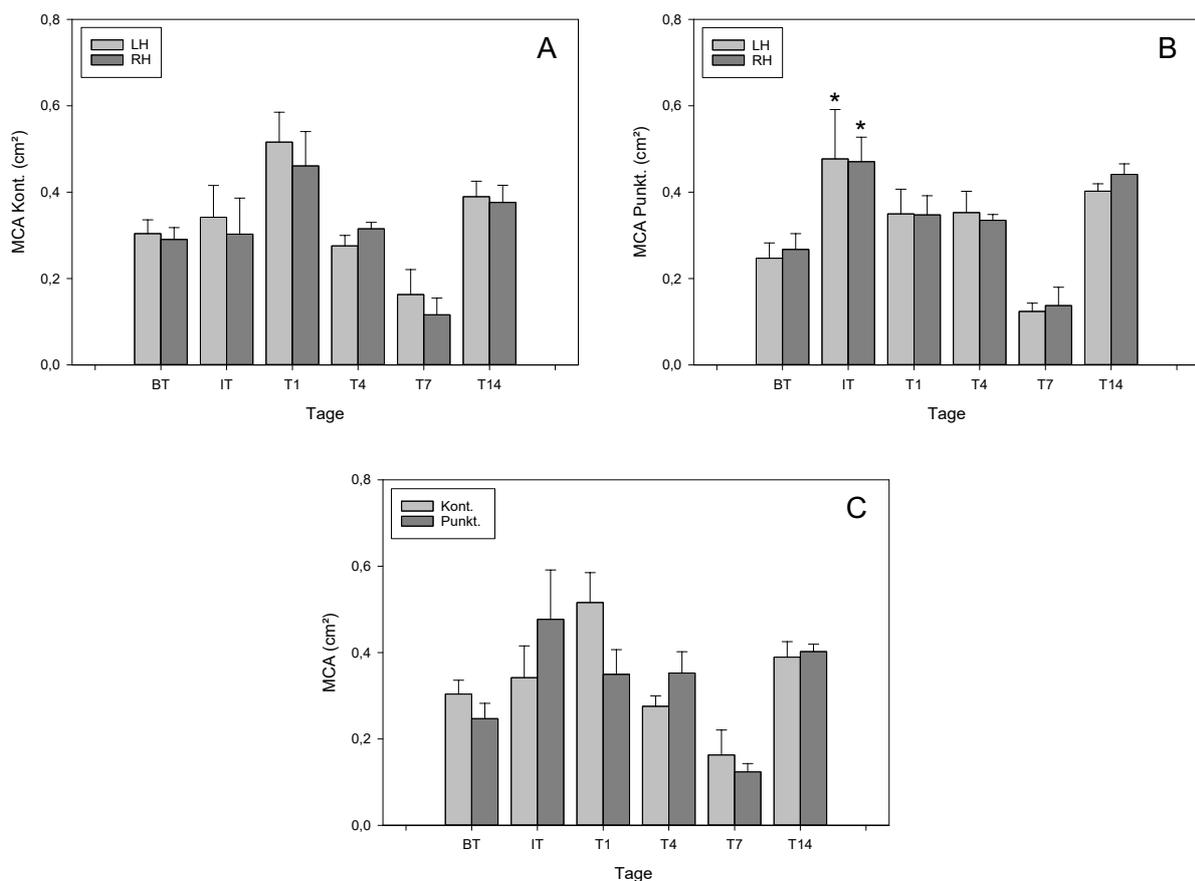
#### 4.7.8 Max Contact Area (MCA)

Die Auswertung des Parameters Max Contact Area (MCA) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe signifikante Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch an Tag 1 im Vergleich zu BT eine Zunahme der MCA mit einer darauffolgenden beidseitigen Abnahme bis zu einem Minimum an Tag 7. Es konnte jedoch an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessene MCA erreichte im Vergleich zu BT an IT beidseits signifikant erhöhte Werte, worauf ein Abfall bis zum Tag 7 erfolgte. Beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



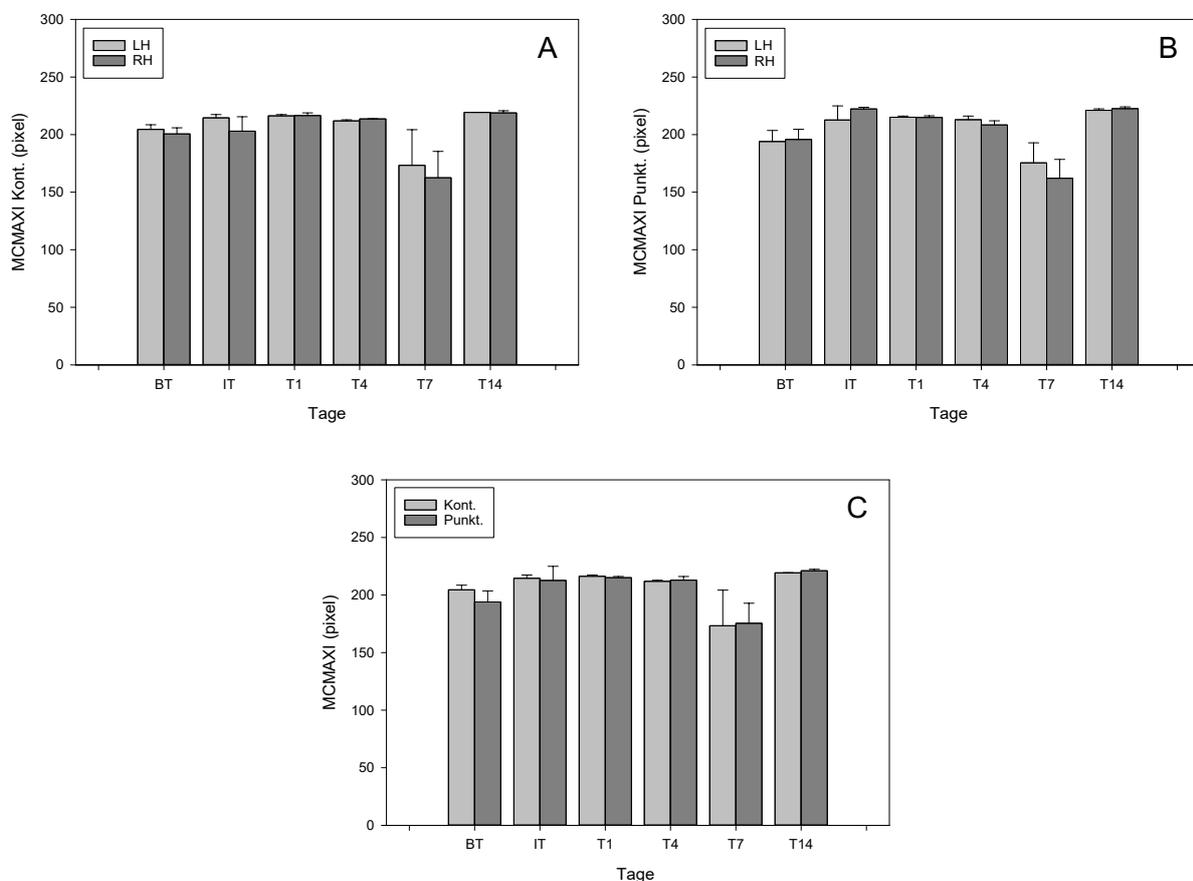
**Abb. 30** CatWalk, Max Contact Area (MCA) (cm<sup>2</sup>), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\*p<0,05 vs. BT, + p<0,05 vs. Punkt, # p<0,05 vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

#### 4.7.9 Max Contact Max Intensity (MCMAXI)

Die Auswertung Max Contact Max Intensity (MCMAXI) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe keine signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch an Tag 7 beidseitig eine Verringerung der MCMAXI. Ab Tag 14 erreichte der DC dann wieder das Niveau von BT. Es konnte an allen Messpunkten im Vergleich zu BT kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten.

Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten An Tag 7 ebenfalls ihr Minimum. An Tag 14 wurden wieder Ausgangswerte erreicht. Ferner wurden hier an allen Messpunkten im Vergleich zu BT keine signifikanten Unterschiede gemessen. Ebenso beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.



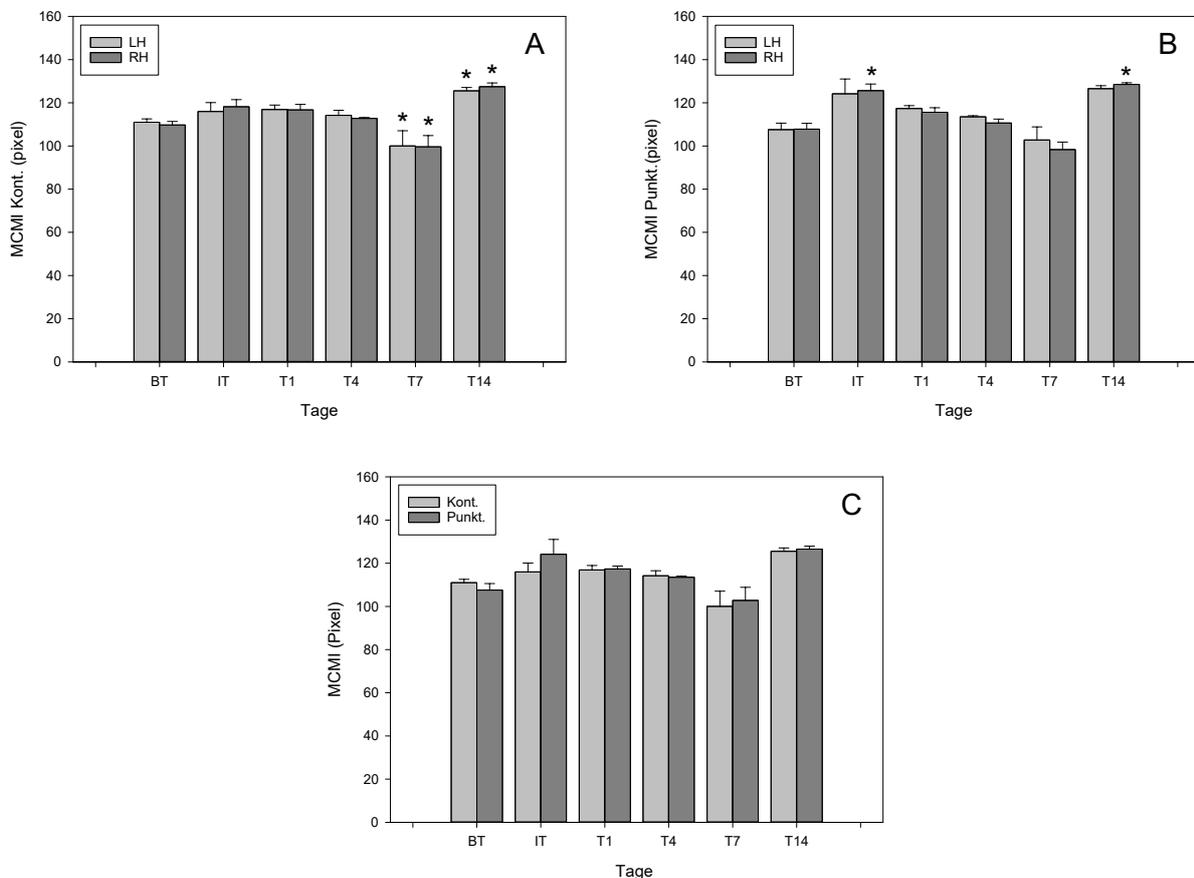
**Abb. 31** CatWalk, Max Contact Max Intensity (MCMAXI) (pixel), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.) Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 4.7.10 Max Contact Mean Intensity (MCMI)

Die Auswertung des Parameters Max Contact Mean Intensity (MCMI) zeigte über den posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt in der Kontusions- sowie Punktionsgruppe signifikanten Unterschiede.

In der Kontusionsgruppe zeigte sich posttraumatisch an IT eine Zunahme der MCMI mit einer darauffolgenden beidseitigen Abnahme bis zu einer im Vergleich zu BT signifikant verringerten MCMI an Tag 7 ( $p < 0,05$ ). An Tag 14 ( $p < 0,05$ ) konnte eine im Vergleich zu BT eine signifikante Zunahme der MCMI beobachtet werden. Beim Vergleich der traumatisierten Extremität mit der nicht traumatisierten Extremität an den einzelnen Beobachtungszeitpunkten wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Die in der Punktionsgruppe gemessenen Werte erreichten IT ebenfalls beidseits ihr Maximum. Rechtsseitig zeigte sich an IT ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu BT eine signifikante Erhöhung der MCMI im Vergleich zu BT. Daraufhin erfolgte ein Abfall der MCMI bis zum Tag 7. An Tag 14 zeigte sich in der Punktionsgruppe ebenfalls eine im Vergleich BT Erhöhung der MCMI, rechtsseitig signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ).

Der Vergleich der traumatisierten linken Hinterläufe der Kontusions- und Punktionsgruppe ergab an keinem der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Unterschied.

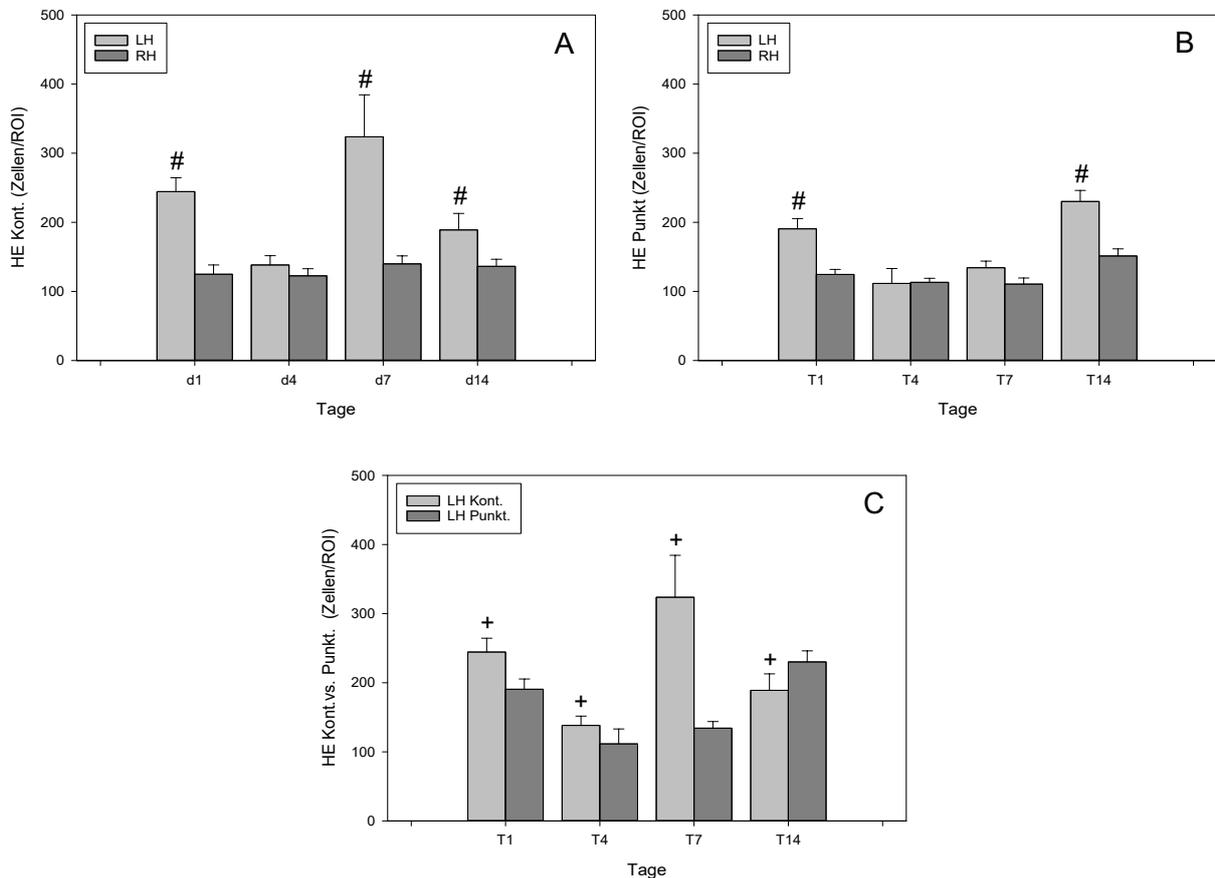


**Abb. 32** CatWalk, Max Contact Mean Intensity (MCMI) (pixel), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\* $p < 0,05$  vs. BT, +  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

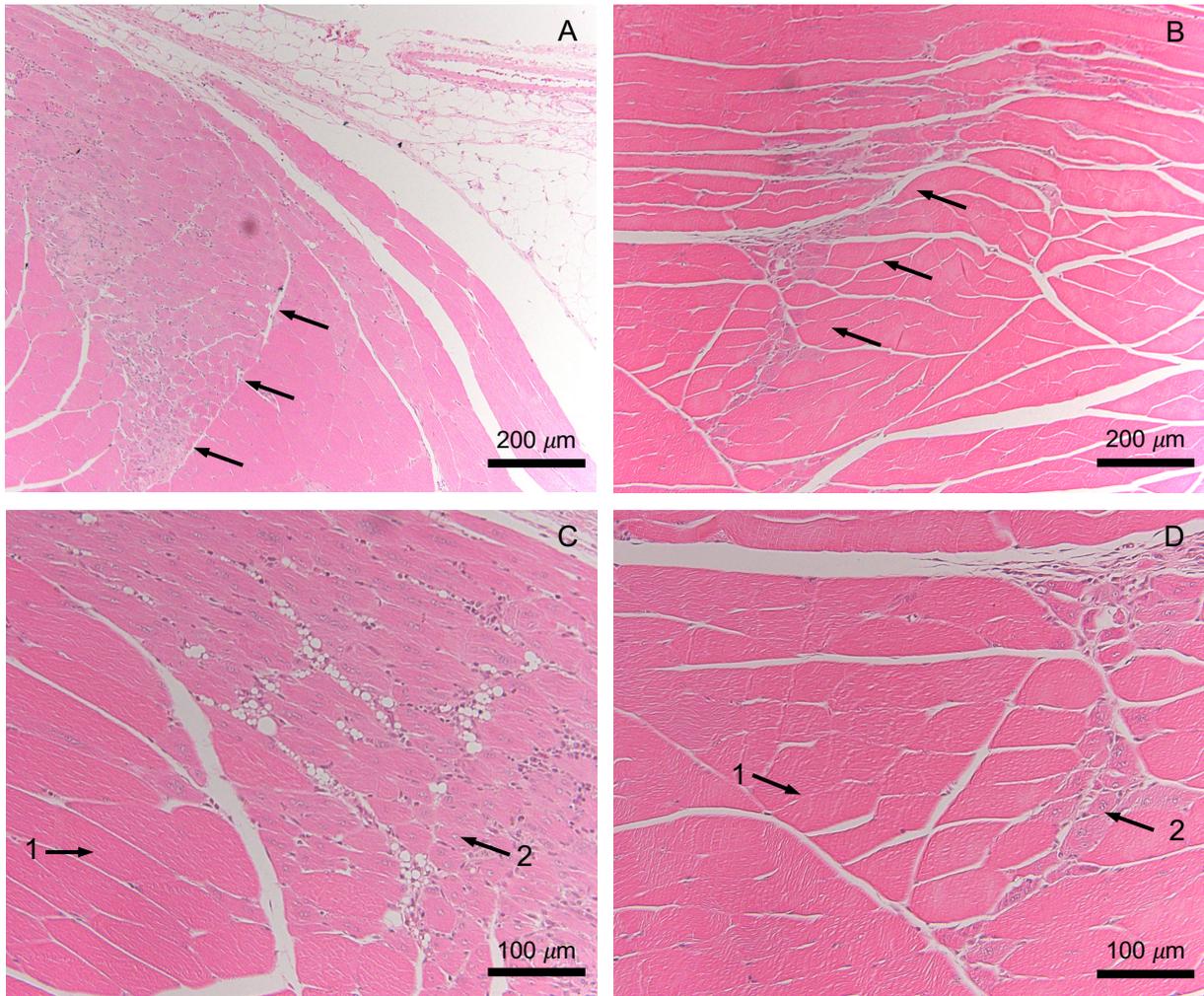
## 4.8 Histologie

### 4.8.1 HE Färbung

Die quantitative Auswertung der HE-Präparate ergab beim Vergleich der Zellzahlen der traumatisierten mit der nicht traumatisierten Extremität in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), Tag 7 ( $p < 0,05$ ), und Tag 14 ( $p < 0,05$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. Hierbei wurde an Tag 7 der Maximalwert erreicht. In der Punktionsgruppe zeigte sich an Tag 1 ( $p < 0,01$ ) und Tag 14 ( $p < 0,01$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. An Tag 4 und Tag 7 konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Beim Vergleich der beiden traumatisierten Extremitäten der Kontusions- und Punktionsgruppe konnten in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,05$ ), Tag 4 ( $p < 0,01$ ), Tag 7 ( $p < 0,05$ ) signifikant erhöhte Zellzahlen und Tag 14 ( $p < 0,05$ ) signifikant erniedrigte Zellzahl im Vergleich mit der Punktionsgruppe gezeigt werden.



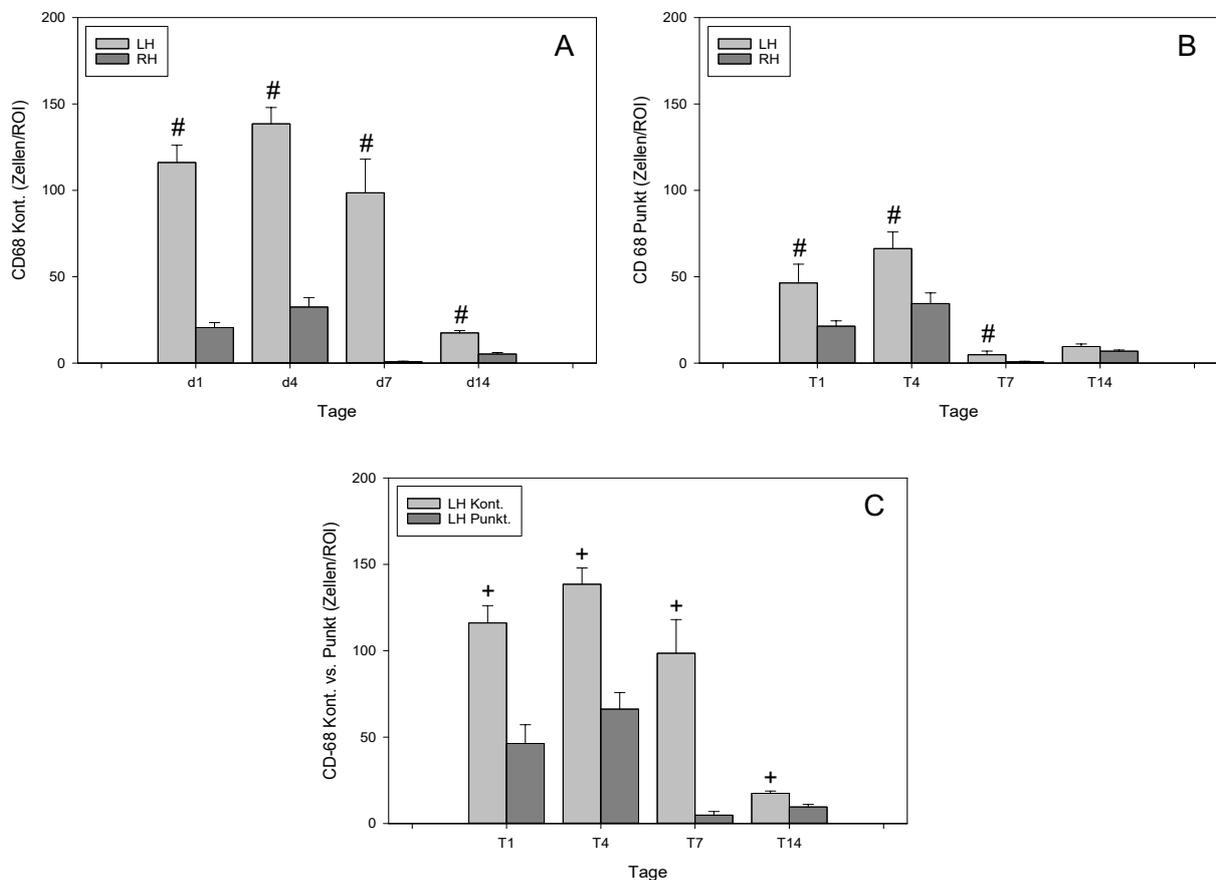
**Abb. 33** Histologie, HE-Färbung (Zellzahl/ROI), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (\*+  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



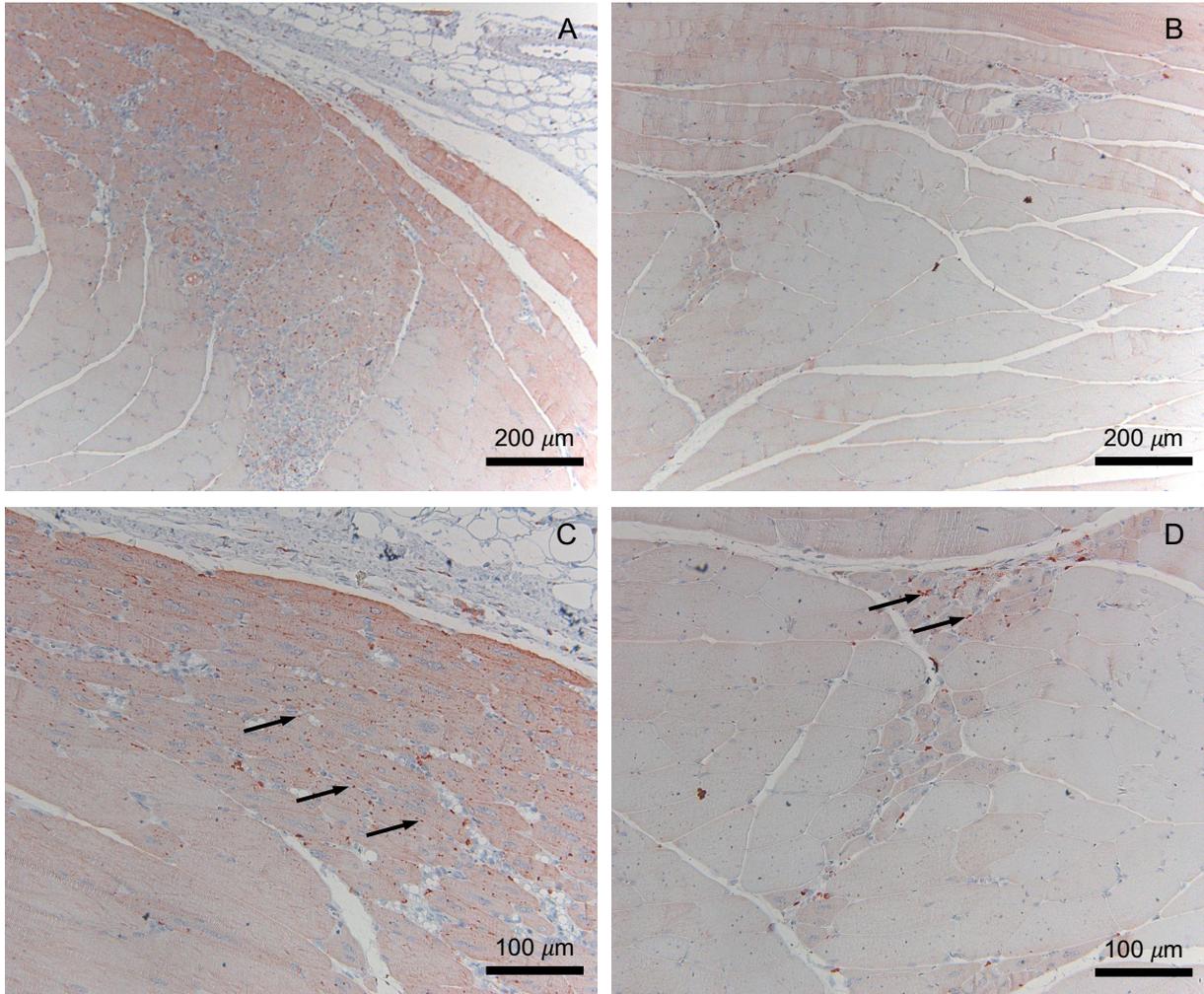
**Abb. 34** Histologie, HE Färbung Tag 7, (A) 10x Vergrößerung Kontusionsgruppe, (B) 10x Vergrößerung Punktionsgruppe, (C) 20x Vergrößerung Kontusionsgruppe, (D) 20x Vergrößerung Punktionsgruppe, Schwarze Pfeile: (A) Defektzone Kontusionstrauma, (B) Defektzone Punktionsstrauma, 1: physiologische Skelettmuskelfasern, 2: zentronukleäre Skelettmuskelfasern.

## 4.8.2 CD-68 Färbung

Die quantitative Auswertung der CD-68-Präparate ergab beim Vergleich der Zellzahlen der traumatisierten mit der nicht traumatisierten Extremität in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), Tag 4 ( $p < 0,01$ ), Tag 7 ( $p < 0,01$ ) und Tag 14 ( $p < 0,01$ ) signifikant erhöhte Zellzahlen/ROI. In der Punktionsgruppe zeigte sich an Tag 1 ( $p < 0,05$ ), Tag 4 ( $p < 0,05$ ) und Tag 7 ( $p < 0,01$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. An Tag 14 konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Beim Vergleich der beiden traumatisierten Extremitäten der Kontusions- und Punktionsgruppe konnten an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), Tag 4 ( $p < 0,01$ ), Tag 7 ( $p < 0,01$ ) und Tag 14 ( $p < 0,01$ ) in der Kontusionsgruppe signifikant höhere Zellzahlen/ROI als in der Punktionsgruppe gezeigt werden.



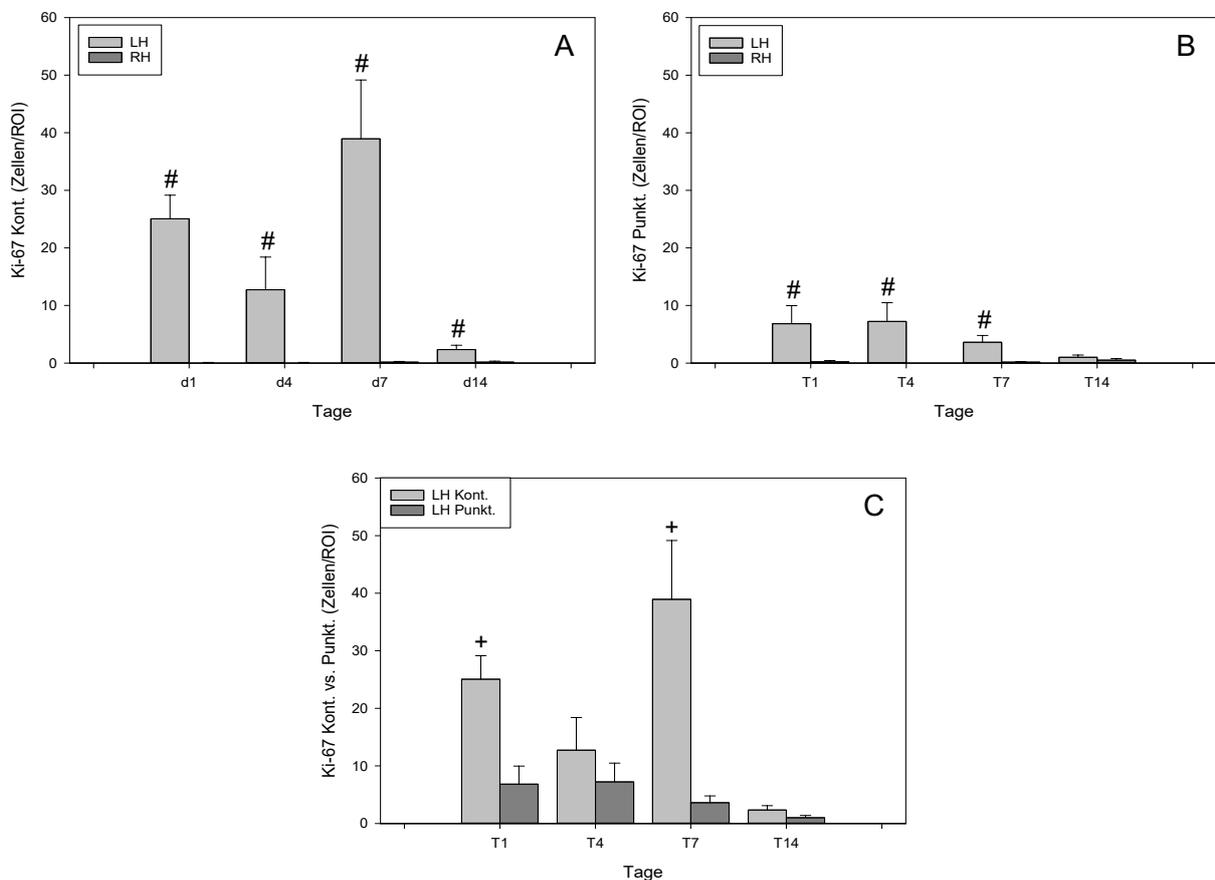
**Abb. 35** Histologie, CD68-Färbung (Zellzahl/ROI), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (+  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



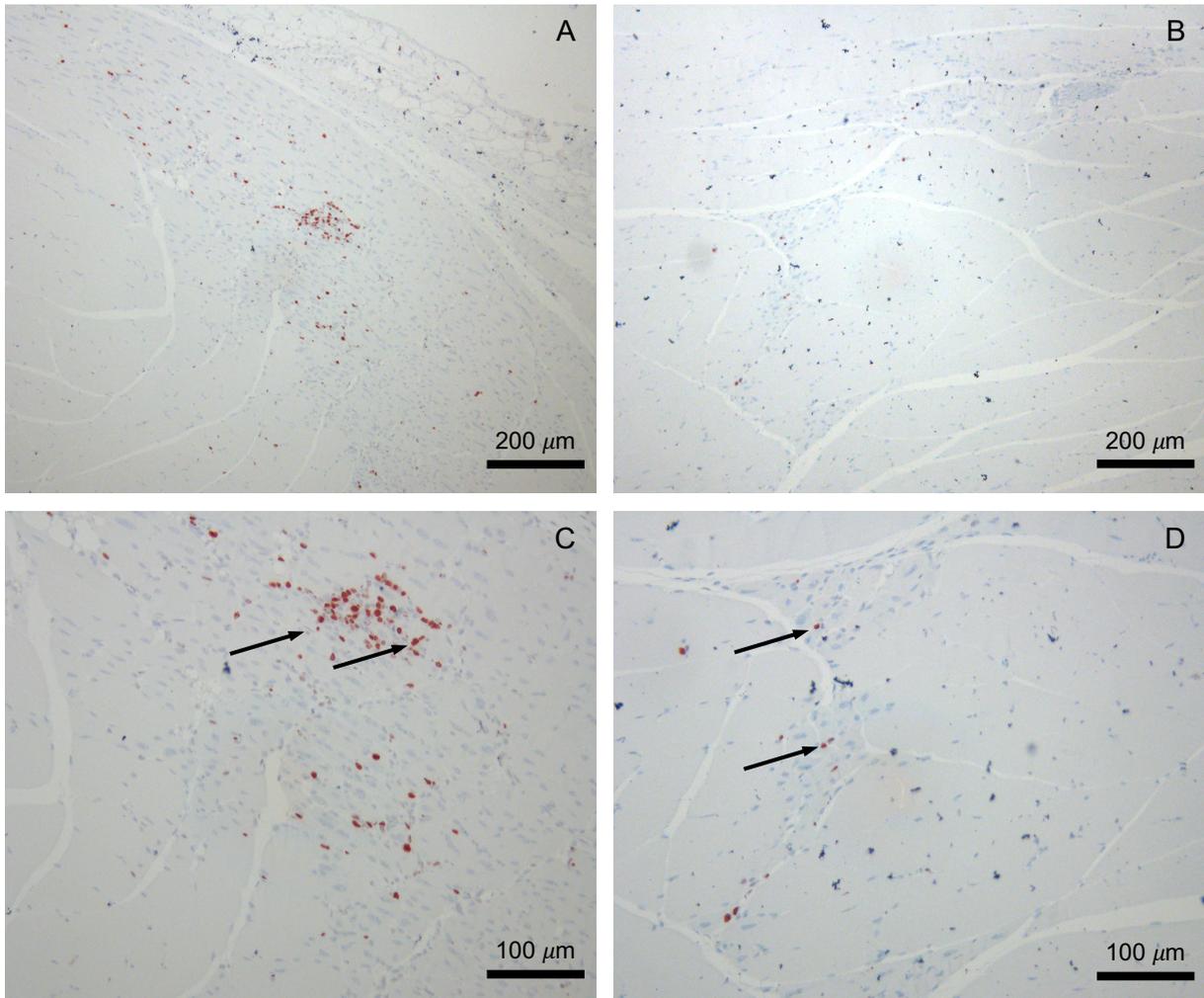
**Abb. 36** Histologie, CD-68 Färbung Tag 7, (A) 10x Vergrößerung Kontusionsgruppe, (B) 10x Vergrößerung Punktionsgruppe, (C) 20x Vergrößerung Kontusionsgruppe, (D) 20x Vergrößerung Punktionsgruppe, Schwarze Pfeile: CD-68 positive Zellen.

### 4.8.3 Ki-67 Färbung

In der quantitativen Auswertung der Ki-67-Präparate ergaben sich beim Vergleich der Zellzahlen der traumatisierten mit der nicht traumatisierten Extremität in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), Tag 4 ( $p < 0,01$ ), Tag 7 ( $p < 0,01$ ) und Tag 14 ( $p < 0,01$ ) signifikant höhere Zellzahlen/ROI. In der Punktionsgruppe zeigte sich an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), Tag 4 ( $p < 0,01$ ) und Tag 7 ( $p < 0,01$ ) eine signifikant höhere Zellzahl/ROI. An Tag 14 konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Beim Vergleich der beiden traumatisierten Extremitäten der Kontusions- und Punktionsgruppe konnten in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ) und Tag 7 ( $p < 0,01$ ) signifikant höhere Zellzahlen/ROI gezeigt werden. An Tag 4 und Tag 14 wurde kein signifikanter Unterschied gemessen.



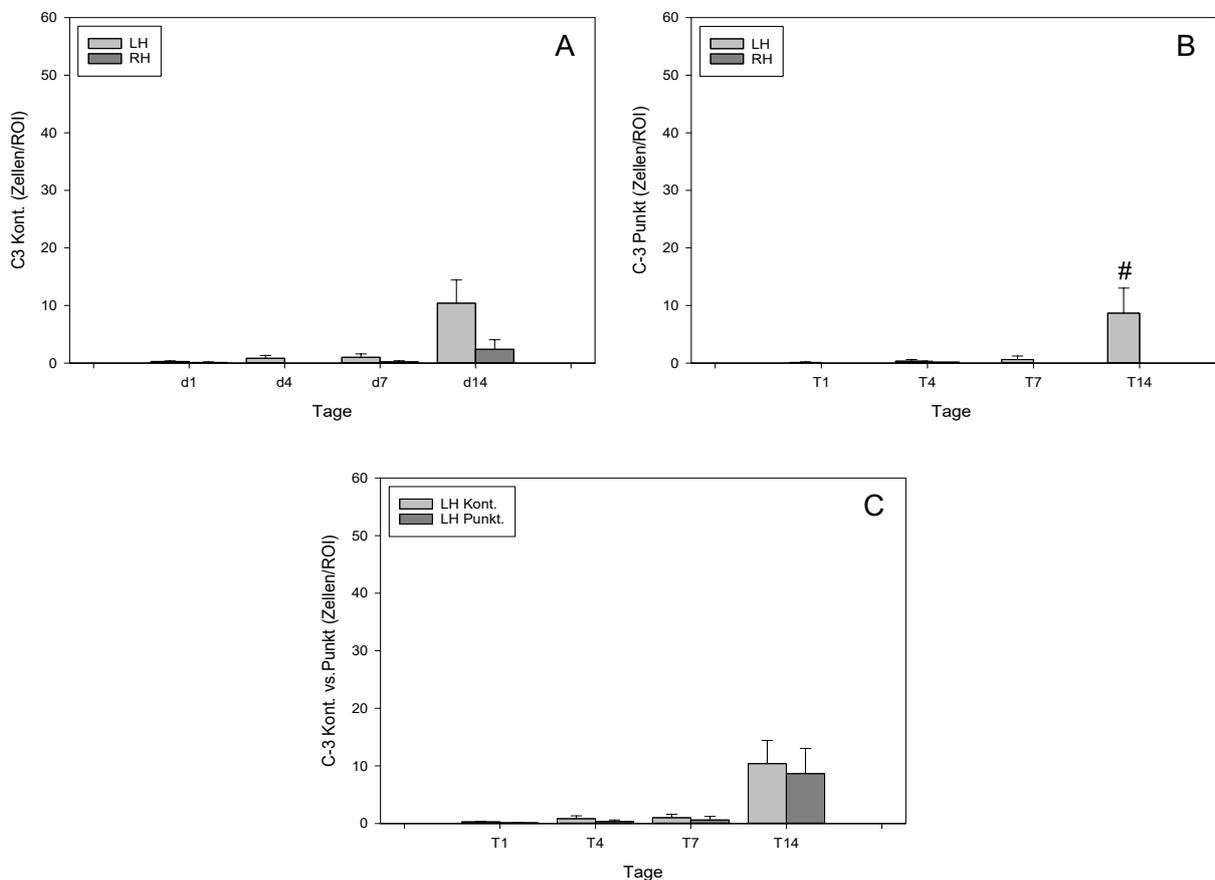
**Abb. 37** Histologie, Ki-67-Färbung (Zellzahl/ROI), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (+  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



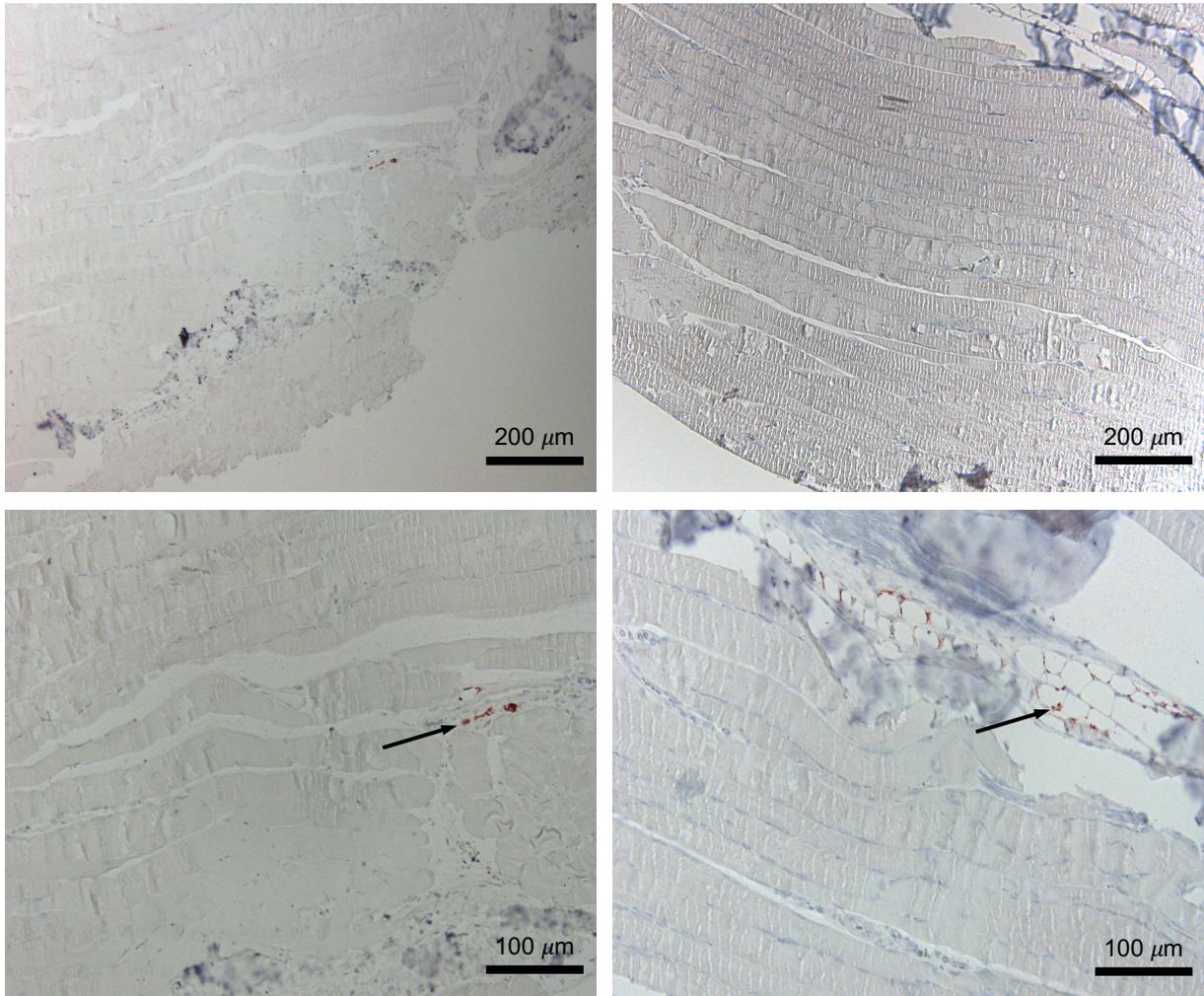
**Abb. 38** Histologie, Ki-67-Färbung Tag 7, (A) Kontusionsgruppe 10x Vergrößerung, (B) Punktionsgruppe 10x Vergrößerung, (C) Kontusionsgruppe 20x Vergrößerung, (D) Punktionsgruppe 20x Vergrößerung, schwarze Pfeile: Ki-67 positive Zellen.

#### 4.8.4 Caspase-3 Färbung

Die quantitative Auswertung der Caspase-3-Präparate ergab beim Vergleich der Zellzahlen der traumatisierten mit der nicht traumatisierten Extremität in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p>0,05$ ), Tag 4 ( $p>0,05$ ), Tag 7 ( $p>0,05$ ) und Tag 14 ( $p>0,05$ ) keine signifikanten Anstiege, wobei an Tag 14 eine höhere Zellzahl in der traumatisierten Extremität gemessen wurde. In der Punktionsgruppe zeigte sich an Tag 14 ( $p<0,05$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. An Tag 1 ( $p>0,05$ ), Tag 4 ( $p>0,05$ ) und Tag 7 ( $p>0,05$ ) konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Beim Vergleich der beiden traumatisierten Extremitäten der Kontusions- und Punktionsgruppe konnten an Tag 1 ( $p>0,05$ ), Tag 4 ( $p>0,05$ ), Tag 7 ( $p>0,05$ ) und Tag 14 ( $p>0,05$ ) keine Signifikanzen gezeigt werden.



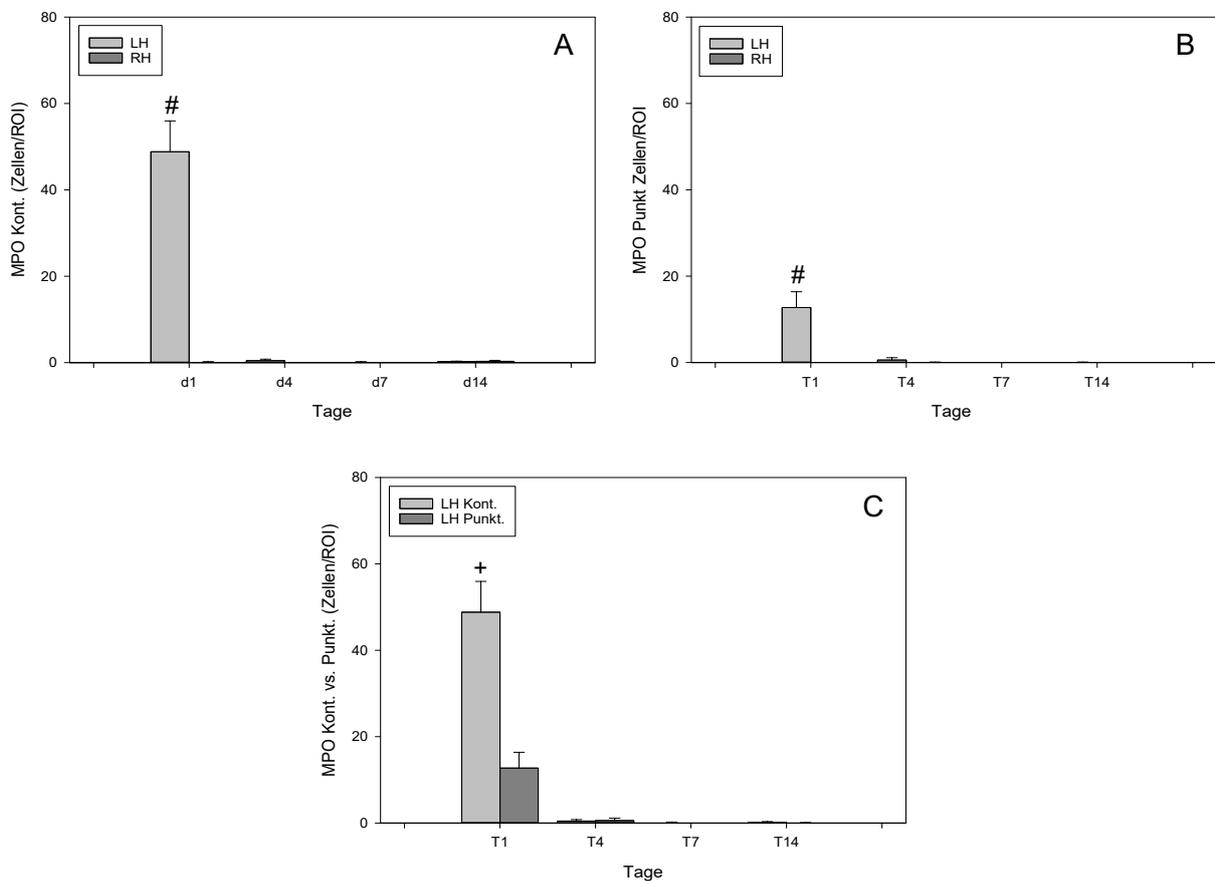
**Abb. 39** Histologie, Caspase-3-Färbung (Zellzahl/ROI), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (+  $p<0,05$  vs. Punkt, #  $p<0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



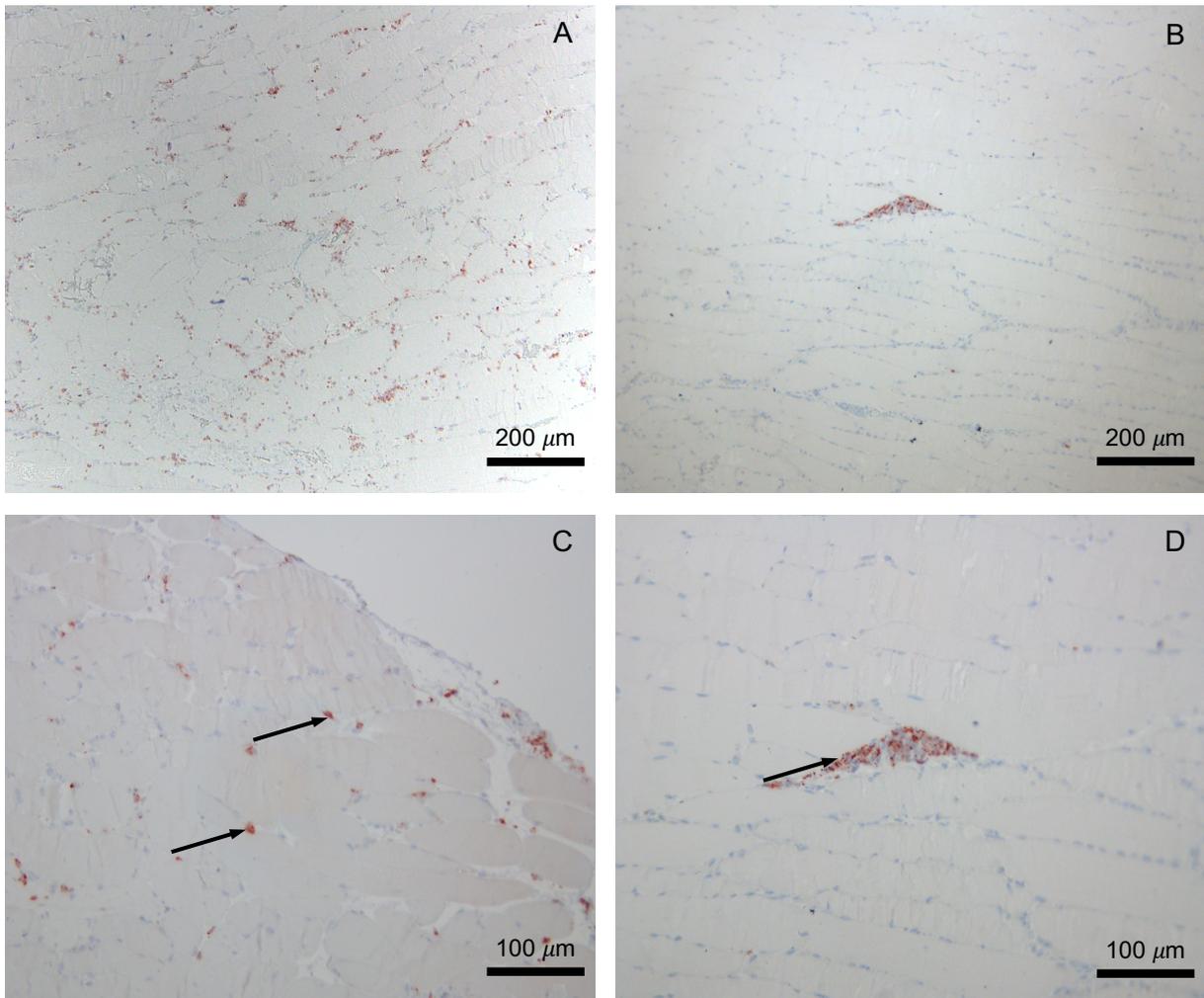
**Abb. 40** Histologie, Caspase-3-Färbung Tag 14, (A) Kontusionsgruppe 10x Vergrößerung, (B) Punktionsgruppe 10x Vergrößerung, (C) Kontusionsgruppe 20x Vergrößerung, (D) Punktionsgruppe 20x Vergrößerung, schwarze Pfeile: C-3-positive Zellen.

#### 4.8.5 MPO Färbung

Die quantitative Auswertung der MPO-Präparate ergab beim Vergleich der Zellzahlen der traumatisierten mit der nicht traumatisierten Extremität in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ), jedoch nicht an Tag 4 ( $p > 0,05$ ), Tag 7 ( $p > 0,05$ ) und Tag 14 ( $p > 0,05$ ), eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. In der Punktionsgruppe zeigte sich ebenfalls an Tag 1 ( $p < 0,01$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl/ROI. An Tag 4 ( $p > 0,05$ ), Tag 7 ( $p > 0,05$ ) und Tag 14 ( $p > 0,05$ ) konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Beim Vergleich der beiden traumatisierten Extremitäten der Kontusions- und Punktionsgruppe konnte in der Kontusionsgruppe an Tag 1 ( $p < 0,01$ ) eine signifikant erhöhte Zellzahl gemessen werden, an Tag 4 ( $p > 0,05$ ), Tag 7 ( $p > 0,05$ ) und Tag 14 ( $p > 0,05$ ) wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.



**Abb. 41** Histologie, MPO-Färbung (Zellzahl/ROI), (A) Kontusionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (B) Punktionsgruppe linker vs. rechter Hinterlauf, (C) Kontusions- vs. Punktionsgruppe linker Hinterlauf. (+  $p < 0,05$  vs. Punkt, #  $p < 0,05$  vs. RH.). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.



**Abb. 42** Histologie, MPO-Färbung Tag 1, (A) Kontusionsgruppe 10x Vergrößerung, (B) Punktionsgruppe 10x Vergrößerung, (C) Kontusionsgruppe 20x Vergrößerung, (D) Punktionsgruppe 20x Vergrößerung. Schwarze Pfeile: MPO-positive Zelle.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Skelettmuskelverletzungen sind häufige Verletzungen, insbesondere im Breiten- und Spitzensport. Trotz der Häufigkeit des Krankheitsbildes sind bisher neben symptomatischen Akutmaßnahmen nur wenige, größtenteils auf Expertenmeinung respektive klinischer Erfahrung basierende Therapiemaßnahmen verfügbar. Weit verbreitete Therapien wie intramuskuläre Injektionen mit Traumeel, Actovegin oder Lokalanästhetika sind nicht hinreichend evidenzbasiert belegt [128]. Weiterhin bedürfen neuartige Verfahren wie Zelltherapien durch beispielsweise intramuskuläre Stammzellinfiltrationen einer genaueren Untersuchung [27]. Daher sind tierexperimentelle Traumamodelle zur Analyse der Regeneration von Skelettmuskeltraumata notwendig.

In Studien mit humanen Teilnehmern zur Untersuchung von Muskeltraumata wurden zumeist gesunde Probanden durch repetitives Training isolierter Muskelgruppen hinsichtlich der Trainingseffekte zur Verletzungsprävention untersucht [122,124,190]. Aufgrund ethischer Bedenken und der damit verbundenen limitierten Untersuchungsmöglichkeiten werden Studien zu Muskeltraumata mit menschlichen Probanden, trotz der vermeintlich hohen klinischen Relevanz, nur selten durchgeführt. Vielmehr eignen sich tierexperimentelle Studien, vor allem an Kleintieren wie Mäusen oder Ratten aufgrund der kostengünstigen Haltung, einfachen Handhabung, vergleichbaren Physiologie und Anatomie sowie genetischen Nähe (80-90%) zum Menschen, deutlich besser [165,180].

Hier stehen aktuell in-vitro sowie in-vivo Modelle für tierexperimentelle Untersuchungen zur Verfügung.

Die verfügbaren in-vitro Modelle werden zur Untersuchung zellulärer Mechanismen der Muskelphysiologie und Pathologie herangezogen. Dafür werden die benötigten Muskelfasern oder Bündel beispielsweise extrahiert und in einer Nährlösung gelagert, die eine adäquate, extrazelluläre Umgebung simuliert. Das Muskeltrauma wird daraufhin durch eine exzentrische Überdehnung während der Muskelkontraktion herbeigeführt [100,108]. Nachteil der in-vitro Modelle ist der hohe technische Aufwand der Experimente bei jedoch in Relation oftmals begrenztem klinischen Nutzen [6]. Dadurch besteht die Gefahr, dass Aspekte des Tierwohls vernachlässigt werden [146] [148]. Andererseits lassen sich durch in-vitro Modelle sehr genaue Ergebnisse im Hinblick auf isolierte Parameter wie Muskelkraft, Reißfestigkeit oder Dehnbarkeit erzielen. Weiter eignen sich in-vitro Modelle gut für Studien mit Fragestellungen hinsichtlich zellulärer Vorgänge.

In-vivo Modelle unterscheiden mechanische Traumata wie zum Beispiel durch Kontusion, Überdehnung, Laceration, Punction oder Applikation von Kälte. Zudem sind in der Literatur chemische oder myotoxisch induzierte Muskeltrauma beschrieben [62,166]. Die mechanischen Traumamodelle, insbesondere das Kontusionstrauma findet die häufigste Anwendung in der Muskeltraumaforschung [166].

Man unterscheidet bei den Kontusionstraumata wiederum zwei verschiedene Hauptarten, das Quetschtrauma und das stumpfe, nicht penetrierende Kontusionstrauma. Ein Quetschtrauma wird dem Versuchstier meist nach vorheriger chirurgischer Freilegung des ausgewählten Muskels zugefügt. Das Trauma wird dabei durch Quetschung mittels Klemme oder Zange oder durch eine mechanische Vorrichtung wie zum Beispiel einen Hammer oder hydraulischen Bolzen verursacht [58,73,140,171]. Das so erzeugte Quetschtrauma ist jedoch schwierig mit der typischen Skelettmuskelverletzung des Menschen zu vergleichen. Zum einen wird durch die Quetschung typischerweise ein sehr schwerwiegender Muskelschaden mit einer massiven Verletzung der Muskelfasern erzeugt, wie es beim Menschen nur bei stärksten Traumata der Fall ist [1,171].

Zum anderen wird vermutet, dass die chirurgische Intervention zur Präparation des Muskels, welche vielfach durchgeführt wird, entzündliche Prozesse triggert und somit gemessene Immunreaktionen nicht allein auf das Skelettmuskeltrauma zurückzuführen sind [161]. Insofern eignen sich Quetschmodelle nicht zur Untersuchung der typischen sportmedizinisch relevanten Skelettmuskelverletzung. Ferner können so schwerste Verletzungen an der Muskulatur und deren Folgen auf den Organismus erforscht werden [1,118].

Das nicht penetrierende, stumpfe Kontusionstrauma ist die am weitesten verbreitete Methode zur Induktion einer Skelettmuskelverletzung [166]. Hierbei wird typischerweise ein Metallgegenstand durch ein auf den betreffenden Muskel aufgesetztes Gleitrohr fallengelassen [3,4,26,28,80,82]. Analog zum Mensch wird die untere Extremität dafür genutzt, da der Großteil der Muskeltraumata die untere Extremität betrifft [41]. Die einzelnen Kontusionsmodelle wiederum unterscheiden sich in Maße und Form des Fallgewichtes sowie der Fallhöhe. Das eingesetzte Fallgewicht kann von 16g [96,125] bis über 200g reichen [99,158]. Einige Studien bevorzugen eine Kugelform [28,93], andere wiederum benutzen eine Zylinderform [81]. Die hier vorliegende Studie benutzt ebenfalls eine Zylinderform, da sich die auftreffende Kraft auf den Muskel flächiger verteilt als bei einer Kugelform, welche eher einen punktförmigen Aufprall verursacht. Die Fallhöhe des Gewichtes variiert zwischen Höhen von 15-20cm [4,11,159] und Höhen von ca. 100cm [96,158]. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Parameter von Fallhöhe und Gewicht lokalisieren sich eher am unteren Spektrum der bisher genutzten Werte. Die oben beschriebenen Parametergrenzen beziehen Studien an Mäusen, ebenso wie an Ratten ein, für welche deutlich höhere Kräfte zur adäquaten Traumainduktion notwendig sind. Durch die relativ niedrig induzierte Energie am unteren Ende

des Spektrums ist ein mildes bis moderates Muskeltrauma zu erwarten [101], was zum einen der menschlichen Realität entspricht (70% der Muskeltraumata nach MRT Klassifikation <Grad 2) [116] und zum anderen dem Tierwohl bei doch verwertbaren Ergebnissen entgegenkommt.

Des Weiteren existieren Muskeltraumamodelle, bei denen der Defekt durch eine Überdehnung der Muskulatur im Sinne einer klassischen „Zerrung“ beziehungsweise eines funktionellen Muskeltraumas verursacht wird [74]. Hierbei wird der betroffene Muskel entweder elektrisch stimuliert und gleichzeitig im Sinne einer exzentrischen Kontraktion bis zum Riss der Muskelfasern gedehnt [19,136] oder durch mechanische Traktion an der dem Muskel zugeordneten Sehne geschädigt [25,34]. Vorteilhaft ist hier die gute Reproduzierbarkeit des Traumas und die geringe Invasivität. Problematisch ist jedoch, dass die erzeugten Traumata bezogen auf den Menschen wenig klinische Relevanz haben, da die Ätiologie von funktionellen Muskeltraumata sich deutlich von den durch Tetanie und exzentrischer Kontraktion erzeugten Muskeltraumata unterscheidet [167,172].

Die Lazerationsmodelle nutzen die chirurgische Durchtrennung des Muskels zur Traumainduktion [77,110,121]. Diese Art des Traumas bietet aufgrund der gesicherten Durchtrennung der Muskelfasern eine hervorragende Möglichkeit für Experimente hinsichtlich der bindegewebigen Narbenbildung bei der Muskelheilung [129,157]. Nichtsdestotrotz werden durch Lazerationsmodelle ebenfalls kaum auf den Menschen im sportmedizinischen Sinne übertragbare Traumata erzeugt, da die komplette Ruptur eines Muskels im klinischen Alltag eher die Ausnahme als die Regel darstellt. Diese Art von Verletzungen tritt eher bei schweren Verkehrsunfällen oder Naturkatastrophen auf [166].

In der hier vorliegenden Arbeit wird neben dem etablierten Kontusionsmodell ein Punktionsmodell, von Contreras et al. 2016, genutzt. Das hierbei erzeugte Muskeltrauma durch Punktion des entsprechenden Muskels soll, wie die Lazerationsmodelle, ein Trauma mit einer Durchtrennung von Muskelfasern erzeugen. Der Vorteil besteht hier in der geringeren Anzahl von durchtrennten Muskelfasern, welche einer strukturellen Muskelläsion beim Menschen (Typ 3 & 4) deutlich näherkommt. So kann die Muskelheilung, auch im Hinblick auf die bindegewebige Narbenbildung, mit einem erheblich klinisch relevanteren Modell untersucht werden [28].

Zur Beobachtung des Verlaufs der Muskelheilung nach stattgehabtem Trauma gibt es bisher keine allgemeingültigen Protokolle. Die meisten Autor/-innen führen eine histologisch/zellbiologische Analyse durch [27,37,54,58,62,71,85,125,145,152,187] andere wiederum nutzen zusätzlich oder ausschließlich biomechanische Verfahren [29–31,77,83,96,100]. An bildgebenden Verfahren wird zumeist eine MRT-Untersuchung der traumatisierten Muskel durchgeführt [28,101,107,187]. Funktionelle Analysen durch eine

Ganganalyse oder die Nutzung von hoch-auflösendem Ultraschall in Kombination mit photoakustischen Messungen sind bisher zur Untersuchung der Skelettmuskelheilung nicht beschrieben.

Die hier vorliegende Arbeit nutzte zum Vergleich der ausgelösten Muskelheilung der beiden Muskelmodelle eine funktionelle, bildmorphologische und histologische Analyse.

Die funktionellen Messungen wurden per Ganganalyse mit dem CatWalk XT10 (Noldus, Wageningen, Niederlande) erhoben. In den letzten Jahren hat sich dieses Verfahren durchgesetzt, da es gegenüber anderen Methoden, eine automatisierte und reproduzierbare sowie zwangsfreie Analyse von statischen und dynamischen Parametern gewährleistet [15,46,48,70,113,130]. Das CatWalk System wird in einer Vielzahl von Versuchen mit unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt, ein Einsatz im Hinblick auf Veränderungen des Gangbildes nach einem Muskeltrauma in der Literatur nur vereinzelt beschrieben [141,149].

In der umfassenden Ganganalyse wurde eine Vielzahl von statischen und dynamischen Parametern erfasst und ausgewertet, welche häufig zueinander in Beziehung stehen. Erst in der Zusammenschau dieser Parameter lassen sich die komplexen biomechanischen Abläufe und Muster, die zur Ganganalyse nötig sind, verstehen. Daher sollte bei der Ganganalyse nie eine Schlussfolgerung aus der Änderung eines einzelnen biomechanischen Parameters gezogen werden [91].

Da bisher nur vereinzelte Studien [141,149] zur Ganganalyse mittels CatWalk hinsichtlich des Gangverhaltens nach Muskeltrauma verfügbar sind, wurde sich in dieser Studie auch an Vorstudien mit anderen Fragestellungen orientiert. Hierbei wurden durch die oben genannten Studien etablierte statische Parameter wie die Schrittlänge (Stride length), Standzeit (Stand), Schwungzeit (Swing), dynamische Parameter wie den Schrittzzyklus (Stand + Swing) und den Belastungszyklus (Duty cycle) sowie druckabhängige Parameter wie die Fläche des Maximalen Kontaktes (Max contact area) genutzt.

Die bildmorphologische Analyse erfolgte zum einen durch magnetresonanztomographische Untersuchungen (MRT) und zum anderen durch hoch-auflösenden Ultraschall (hrUS) und Photoakustik (PA).

MRT-Untersuchungen stellen eine etablierte, nicht-invasive und strahlungsarme Methode zur morphologischen Untersuchung von unterschiedlichen Geweben in-vivo dar. Kleintier MRT-Untersuchungen wurden bisher bei einer Vielzahl von Studien mit Fragestellungen hinsichtlich beispielsweise Tumorerkrankungen oder Schlaganfällen zur Darstellung der Morphologie von Geweben eingesetzt [114,131,182,193]. Es wurden ebenfalls Studien zur Erforschung von Muskeltraumata und Muskelheilung unter Zuhilfenahme von MRT-Scans publiziert [28,107,187]. So können in der MRT-Bildgebung analog zum Menschen typische Merkmale eines Skelettmuskelschadens wie ein posttraumatisches Ödem und dessen Resorption im

Verlauf oder typische „gefiederte“ Hyperintensitäten im Muskel nachgewiesen werden [28]. Somit ist die MRT-Bildgebung ein wertvolles Werkzeug zum Nachweis der posttraumatischen Muskelschäden im Mausmodell.

Ein Nachteil der MRT-Bildgebung ist die lange Dauer der einzelnen Untersuchung (ca. 20-30 min). Daher wurden bereits mehrere Studien publiziert, welche den parallelen Scan von mehreren Kleintieren diskutieren [17,94,186].

Weiter wurden hochauflösende Hochfrequenz-Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Untersuchungen unter Zuhilfenahme von Ultraschall in Kleintiermodellen sind etablierte Methoden zur Akquisition von nicht-invasiven, strahlungsarmen in-vivo Messungen der Gewebemorphologie in Echtzeit und wurden bereits verschiedenfach in Studien veröffentlicht [47,142,143,162,185]. Bis zu diesem Zeitpunkt sind jedoch keine Publikationen im Hinblick auf Skelettmuskeltraumata verfügbar.

Es wurden konventionelle B-Mode Ultraschalluntersuchungen mit einer Schichtdicke von 100µm, wie auch Messungen der Sauerstoffsättigung und des Hämoglobingehaltes im Gewebe unter Zuhilfenahme von photoakustisch induziertem Ultraschall durchgeführt, wie in anderen Studien beschrieben [104,120,143]. Daraufhin erfolgte die Auswertung des posttraumatischen Verlaufes nach Muskeltrauma wie oben beschrieben. So lassen sich schnell, nicht-invasiv und hochauflösend Stadien der Muskelheilung nach Skelettmuskeltrauma nachweisen. Zusätzlich können durch die photoakustische Technik biochemische Prozesse in-vivo und in Echtzeit beobachtet werden. In Zusammenschau mit der deutlich kürzeren Untersuchungszeit im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren wie MRT bietet die Ultraschalluntersuchung daher ein großes Portfolio an wissenschaftlichem Nutzen in der Muskeltraumaforschung. Nachteile der Ultraschalluntersuchung sind die immer noch limitierte Eindringtiefe und die hohe Untersucherabhängigkeit [10].

Zur histologischen und immunhistochemischen Analyse war eine Tötung der Tiere notwendig. Die histologische und immunhistochemische Auswertung des Skelettmuskels ermöglicht die zelluläre Analyse nach Skelettmuskeltrauma im Vergleich zum gesunden Skelettmuskel und stellt eine Standardmethode in der Kleintierforschung dar.

Zur allgemeinen Darstellung der Zellmorphologie des Skelettmuskels werden Standardfärbungen wie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzt. Bezogen auf die Skelettmuskelheilung konnten hier Entzündungsreaktionen und Muskelfaserschäden analog zu bisher publizierten Studien beobachtet werden [28,36,57,59,80,93,121,140,152,179]. Zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit Antikörpern gegen CD 68 und MPO, der Zellproliferation mit Antikörpern gegen Ki-67 und zum Nachweis von Apoptose mit Antikörpern gegen Caspase-3 wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei zeigten sich die aus vorherigen Studien

nachgewiesenen Zellinfiltrationen durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten [37,62] und die im Verlauf hochregulierte Zellproliferation [62,184]. Zur histologischen Analyse der Caspase-3 nach Skelettmuskeltrauma ist bislang keine Studie verfügbar. Durch das verwendete Protokoll lässt sich ein guter Überblick über die Abläufe der zellulären Prozesse während der Skelettmuskelheilung nach Trauma gewinnen. Weiterführend könnten noch Marker zum spezifischeren Nachweis der Morphologie der Basallamina wie bereits durch Hardy et al. 2015 oder zum Nachweis von Kollagen [58,157] zur besseren Darstellung der Bindegewebsnarbe verwendet werden.

Zur Beobachtung des posttraumatischen Verlaufs wurden in Anlehnung an die physiologische Muskelheilung [75] ein Beobachtungszeitpunkt vor (BT) und direkt nach Trauma (IT) sowie an den posttraumatischen Tagen 1,4,7 und 14 gewählt. Hierdurch konnten die direkten und kurz bis mittelfristigen Auswirkungen auf den Muskel studiert werden. Contreras et al. wählten zusätzlich weiterführende Zeitpunkte an Tag 21,26,35 und 46. Im hier genutzten Rattenmodell zeigten sich jedoch ab Tag 26 nur noch marginale Befunde. Aufgrund der schnelleren Muskelheilung der Maus und der nicht auf Langzeitveränderungen ausgelegten Studie, wurde ein posttraumatischer Beobachtungszeitraum bis Tag 14 gewählt. Einige Autoren geben den Tag 21 als Endpunkt der Muskelheilung der Maus an [56,62,170], weswegen auch im Hinblick auf die Wirkung verschiedener Agens der Zeitpunkt Tag 21 für weiterführende Studien zu bedenken ist.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurden ein standardisiertes Kontusionsmodell mit einem Punktionsmodell und die induzierte Skelettmuskelheilung funktionell, bildmorphologisch und histologisch analysiert und verglichen.

Das Gewicht der Versuchstiere beider Gruppen zeigte sich posttraumatisch ohne signifikante Zu- oder Abnahme. Daher kann von keiner veränderten Nahrungsaufnahme und somit von einer guten Verträglichkeit des Versuches für die Tiere ausgegangen werden. Weiterhin wurde bei keinem der Versuchstiere eine Infektion im Applikationsgebiet beobachtet, sodass die Versuchsergebnisse einzig auf die Trauma-induktion zurückzuführen sind.

Die funktionelle Analyse erfolgte durch die Untersuchung des Gangbildes per CatWalkXT 10 (Noldus, Wageningen, Niederlande). Hier zeigten sich vor Allem die Parameter zur Messung der Abdruckkraft (Max Contact Max Intensity, Max Contact Mean Intensity) um den Tag 7 signifikant erniedrigt. Die Kontaktdauer (Stand), im Sinne einer vermehrten Belastung der traumatisierten Pfote, hingegen blieb in beiden Versuchsgruppen unverändert. Die dynamischen Parameter (Step cycle, Duty cycle, Stand) zeigten sich ebenfalls in beiden Versuchsgruppen und beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen ohne signifikante Unterschiede.

Daher kann in Zusammenschau der statischen und funktionellen Parameter davon ausgegangen werden, dass das jeweilig applizierte Muskeltrauma trotz einer Veränderung der Abdruckkraft keine Änderungen des Gangbildes hervorruft. Eine mögliche Erklärung könnte das milde Trauma sein oder aber die durch die Verabreichung von Schmerzmitteln induzierte Analgesie. Übertragen auf den Menschen werden ebenfalls sowohl im Amateur- als auch Leistungssport erhebliche Mengen an Analgetika eingesetzt, wodurch der im Muskel vorhandene Schaden oft merklich unterschätzt wird und die Sportler den Nebenwirkungen der Übereinnahme von Schmerzmitteln ausgesetzt [63,144,151,173]. Da bisher nur vereinzelte Studien zur murinen Gangbildveränderung unter Nutzung von Gaitwaysystemen nach Muskeltraumata verfügbar sind [141,149], sind hier weitere Studien zur Validierung der Ergebnisse notwendig.

Bildmorphologisch wurden Analysen per MRT sowie hochauflösendem Ultraschall in Kombination mit Photoakustik durchgeführt.

Im hier vorliegenden Versuch konnten in der MRT-Diagnostik sowohl beim Kontusions- wie auch Punktionsmodell Traumafolgen nachgewiesen werden. Vor Allem im Kontusionsmodell zeigte sich das zum Menschen analoge und für eine strukturelle Muskelläsion typische Muskelhämatom/-ödem mit federartiger Hyperintensität (vgl. Abb.17) [49,101,107,136,187]. In

der Punktionsgruppe ließ sich ein Stichkanal mit einem leichten Umgebungshämatom/Ödem nachweisen (vgl. Abb. 17).

Weiterhin wurde durch die volumetrische Bestimmung des Hämatoms/Ödems an allen Untersuchungszeitpunkten ein signifikant größeres Volumen der Kontusionsgruppe im Vergleich zur Punktionsgruppe nachgewiesen (vgl. Abb. 13). Das maximale Volumen des Hämatoms/Ödems (IT) an der traumatisierten Extremität war hierbei in der Kontusionsgruppe fast dreimal so groß wie das Maximalvolumen der Punktionsgruppe.

Die longitudinale Auswertung zeigte in beiden Versuchsgruppen an allen Messpunkten eine Volumenabnahme im Vergleich mit dem Maximalwert direkt nach Trauma. Hier war das Muskelhämatom in der Punktionsgruppe bis zum letzten Messpunkt (Tag 7) nur noch marginal nachweisbar, wohingegen das intramuskuläre Hämatom in der Kontusionsgruppe weiterhin gemessen werden konnte. Weiter zeigte sich nicht nur am Volumen des Hämatoms/Ödems, sondern auch am Gesamtvolumen des Unterschenkelmuskels im Vergleich zur Gegenseite ein größeres Volumen, wobei in der Kontusionsgruppe im Vergleich mit der Punktionsgruppe größere Volumina gemessen wurden (vgl. Abb. 12). Dies könnte durch das in der Kontusionsgruppe stärker ausgeprägte Trauma mit daraufhin erhöhter, konsekutiver inflammatorischer Reaktion und Ödembildung zurückzuführen sein.

Sonographisch wurden ebenfalls signifikante Volumenveränderungen der traumatisierten Extremitäten im Vergleich zum prätraumatischen Zustand (BT) in beiden Versuchsgruppen gemessen. Hier zeigte sich korrelierend zu den MRT-Befunden ebenfalls das Maximalvolumen an IT mit einer darauffolgenden kontinuierlichen Abnahme in den folgenden Messpunkten. Abermals zeigte sich hier das Kontusionstrauma im Vergleich mit dem Punktionsstrauma mit deutlich größeren Volumina. Zusätzlich zeigte sich ein eindeutiges Korrelat zum im MRT nachgewiesenen intramuskulären Hämatom/Ödem. Im klinischen Alltag kann jedoch häufig ein intramuskuläres Hämatom/Ödem erst in der MRT-Diagnostik nachgewiesen werden bei initial oftmals unauffälligem sonographischem Befund [116].

Durch die photoakustische Analyse konnten die Hämoglobinkonzentration sowie die Sauerstoffsättigung im verletzten Muskel in-vivo gemessen werden. Hier zeigte sich in der Kontusionsgruppe an Tag 1, Tag 4 und Tag 14 ein nicht signifikanter Abfall der Sauerstoffsättigung im Vergleich zum prätraumatischen Zustand und an Tag 1, 4 & 14 ein signifikanter Abfall des Hämoglobins. Dies kann durch einen hochregulierten Sauerstoffbedarf aufgrund einer Einwanderung von Immunzellen und durch die posttraumatische Minderdurchblutung im Muskel während der Muskelheilung verursacht werden [152].

Die Ergebnisse der Messung des Muskeldurchmessers per Schieblehre zeigten ebenfalls in der Kontusionsgruppe signifikant größere Werte im Vergleich mit der Punktionsgruppe.

In Zusammenschau der bildmorphologischen Analysen führte das Kontusionsmodell zu einem Trauma mit bildmorphologisch deutlich größeren Verletzungszonen und -reaktionen.

Histologisch wurde eine Standard HE-Färbung sowie immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD68, MPO, Caspase-3 und Ki-67 durchgeführt.

Makroskopisch zeigten sich analog zum applizierten Trauma in der Kontusionsgruppe im Verlauf flächige Defektzonen und in der Punktionsgruppe lineare Defektzonen nachfolgend des Stichkanals (vgl. Abb. 34).

In der Frühphase nach Trauma (Tag 1) wurden in beiden Gruppen signifikant erhöhte Zellzahlen im Vergleich zur Gegenseite in der HE-Färbung nachgewiesen. Weiterhin konnten in Anlehnung an Dobek et al. 2013, in der HE-Färbung ödembedingte Auseinanderweichungen der Muskelfasern sowie in den immunhistochemischen Färbungen ein starker Anstieg der neutrophilen Granulozyten (MPO, vgl. Abb. 32) sowie der Makrophagen (CD68, vgl. Abb. 30) beobachtet werden. Der rapide und frühe Anstieg der Leukozyten sowie die Ödembildung bilden wichtige Bausteine der physiologischen Muskelheilung [75].

Im weiteren Verlauf sind in der HE-Färbung Regenerationszonen mit zentronukleären Zellen nachweisbar (vgl. Abb. 34), was in der Zusammenschau mit der an Tag 7 deutlich erhöhten Konzentration an Ki-67 positiven Zellen auf eine hochregulierte Zellproliferation und Regeneration hindeutet. Guitart et al. konnten die erhöhte Expression von Ki-67 positiven Zellen am traumatisierten Muskel der Maus nach 7 Tagen ebenfalls nachweisen. Bis zum Tag 14 normalisierte sich die Zellzahl sowie die Zahl der Leukozyten wieder bei nun erhöhter Caspase-3 und somit erhöhter Apoptoseaktivität, was sich im Rahmen der Bildung der Bindegewebsnarbe im Rahmen der Muskelheilung erklären lässt.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Kontusions- mit der Punktionsgruppe zeigte sich, dass bis auf die Zellzahl der Caspase-3 positiven Zellen in der Kontusionsgruppe in jeder Messung signifikant höhere Zellzahlen vorhanden waren.

### 5.3 Fazit

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Traumamodelle zur Analyse der murinen Muskelheilung untersucht. Das neuartige Punktionsmodell sollte eine indirekte strukturelle Muskelverletzung erzeugen, das Kontusionsmodell eine direkte Kontusionsverletzung.

Aufgrund der beim Menschen sehr hohen Prävalenz des Kontusionstraumas ist das Kontusionsmodell in der Literatur bereits vielfach etabliert und zeigte erwartbar reliable Ergebnisse.

Das neuartige Punktionsmodell konnte auf zweierlei Weise nicht überzeugen. Zum einen konnte nur ein minimaler Strukturschaden am Muskel nachgewiesen werden. Zum anderen konnte dieser, insbesondere im Vergleich mit dem Kontusionsmodell, bereits nach wenigen Tagen nicht mehr detektiert werden.

Daher konnten sich die hohen Erwartungen an das Punctionstraumamodell nicht bestätigen, weswegen das Punctionstraumamodell keine Alternative zum Kontusionstraumamodell für zukünftige murine Muskeltraumaforschung darstellt.

In der Analyse der verschiedenen Traumamodelle konnten keine nennenswerten oder unterschiedlichen Auswirkungen auf das Gangbild beobachtet werden.

Die wiederholten Analysen bestehend aus einer Kombination von Ganganalyse, MRT, hochauflösendem Ultraschall, Photoakustik, Schieblehre und Histologie konnten trotz einer relativ kleinen Studiengröße den physiologischen Heilungsverlauf nach Muskeltrauma adäquat und reproduzierbar nachweisen. Die in-vivo Messungen bestehend aus einer funktionellen und bildmorphologischen Analyse lieferten Aussagen über den Heilungsverlauf nach Muskeltrauma, partiell äquivalent zu sonst notwendigen in-vitro Messungen.

## Literaturverzeichnis

1. Akimau P, Yoshiya K, Hosotsubo H, Takakuwa T, Tanaka H, Sugimoto H (2005) New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats. *J Trauma* 58:51–58
2. Almekinders LC (1991) Results of Surgical Repair Versus Splinting of Experimentally Transected Muscle. *J Orthop Trauma* 5:173–176
3. Ambrosio F, Ferrari RJ, Distefano G, Plassmeyer JM, Carvell GE, Deasy BM, Boninger ML, Fitzgerald GK, Huard J (2010) The Synergistic Effect of Treadmill Running on Stem-Cell Transplantation to Heal Injured Skeletal Muscle. *Tissue Eng Part A* 16:839–849
4. Amon M, Laschke MW, Harder Y, Vollmar B, Menger MD (2006) Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions. *J Trauma* 61:924–932
5. Arnason A, Tenga A, Engebretsen L, Bahr R (2004) A Prospective Video-Based Analysis of Injury Situations in Elite Male Football: Football Incident Analysis. *Am J Sports Med* 32:1459–1465
6. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, von Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe K-P, Grainger DW (2007) Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 8:72
7. Avwioro G (2010) Histochemical Uses of Haematoxylin - A Review. *JPCS* 1:
8. Baker BE (1984) Current concepts in the diagnosis and treatment of musculotendinous injuries. *Med Sci Sports Exerc* 16:323–327
9. Baker R (2006) Gait analysis methods in rehabilitation. *J NeuroEngineering Rehabil* 3:4
10. Balaban RS, Hampshire VA (2001) Challenges in small animal noninvasive imaging. *ILAR J* 42:248–262
11. Balisardo Minamoto V, Roberto Grazziano C, De Fátima Salvini T (1999) Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec* 254:281–287
12. Barton ER, Lynch G, Khurana TS, Grange RW, Raymackers JM, Dorchies O (2008) Measuring isometric force of isolated mouse muscles in vitro. *Exp Protoc DMD Anim Model Treat-NMD Neuromuscul Netw* 1:14

13. Batka RJ, Brown TJ, Mcmillan KP, Meadows RM, Jones KJ, Haulcomb MM (2014) The need for speed in rodent locomotion analyses. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007 297:1839–1864
14. Beare JE, Morehouse JR, DeVries WH, Enzmann GU, Burke DA, Magnuson DSK, Whittemore SR (2009) Gait Analysis in Normal and Spinal Contused Mice Using the TreadScan System. *J Neurotrauma* 26:2045
15. Bernardes D, Oliveira ALR (2017) Comprehensive catwalk gait analysis in a chronic model of multiple sclerosis subjected to treadmill exercise training. *BMC Neurol* 17:160
16. Bily W, Kern H (1998) Diagnose, Erstversorgung und Klassifikation von Muskelverletzungen in der Sportmedizin. *Sportverletz · Sportschaden* 12:87–93
17. Bock NA, Nieman BJ, Bishop JB, Mark Henkelman R (2005) In vivo multiple-mouse MRI at 7 Tesla. *Magn Reson Med* 54:1311–1316
18. Bramos A, Perrault D, Yang S, Jung E, Hong YK, Wong AK (2016) Prevention of Postsurgical Lymphedema by 9-cis Retinoic Acid. *Ann Surg* 264:353–361
19. Brickson S, Hollander J, Corr DT, Li Ji L, Best TM (2001) Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 33:2010–2015
20. Brockmann MA, Kemmling A, Groden C (2007) Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners. *Methods* 43:79–87
21. Brown RH (1996) Dystrophin-Associated Proteins and the Muscular Dystrophies: A Glossary. *Brain Pathol* 6:19–24
22. Cappozzo A, Della Croce U, Leardini A, Chiari L (2005) Human movement analysis using stereophotogrammetry: Part 1: theoretical background. *Gait Posture* 21:186–196
23. Carlson BM (1981) Denervation, Reinnervation, and Regeneration of Skeletal Muscle. *Otolaryngol Neck Surg* 89:192–196
24. Chan O, Del Buono A, Best TM, Maffulli N (2012) Acute muscle strain injuries: a proposed new classification system. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:2356–2362
25. Chan Y-S, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J (2005) The Use of Suramin, an Antifibrotic Agent, to Improve Muscle Recovery after Strain Injury. *Am J Sports Med* 33:43–51
26. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F (2009) Dual and Beneficial Roles of Macrophages During Skeletal Muscle Regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 37:18–22
27. Chiu C-H, Chang T-H, Chang S-S, Chang G-J, Chen AC-Y, Cheng C-Y, Chen S-C, Fu J-F, Wen C-J, Chan Y-S (2020) Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Muscle Healing After Contusion Injury in Mice. *Am J Sports Med* 48:1226–1235

28. Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, Serres X, De la Varga M, Viscor G, Järvinen T a. H, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Rodas G, Marotta M (2016) A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions. *Int J Sports Med* 37:183–190
29. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994) A Muscle Contusion Injury Model: Biomechanics, Physiology, and Histology. *Am J Sports Med* 22:702–710
30. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994) A Muscle Contusion Injury Model: Biomechanics, Physiology, and Histology. *Am J Sports Med* 22:702–710
31. Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P (1996) Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomech* 29:1291–1296
32. da Silva RP, Gordon S (1999) Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J* 338:687–694
33. de Almeida P, Lopes-Martins RÁB, Tomazoni SS, Albuquerque-Pontes GM, Santos LA, Vanin AA, Frigo L, Vieira RP, Albertini R, de Tarso Camillo de Carvalho P, Leal-Junior ECP (2013) Low-Level Laser Therapy and Sodium Diclofenac in Acute Inflammatory Response Induced by Skeletal Muscle Trauma: Effects in Muscle Morphology and mRNA Gene Expression of Inflammatory Markers. *Photochem Photobiol* 89:501–507
34. de Paiva Carvalho RL, Leal-Junior ECP, Petrellis MC, Marcos RL, de Carvalho MHC, De Nucci G, Lopes-Martins RAB (2013) Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) and Diclofenac (Topical and Intramuscular) as Single and Combined Therapy in Experimental Model of Controlled Muscle Strain in Rats. *Photochem Photobiol* 89:508–512
35. Dienes JA, Hu X, Janson KD, Slater C, Dooley EA, Christ GJ, Russell SD (2019) Analysis and Modeling of Rat Gait Biomechanical Deficits in Response to Volumetric Muscle Loss Injury. *Front Bioeng Biotechnol* 7:
36. Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, Geuna S, Gianfrancesco AD, Caporossi D, Pigozzi F, Borrione P (2014) Platelet-Rich Plasma and Skeletal Muscle Healing: A Molecular Analysis of the Early Phases of the Regeneration Process in an Experimental Animal Model. *PLOS ONE* 9:e102993
37. Dobek GL, Fulkerson ND, Nicholas J, Schneider BSP (2013) Mouse Model of Muscle Crush Injury of the Legs. *Comp Med* 63:227–232
38. Dössel O (2013) Bildgebende Verfahren in der Medizin: Von der Technik zur medizinischen Anwendung. Springer-Verlag
39. Ekstrand J, Gillquist J (1983) Soccer injuries and their mechanisms: a prospective

study. *Med Sci Sports Exerc* 15:267–270

40. Ekstrand J, Hägglund M, Waldén M (2011) Epidemiology of Muscle Injuries in Professional Football (Soccer). *Am J Sports Med* 39:1226–1232
41. Ekstrand J, Healy JC, Waldén M, Lee JC, English B, Hägglund M (2012) Hamstring muscle injuries in professional football: the correlation of MRI findings with return to play. *Br J Sports Med* 46:112–117
42. Ekstrand J, Askling C, Magnusson H, Mithoefer K (2013) Return to play after thigh muscle injury in elite football players: implementation and validation of the Munich muscle injury classification. *Br J Sports Med* 47:769–774
43. Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin J-C, Pujol S, Bauer C, Jennings D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward S, Miller JV, Pieper S, Kikinis R (2012) 3D Slicer as an Image Computing Platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging* 30:1323–1341
44. Feeley BT, Kennelly S, Barnes RP, Muller MS, Kelly BT, Rodeo SA, Warren RF (2008) Epidemiology of National Football League Training Camp Injuries from 1998 to 2007. *Am J Sports Med* 36:1597–1603
45. FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits, Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M (2014) FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48:178–192
46. Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P (2011) Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav* 97:603–610
47. Fernández-Domínguez I, Echevarria-Uraga JJ, Gómez N, Luka Z, Wagner C, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML, Rodríguez-Cuesta J (2011) High-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of non-alcoholic fatty liver disease progression in mice. *Ultrasound Med Biol* 37:1161–1169
48. Ferreira-Gomes J, Adães S, Castro-Lopes JM (2008) Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *J Pain* 9:945–954
49. Flores DV, Mejía Gómez C, Estrada-Castrillón M, Smitaman E, Pathria MN (2018) MR Imaging of Muscle Trauma: Anatomy, Biomechanics, Pathophysiology, and Imaging Appearance. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc* 38:124–148
50. Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, Meffert RH, Ochman S (2012) VEGF Improves

Skeletal Muscle Regeneration After Acute Trauma and Reconstruction of the Limb in a Rabbit Model. *Clin Orthop Relat Res* 470:3607–3614

51. Fritz T, Schäfer J, Scheuer C, Stutz J, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, Laschke MW, Klein M, Orth M (2022) Macrophage-activating lipoprotein (MALP)-2 impairs the healing of partial tendon injuries in mice. *Ann Anat - Anat Anz* 239:151818
52. Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96:183–195
53. Frueh FS, Körbel C, Gassert L, Müller A, Gousopoulos E, Lindenblatt N, Giovanoli P, Laschke MW, Menger MD (2016) High-resolution 3D volumetry versus conventional measuring techniques for the assessment of experimental lymphedema in the mouse hindlimb. *Sci Rep* 6:34673
54. Funk K, Scheerer N, Verhaegh R, Pütter C, Fandrey J, Groot H de (2014) Severe Blunt Muscle Trauma in Rats: Only Marginal Hypoxia in the Injured Area. *PLOS ONE* 9:e111151
55. Gabriel AF, Marcus M a. E, Honig WMM, Walenkamp GHIM, Joosten E a. J (2007) The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods* 163:9–16
56. Gayraud-Morel B, Chrétien F, Tajbakhsh S (2009) Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. *Regen Med* 4:293–319
57. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13–20
58. Ghaly A, Marsh DR (2010) Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Exp Gerontol* 45:381–388
59. Gharaibeh B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, Ingham SJM, Wright V, Fu F, Huard J (2012) Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* 96:82–94
60. Guitart M, Lloreta J, Mañas-García L, Barreiro E (2018) Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *J Cell Physiol* 233:4360–4372
61. Hajar R (2011) Animal Testing and Medicine. *Heart Views Off J Gulf Heart Assoc* 12:42
62. Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon J-M, Tajbakhsh S, Rocheteau P, Chrétien F (2016) Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE* 11:e0147198

63. Harle CA, Danielson EC, Derman W, Stuart M, Dvorak J, Smith L, Hainline B (2018) Analgesic Management of Pain in Elite Athletes: A Systematic Review. *Clin J Sport Med* 28:417–426
64. Hayashi D, Hamilton B, Guermazi A, de Villiers R, Crema MD, Roemer FW (2012) Traumatic injuries of thigh and calf muscles in athletes: role and clinical relevance of MR imaging and ultrasound. *Insights Imaging* 3:591–601
65. Herold S, Kumar P, Jung K, Graf I, Menkhoff H, Schulz X, Bähr M, Hein K (2016) CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci* 17:78
66. Hocutt JE, Jaffe R, Rylander CR, Beebe JK (1982) Cryotherapy in ankle sprains. *Am J Sports Med* 10:316–319
67. Holness C, Simmons D (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607–1613
68. Howell AM, Kobayashi T, Hayes HA, Foreman KB, Bamberg SJM (2013) Kinetic Gait Analysis Using a Low-Cost Insole. *IEEE Trans Biomed Eng* 60:3284–3290
69. Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. *JBJS* 84:822–832
70. Huehnchen P, Boehmerle W, Endres M (2013) Assessment of Paclitaxel Induced Sensory Polyneuropathy with “Catwalk” Automated Gait Analysis in Mice. *PLOS ONE* 8:e76772
71. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M (1991) Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 23:801–810
72. Jacobs RA, Díaz V, Meinild A-K, Gassmann M, Lundby C (2013) The C57Bl/6 mouse serves as a suitable model of human skeletal muscle mitochondrial function. *Exp Physiol* 98:908–921
73. Järvinen M (1976) Healing of a Crush Injury in Rat Striated Muscle: *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 84A:85–94
74. Järvinen TA, Kääriäinen M, Järvinen M, Kalimo H (2000) Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol* 12:155–161
75. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M (2005) Muscle Injuries: Biology and Treatment. *Am J Sports Med* 33:745–764
76. Józsa L, Réffy A, Demel S, Szilágyi I (1980) Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. *Z Exp Chir* 13:91–94
77. Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TLN, Sievänen H, Kalimo H, Järvinen M (1998)

Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res* 16:197–206

78. Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TL, Nissinen L, Heino J, Järvinen M, Kalimo H (2000) Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscul Disord NMD* 10:121–132

79. Kääriäinen M, Liljamo T, Pelto-Huikko M, Heino J, Järvinen M, Kalimo H (2001) Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord NMD* 11:360–369

80. Kalimo H, Rantanen J, Järvinen M (1996) Muscle injuries in sports. *Baillieres Clin Orthop* 2:1–24

81. Kami K, Senba E (2002) In Vivo Activation of STAT3 Signaling in Satellite Cells and Myofibers in Regenerating Rat Skeletal Muscles. *J Histochem Cytochem* 50:1579–1589

82. Karmacharya MB, Sultan LR, Kirkham BM, Brice AK, Wood AKW, Sehgal CM (2020) Photoacoustic Imaging for Assessing Tissue Oxygenation Changes in Rat Hepatic Fibrosis. *Diagnostics* 10:705

83. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SC, Huard J (1998) Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant* 7:585–598

84. Katti G, Ara S, Shireen D (2011) Magnetic resonance imaging (MRI) - A review. *Intl J Dent Clin* 3:

85. Kerkweg U, Schmitz D, de Groot H (2006) Screening for the formation of reactive oxygen species and of NO in muscle tissue and remote organs upon mechanical trauma to the mouse hind limb. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 38:83–89

86. Kho AT, Kang PB, Kohane IS, Kunkel LM (2006) Transcriptome-scale similarities between mouse and human skeletal muscles with normal and myopathic phenotypes. *BMC Musculoskelet Disord* 7:23

87. Kiessling F, Pichler BJ (2010) *Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide*. Springer Science & Business Media

88. Kirtley C (2006) *Clinical Gait Analysis: Theory and Practice*. Elsevier Health Sciences

89. Klinke R, Silbernagl S, Bauer C (1996) *Lehrbuch der Physiologie*. G. Thieme

90. Kuzon WM, Walker PM, Mickle DAG, Harris KA, Pynn BR, McKee NH (1986) An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies. *J Surg Res* 41:24–32

91. Lakes EH, Allen KD (2016) *Gait Analysis Methods for Rodent Models of Arthritic*

Disorders: Reviews and Recommendations. *Osteoarthritis Cartilage* 24:1837–1849

92. Lang G (2013) *Immunohistochemie*. Springer, Vienna. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1190-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1190-1_12)
93. Lanza F (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med Berl Ger* 76:676–681
94. Lazovic J, Stojkovic DS, Collins CM, Yang QX, Vaughan JT, Smith MB (2005) Hexagonal zero mode TEM coil: a single-channel coil design for imaging multiple small animals. *Magn Reson Med* 53:1150–1157
95. Lee P, Rattenberry A, Connelly S, Nokes L (2011) Our Experience on Actovegin, is it Cutting Edge? *Int J Sports Med* 32:237–241
96. Li H-Y, Zhang Q-G, Chen J-W, Chen S-Q, Chen S-Y (2013) The Fibrotic Role of Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt Pathway in Injured Skeletal Muscle after Acute Contusion. *Int J Sports Med* 34:789–794
97. Linxweiler J, Körbel C, Müller A, Hammer M, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Menger MD, Saar M (2018) A novel mouse model of human prostate cancer to study intraprostatic tumor growth and the development of lymph node metastases. *The Prostate* 78:664–675
98. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) *Taschenbuch Histologie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany New York, NY, USA
99. Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC-Y (2013) Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 28:725–734
100. Lynch GS, Faulkner JA (1998) Contraction-induced injury to single muscle fibers: velocity of stretch does not influence the force deficit. *Am J Physiol-Cell Physiol* 275:C1548–C1554
101. M. McBrier N, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N (2009) Reliability and Validity of a Novel Muscle Contusion Device. *J Athl Train* 44:275–278
102. Machicao F, Muresanu DF, Hundsberger H, Pflüger M, Guekht A (2012) Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *J Neurol Sci* 322:222–227
103. Macpherson PC, Dennis RG, Faulkner JA (1997) Sarcomere dynamics and contraction-induced injury to maximally activated single muscle fibres from soleus muscles of rats. *J Physiol* 500:523–533

104. Manohar S, Razansky D (2016) Photoacoustics: a historical review. *Adv Opt Photonics* 8:586–617
105. Manzano R, Toivonen JM, Calvo AC, Miana-Mena FJ, Zaragoza P, Muñoz MJ, Montarras D, Osta R (2011) Sex, fiber-type, and age dependent in vitro proliferation of mouse muscle satellite cells. *J Cell Biochem* 112:2825–2836
106. Mauro A (1961) SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493–495
107. McBrier N, Neuberger T, Denegar C, Sharkey N, Webb A (2009) Magnetic Resonance Imaging of Acute Injury in Rats and the Effects of Buprenorphine on Limb Volume. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS* 48:147–51
108. McCully KK, Faulkner JA (1985) Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *J Appl Physiol*
109. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008656
110. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J (2000) Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 82:131–137
111. Menzel CL, Pfeifer R, Darwiche SS, Kobbe P, Gill R, Shapiro RA, Loughran P, Vodovotz Y, Scott MJ, Zenati MS, Billiar TR, Pape H-C (2011) Models of Lower Extremity Damage in Mice: Time Course of Organ Damage and Immune Response. *J Surg Res* 166:e149–e156
112. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Ciemerych MA, Brzoska E (2020) Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 104:93–104
113. Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Sakuma Y, Orita S, Oikawa Y, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Ohtori S (2013) Assessment of pain behavior in a rat model of intervertebral disc injury using the CatWalk gait analysis system. *Spine* 38:1459–1465
114. Moats RA, Velan-Mullan S, Jacobs R, Gonzalez-Gomez I, Dubowitz DJ, Taga T, Khankaldyyan V, Schultz L, Fraser S, Nelson MD, Laug WE (2003) Micro-MRI at 11.7 T of a murine brain tumor model using delayed contrast enhancement. *Mol Imaging* 2:150–158
115. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell

RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang S-P, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562

116. Müller-Wohlfahrt H-W, Ueblacker P, Hänsel L, Betthäuser A, Binder A, Bloch W, Blottner D, Böck J, Brenner B, Eder K, Ekstrand J, Flück M, Garrett WEJ, Hänsel L, Hoffmann H, Hufnagl JM, Kornmayer A, Luttko G, Maassen N, Müller-Wohlfahrt H-W, Munding P, Schlumberger A, Schoser B, Ueblacker P, Wilhelmi T, Dvorák J (2014) *Muskelverletzungen im Sport. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage* edition. Thieme Verlag

117. Mündermann L, Corazza S, Andriacchi TP (2006) The evolution of methods for the capture of human movement leading to markerless motion capture for biomechanical applications. *J NeuroEngineering Rehabil* 3:6

118. Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, Uchida H, Yasui N, Tsutsui Y, Yoshizawa N, Hirotsu I, Morimoto Y, Kobayashi J (2011) Characterization of Systemic and Histologic Injury After Crush Syndrome and Intervals of Reperfusion in a Small Animal Model. *J Trauma Acute Care Surg* 70:1453–1463

119. Murray DG, Crown RS, Dickersin K, Duncan PW, Epps CH Jr, Ettinger WH Jr, Friedlaender GE, Lane JM, Lemons JE, Lewis JL, MacKenzie EJ, Pinals RS, Treuhaft PS, Bobyn JD, Callaghan JJ, Capello WN, Cauley JA, Davy DT, deAndrade JR, Engh CA, Fitzgerald RH Jr, Galante JO, Gilbert JL, Goldberg VM, Goldring SR, Harris WH, Herberts P, Hungerford DS, Jacobs JJ, Jasty M, Johanson NA, Lewallen DG, Maloney WJ, Rubash HE, Salvati EA, Sledge CB, Sumner DR, Willert HG, Wright TM, Gordon S, Chwirut DJ, Dutta C, Elliott JM, Ferguson JH, Hall WH, Johnston RC, McGunagle DS, Quatrano LA, Wortman JS, Shulman LE, Hodes RJ, Alexander DF, Pinn VW (1995) Total Hip Replacement. *JAMA* 273:1950–1956
120. Needles A, Heinmiller A, Sun J, Theodoropoulos C, Bates D, Hirson D, Yin M, Foster FS (2013) Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 60:888–897
121. Negishi S, Li Y, Usas A, Fu FH, Huard J (2005) The Effect of Relaxin Treatment on Skeletal Muscle Injuries. *Am J Sports Med* 33:1816–1824
122. Newton MJ, Morgan GT, Sacco P, Chapman DW, Nosaka K (2008) Comparison of responses to strenuous eccentric exercise of the elbow flexors between resistance-trained and untrained men. *J Strength Cond Res* 22:597–607
123. Nguyen HX, Tidball JG (2003) Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol* 547:125–132
124. Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, Sacco P (2001) How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc* 33:1490–1495
125. Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J (2008) Improved Muscle Healing after Contusion Injury by the Inhibitory Effect of Suramin on Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth. *Am J Sports Med* 36:2354–2362
126. Ntziachristos V (2010) Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods* 7:603–614
127. Ochoa O, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK (2007) Delayed angiogenesis and VEGF production in *CCR2*<sup>-/-</sup> mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 293:R651–R661
128. Orchard JW, Best TM, Mueller-Wohlfahrt H-W, Hunter G, Hamilton BH, Webborn N, Jaques R, Kenneally D, Budgett R, Phillips N, Becker C, Glasgow P (2008) The early management of muscle strains in the elite athlete: best practice in a world with a limited evidence basis. *Br J Sports Med* 42:158–159
129. Park J-K, Ki M-R, Lee E-M, Kim A-Y, You S-Y, Han S-Y, Lee E-J, Hong I-H, Kwon S-

- H, Kim S-J, Rando TA, Jeong K-S (2012) Losartan improves adipose tissue-derived stem cell niche by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis in skeletal muscle injury. *Cell Transplant* 21:2407–2424
130. Parvathy SS, Masocha W (2013) Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskelet Disord* 14:14
131. Pautler RG, Koretsky AP (2002) Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 16:441–448
132. Pivec R, Johnson AJ, Mears SC, Mont MA (2012) Hip arthroplasty. *The Lancet* 380:1768–1777
133. Plant PJ, Bain JR, Correa JE, Woo M, Batt J (2009) Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 107:224–234
134. Porozov S, Cahalon L, Weiser M, Branski D, Lider O, Oberbaum M (2004) Inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  Secretion from Resting and Activated Human Immunocytes by the Homeopathic Medication Traumeel® S. *Clin Dev Immunol* 11:143–149
135. Prajapati N, Kaur A, Sethi D (2021) A Review on Clinical Gait Analysis.
136. Pratt SJP, Lawlor MW, Shah SB, Lovering RM (2012) An in vivo rodent model of contraction-induced injury in the quadriceps muscle. *Injury* 43:788–793
137. Qazi TH, Duda GN, Ort MJ, Perka C, Geissler S, Winkler T (2019) Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 10:501–516
138. R J, Gj van IS (1992) Intermuscular coordination in a sprint push-off. *J Biomech* 25:
139. Ramos LA, de Carvalho RT, Abdalla RJ, Ingham SJM (2015) Surgical treatment for muscle injuries. *Curr Rev Musculoskelet Med* 8:188–192
140. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H (1999) Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers After Experimental Muscle Injury. *Am J Sports Med* 27:54–59
141. Rao F, Wang Y, Zhang D, Lu C, Cao Z, Sui J, Wu M, Zhang Y, Pi W, Wang B, Kou Y, Wang X, Zhang P, Jiang B (2020) Aligned chitosan nanofiber hydrogel grafted with peptides mimicking bioactive brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor repair long-distance sciatic nerve defects in rats. *Theranostics* 10:1590–1603
142. Riggin CN, Schultz SM, Sehgal CM, Soslowsky LJ (2019) Ultrasound Evaluation of Anti-VEGF Induced Changes in Vascular Response Following Tendon Injury. *Ultrasound Med Biol* 45:1841–1849
143. Riggin CN, Rodriguez AB, Weiss SN, Raja HA, Chen M, Schultz SM, Sehgal CM,

- Soslowsky LJ (2021) Modulation of vascular response after injury in the rat Achilles tendon alters healing capacity. *J Orthop Res* 39:2000–2016
144. Roderick M, Waddington I, Parker G (2000) PLAYING HURT: Managing Injuries in English Professional Football. *Int Rev Sociol Sport* 35:165–180
145. RUSHTON JL, DAVIES I, HORAN MA, MAHON M, WILLIAMS R (1997) Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. *J Anat* 190:417–422
146. Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. *Princ Hum Exp Tech*
147. RYAN A (1969) Quadriceps strain, rupture and charlie horse. *Med Sci Sports* 1:106–111
148. Rydell-Törmänen K, Johnson JR (2019) The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. Springer, New York, NY. URL: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9086-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9086-3_1)
149. Sakuma Y, Miyagi M, Inoue G, Ishikawa T, Kamoda H, Yamauchi K, Orita S, Suzuki M, Oikawa Y, Inage K, Kubota G, Sainoh T, Sato J, Takahashi K, Ohtori S (2016) Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia innervating the injured muscle. *Muscle Nerve* 54:776–782
150. Sandri M, El Meslemani AH, Sandri C, Schjerling P, Vissing K, Andersen JL, Rossini K, Carraro U, Angelini C (2001) Caspase 3 Expression Correlates With Skeletal Muscle Apoptosis in Duchenne and Facioscapulo Human Muscular Dystrophy. A Potential Target for Pharmacological Treatment? *J Neuropathol Exp Neurol* 60:302–312
151. Sari DM, Rønne Pedersen J, Bloch Thorlund J, Ramer Mikkelsen U, Møller M (2021) Pain medication use in youth athletes: A cross-sectional study of 466 youth handball players. *Transl SPORTS Med* 4:914–920
152. Scheerer N, Dehne N, Stockmann C, Swoboda S, Baba HA, Neugebauer A, Johnson RS, Fandrey J (2013) Myeloid hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is essential for skeletal muscle regeneration in mice. *J Immunol Baltim Md* 1950 191:407–414
153. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
154. Schneider C (2011) Traumeel – an emerging option to nonsteroidal anti-inflammatory

drugs in the management of acute musculoskeletal injuries. *Int J Gen Med* 4:225–234

155. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322

156. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, the Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program, Abouhamze A, Balis UGJ, Camp DG, De AK, Harbrecht BG, Hayden DL, Kaushal A, O'Keefe GE, Kotz KT, Qian W, Schoenfeld DA, Shapiro MB, Silver GM, Smith RD, Storey JD, Tibshirani R, Toner M, Wilhelmy J, Wispelwey B, Wong WH (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci* 110:3507–3512

157. Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J (2005) NS-398, a Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitor, Delays Skeletal Muscle Healing by Decreasing Regeneration and Promoting Fibrosis. *Am J Pathol* 167:1105–1117

158. Shu B, Yang Z, Li X, Zhang L (2012) Effect of Different Intensity Pulsed Ultrasound on the Restoration of Rat Skeletal Muscle Contusion. *Cell Biochem Biophys* 62:329–336

159. Silveira PCL, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, Pinho RA (2010) Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle. *Ultrasound Med Biol* 36:44–50

160. Simonsen EB (2014) Contributions to the understanding of gait control. *Dan Med J* 61:B4823

161. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH (2008) The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury. *Sports Med* 38:947–969

162. Smith LM, Varagic J, Yamaleyeva LM (2016) Photoacoustic Imaging for the Detection of Hypoxia in the Rat Femoral Artery and Skeletal Muscle Microcirculation. *Shock Augusta Ga* 46:527–530

163. Snedeker J, And Others (1974) Cryotherapy and the Athletic Injury. *Athl J*

164. Søndergård S, Dela F, Helge J, Larsen S (2016) Actovegin, a non-prohibited drug increases oxidative capacity in human skeletal muscle. *Eur J Sport Sci* 16:1–7

165. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR (1996) Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*

5:383–392

166. Souza J de, Gottfried C (2013) Muscle injury: Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol* 23:1253–1260
167. Stauber WT (2004) Factors involved in strain-induced injury in skeletal muscles and outcomes of prolonged exposures. *J Electromyogr Kinesiol* 14:61–70
168. Stoller DW (2007) *Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics and Sports Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins
169. StÖlting MNL, Arnold AS, Haralampieva D, Handschin C, Sulser T, Eberli D (2016) Magnetic stimulation supports muscle and nerve regeneration after trauma in mice. *Muscle Nerve* 53:598–607
170. Tajbakhsh S (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med* 266:372–389
171. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H (1998) Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Medication on Satellite Cell Proliferation During Muscle Regeneration. *Am J Sports Med* 26:172–176
172. Toumi H, F'guyer S, Best TM (2006) The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat* 208:459–470
173. Tscholl P, Feddermann N, Junge A, Dvorak J (2009) The Use and Abuse of Painkillers in International Soccer: Data from 6 FIFA Tournaments for Female and Youth Players. *Am J Sports Med* 37:260–265
174. Tu H, Li Y-L (2023) Inflammation balance in skeletal muscle damage and repair. *Front Immunol* 14:1133355
175. Ueblacker P, Haensel L, Mueller-Wohlfahrt H-W (2016) Treatment of muscle injuries in football. *J Sports Sci* 34:2329–2337
176. Ueblacker P, Haensel L, Mueller-Wohlfahrt HW (2017) *Encyclopedia of football medicine: Muscle injuries-examination and treatment*.(Vol. 2). Stuttgart: Thieme.[In print]
177. Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H (2002) Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord* 12:584–587
178. Via AG, Oliva F, Spoliti M, Maffulli N (2015) Acute compartment syndrome. *Muscles Ligaments Tendons J* 5:18–22
179. Wang R, Martín de Azcárate L, Sandamas P, Arndt A, Gutierrez-Farewik EM (2021) The Effect of Step Width on Muscle Contributions to Body Mass Center Acceleration During the First Stance of Sprinting. *Front Bioeng Biotechnol* 9:636960

180. Warden SJ (2007) Animal models for the study of tendinopathy. *Br J Sports Med* 41:232–240
181. Whittingham TA (1997) New and future developments in ultrasonic imaging. *Br J Radiol* 70 Spec No:S119-132
182. Wiesmann F, Szimtenings M, Frydrychowicz A, Illinger R, Hunecke A, Rommel E, Neubauer S, Haase A (2003) High-resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate in vivo atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. *Magn Reson Med* 50:69–74
183. Willis JC (1919) A dictionary of the flowering plants and ferns. 4th ed., rev.rewritten. edition. The University Press, Cambridge
184. Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM (2004) Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med* 25:582–587
185. Wu G, Wang L, Yu L, Wang H, Xuan JW (2005) The Use of Three-Dimensional Ultrasound Micro-Imaging to Monitor Prostate Tumor Development in a Transgenic Prostate Cancer Mouse Model. *Tohoku J Exp Med* 207:181–189
186. Xu S, Gade TPF, Matei C, Zakian K, Alfieri AA, Hu X, Holland EC, Soghomonian S, Tjuvajev J, Ballon D, Koutcher JA (2003) In vivo multiple-mouse imaging at 1.5 T. *Magn Reson Med* 49:551–557
187. Yan D, Zhang J, Liang W, Sun J, Liu BY, Tian W, Cheng XG (2013) Magnetic resonance imaging and histopathological analysis of experimental muscle injuries in a rabbit. *Biomed Environ Sci BES* 26:841–848
188. Yao J, Wang LV (2011) Photoacoustic tomography: fundamentals, advances and prospects. *Contrast Media Mol Imaging* 6:332–345
189. Ye Q, Danzer CF, Fuchs A, Krek W, Mueggler T, Baltés C, Rudin M (2011) Longitudinal evaluation of intramyocellular lipids (IMCLs) in tibialis anterior muscle of ob/ob and ob/+ control mice using a cryogenic surface coil at 9.4 T. *NMR Biomed* 24:1295–1301
190. Zainuddin Z, Sacco P, Newton M, Nosaka K (2006) Light concentric exercise has a temporarily analgesic effect on delayed-onset muscle soreness, but no effect on recovery from eccentric exercise. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 31:126–134
191. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166:347–357
192. Zeng H, Zheng J-H, Zhang J-E, Liu Y-H, Tan S-H, Wang G-Y, Liang C-H (2006)

Grading of rabbit skeletal muscle trauma by diffusion tensor imaging and tractography on magnetic resonance imaging. *Chin Med Sci J Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 21:276–280

193. Zhang J, Richards LJ, Yarowsky P, Huang H, van Zijl PCM, Mori S (2003) Three-dimensional anatomical characterization of the developing mouse brain by diffusion tensor microimaging. *NeuroImage* 20:1639–1648

194. BioSpec 70/20 and 94/20. URL: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/preclinical-imaging/mri/biospec/biospec-70-20-and-94-20.html>

## 6 Danksagung/Publikationen

### 6.1 Publikationen

**Vortrag AB 70-98 „Funktionelle, bildmorphologische und histologische Aspekte muriner Muskeltraumamodelle“**

Fritz T., Haacke L., Körbel C., Stutz J., Müller A., Menger M., Pohlemann T., Orth M.

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 25.-28.10.2022 in Berlin

### 6.2 Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der eigenverantwortlichen Promotion.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Menger, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Laschke und allen Mitarbeitenden des Institutes für klinisch-experimenteller Chirurgie danke ich für die phantastische Zusammenarbeit und die Bereitstellung der hervorragenden Räumlichkeiten sowie wissenschaftlichen Strukturen, die solche Projekte möglich machen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Tobias Fritz für seine unermüdliche Betreuung der Arbeit. Seine breit aufgestellte wissenschaftliche Expertise und lösungsorientierte Denkweise waren für mich in jeder Situation wegweisend.

Dr. rer. med. Andreas Müller danke ich für die Einführung, Durchführung und Geduld im Bereich des Kleintier-MRTs.

Frau Dr. med. vet. Christina Körbel möchte ich ausdrücklich für ihre wertvollen Tipps und Anregungen danken. Das Thema Photoakustik ist dank ihr nun nicht mehr aus meinem Leben wegzudenken.

Ich danke meiner Mutter Claudia und meinem Vater Ulrich für ihre Liebe und Unterstützung bei all meinen Vorhaben und dafür, dass sie mir dies alles ermöglicht haben.

Meinen unendlichen Dank möchte ich meiner Freundin Julia aussprechen. Durch ihren ermutigenden Support motivierte sie mich unzählige Male in der Fertigstellung dieser Arbeit.

## **7 Lebenslauf**

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