# Effekte eines homöopathischen Komplexpräparates auf die belastungsinduzierte Immunantwort: klinische und methodische Aspekte

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Philosophie
des Fachbereichs Psychologie und Sportwissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christian Pilat

aus Gießen

2012

Dekan: Prof. Dr. Markus Knauff

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank C. Mooren
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Eder

Tag der Disputation: 14.12.12

# Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis ..... I**

**Abbildungsverzeichnis ..... III**

**Tabellenverzeichnis ..... XI**

**1 Einführung ..... 1**

1.1 Problemstellung ..... 1

**2 Theoretischer Hintergrund ..... 3**

2.1 Das menschliche Immunsystem ..... 3

2.1.1 Die Zellen des Immunsystems ..... 3

2.1.1.1 Lymphozytenaktivierung und Apoptose ..... 6

2.1.2 Zytokine ..... 7

2.1.2.1 Interferone ..... 8

2.1.2.2 Interleukine ..... 9

2.1.2.3 Tumor-Nekrose-Faktoren ..... 9

2.1.2.4 Kolonie-stimulierende Faktoren ..... 10

2.1.2.5 Chemokine ..... 10

2.1.3 Entzündung ..... 11

2.2 Belastungsinduzierte Immunantwort und -funktion ..... 12

2.2.1 Sport und Infekte der oberen Atemwege ..... 12

2.2.2 Belastungsinduzierte systemische Immunreaktion ..... 13

2.2.2.1 Belastungsinduzierte Zytokinreaktion ..... 14

2.2.2.2 Belastungsinduzierte Akute-Phase-Reaktion ..... 16

2.3 Belastungsinduzierter Muskelschaden ..... 17

2.3.1 Ursachen und Pathophysiologie ..... 17

2.3.2 Marker des Muskelschadens ..... 19

2.3.3 Lokale Entzündungsreaktion ..... 19

2.4 Methoden der Zytokindiagnostik ..... 20

2.5 Pharmakologische und nutritive Gegenmaßnahmen der belastungsinduzierten Immunreaktion ..... 21
2.5.1 Traumeel®S ..... 22
2.5.2 Wirksamkeit von Traumeel®S ..... 24
2.5.2.1 RCT im Bereich entzündlicher Erkrankungen ..... 24
2.5.2.2 RCT im Bereich musculoskeletales System ..... 24
2.5.2.3 Prä-klinische Studien ..... 25
2.5.2.4 Zusammenfassung ..... 25
**3 Untersuchungsziele ..... 27**
**4 Hypothesen ..... 28**
**5 Material und Methoden ..... 29**
5.1 Studiendesign ..... 29
5.2 Zielgrößen ..... 31
5.2.1 Studienabschnitt A ..... 31
5.2.2 Studienabschnitt B ..... 31
5.2.2.1 Hauptzielgrößen ..... 31
5.2.2.2 Nebenzielgrößen ..... 31
5.3 Probandenselektion ..... 32
5.3.1 Rekrutierung ..... 33
5.4 Sportmedizinische Untersuchung ..... 33
5.5 Screening ..... 33
5.6 Prüfmedikation ..... 34
5.6.1 Herstellung und Umverpackung ..... 34
5.6.2 Dosierung ..... 34
5.6.3 Überwachung der Compliance ..... 34
5.7 Maskierung der Behandlungsgruppen ..... 35
5.8 Regulatorisches ..... 35
5.9 Studienmaßnahmen ..... 36
5.9.1 Belastungsintervention ..... 36

5.9.2 Randomisierung ..... 37
5.9.3 Blutabnahmen ..... 37
5.9.4 Schmerzfragebogen – SF-MPQ ..... 37
5.9.5 Maximalkraftmessung ..... 38
5.9.5.1 Knieextension ..... 38
5.9.5.2 Knieflexion ..... 39
5.10 Laborchemische Untersuchungen ..... 39
5.10.1 Messung der Lymphozytenaktivierung und -apoptose ..... 41
5.10.1.1 Lymphozytenisolierung ..... 41
5.10.1.2 Antikörperbeladung ..... 41
5.10.1.3 Durchflusszytometrie ..... 41
5.10.1.4 Puffer und Antikörper ..... 42
5.10.2 Großes Blutbild ..... 42
5.10.3 hsCRP ..... 43
5.10.4 Muskelschadenmarker ..... 43
5.10.5 Zytokinbestimmung ..... 43
5.10.5.1 Stimulierte Vollblutkulturen ..... 43
5.10.5.2 Multiplex ELISA ..... 44
5.10.5.3 Hochsensitives ELISA ..... 46
5.10.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien ..... 47
5.11 Statistik ..... 48
5.11.1 Studienabschnitt A ..... 48
5.11.2 Studienabschnitt B ..... 49
**6 Ergebnisse ..... 52**
6.1 Studienverlauf ..... 52
6.2 Stichprobe ..... 53
6.3 Ergebnisse Studienabschnitt A ..... 54
6.3.1 Detektionsrate und Korrelationsanalysen ..... 54
6.3.2 Verlauf proinflammatorischer Zytokine ..... 56

6.3.3 Verlauf inflammationsregulierender und antiinflamatorischer Zytokine ..... 59
6.3.4 Verlauf von Chemokinen ..... 62
6.4 Ergebnisse Studienabschnitt B ..... 66
6.4.1 Vorerkrankungen und/oder Begleittherapien ..... 66
6.4.2 Compliance ..... 67
6.4.2.1 Nüchternheit und Standardfrühstück ..... 67
6.4.2.2 Belastungsintervention ..... 67
6.4.2.3 Tabletteneinnahme ..... 69
6.4.2.4 Blutabnahmen ..... 70
6.4.3 Strukturgleichheit der Zielgrößen ..... 70
6.4.4 Hauptzielgrößen ..... 72
6.4.4.1 IL-6 ..... 72
6.4.4.2 hsCRP ..... 74
6.4.5 Nebenzielgrößen ..... 76
6.4.5.1 Muskelschaden ..... 76
6.4.5.2 Leukozyten ..... 81
6.4.5.3 Apoptose und Aktivierung von Lymphozyten ..... 84
6.4.5.4 Proinflammatorische Zytokine ..... 90
6.4.5.5 Inflammationsregulierende und antiinflammatorische Zytokine ..... 96
6.4.5.6 Chemokine ..... 100
6.4.5.7 Kolonie-stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren ..... 104
6.4.5.8 $T_H1$-Zytokine ..... 105
6.4.5.9 $T_H2$-Zytokine ..... 110
6.4.5.10 $T_H17$-Zytokine ..... 114
6.4.5.11 Weitere Interleukine ..... 115
**7 Diskussion ..... 118**
7.1 Ergebnisdiskussion ..... 118
7.1.1 Studienabschnitt A ..... 118
7.1.1.1 Proinflammatorische Zytokine ..... 118

7.1.1.2 Inflammationsregulierende und antiinflammatorische Zytokine ..... 120
7.1.1.3 Chemokine ..... 123
7.1.1.4 Zusammenfassung ..... 124
7.1.2 Studienabschnitt B ..... 125
7.1.2.1 Hauptzielgrößen ..... 125
7.1.2.2 Nebenzielgrößen ..... 127
7.1.2.3 Zusammenfassung ..... 132
7.2 Methodendiskussion ..... 133
7.2.1 Auswahl der Stichprobe und Kontrolle von möglichen Störvariablen ..... 133
7.2.2 Studiendesign ..... 135
7.2.3 Auswahl der Belastung ..... 135
7.2.4 Dosierung des Prüfpräparats ..... 136
7.2.5 Messzeitpunkte ..... 136
7.2.6 Kulturmethode ..... 137
7.2.7 Probandencompliance ..... 138
7.2.8 Plasma-Volumen-Korrektur ..... 139
**8 Fazit ..... 140**
**9 Ausblick und Empfehlungen für zukünftige Studien ..... 140**
**10 Literaturverzeichnis ..... 143**
**11 Eidesstattliche Erklärung ..... 163**
**12 Danksagung ..... 164**
**13 Anhang ..... 165**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| AMG | Arzneimittelgesetz |
| AZ | Aktenzeichen |
| BfArM | Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte |
| BMI | body mass index |
| BSS | balanced salt solution |
| ℃ | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µg | Mikrogramm |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| $Ca^{2+}$ | Calciumion |
| $CaCl_2$ | Calciumchlorid |
| CD | cluster of differentiation |
| CK | Kreatinkinase |
| CLIA | Clinical Laboratory Improvement Amendments |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CSF | colony stimulating factor |
| DFÜ | Datenfernübertragung |
| DOMS | Delayed onset muscle soreness |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EudraCT | European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| EU | Europäische Union |
| et al. | und andere |
| Fa. | Firma |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanath |
| FL | Fluoreszenzkanal |
| FSC | Forward-Scatter |
| *g* | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| GMP | Good Manufacturing Practice |
| GCP | Good Clinical Practice |
| h | Stunde |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat |
| HF | Herzfrequenz |
| Hrsg. | Herausgeber |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| K | Kalium |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| $KH_2PO_4$ | Kaliumdihydrogenphosphat |

| | |
|---|---|
| l | Liter |
| LBP | Lipopolysaccharid-bindendes Protein |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| Li | Lithium |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| *M*. | musculus |
| Max | Maximum |
| min | Minuten |
| Min | Minimum |
| MPQ | McGill Pain Questionnaire |
| m/s | Meter pro Sekunde |
| ml/kg/min | Milliliter pro Kilogramm pro Minute |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MW | Mittelwert |
| $Na_2HPO_4$ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NF-kB | Nuclear Factor kappaB |
| ng | Nanogramm |
| Nm | Newtonmeter |
| Nr. | Nummer |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| PC | Personal Computer |
| PE | Phycoerythrin |
| pg | Pikogramm |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität |
| PS | Phosphatidylserin |
| Q | Quartil |
| r | Korrelationskoeffizient |
| RCT | randomized controlled trial |
| S. | Seite |
| s. | siehe |
| SEB | Staphylococcus Enterotoxin B |
| SF-MPQ | Short form McGill Pain Questionnaire |
| SIRS | systemic inflammatory response syndrome |
| SSC | Sideward-Scatter |
| sVBK | stimulierte Vollblutkultur |
| Tab. | Tabelle |
| $T_H$ | T-Helferzelle |
| TRIS | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| URS | upper respiratory symptoms |
| URTI | Upper respiratory tract infection |
| usw. | und so weiter |
| UV | Ultraviolett |
| VAS | visuelle Analogskala |
| vgl. | vergleiche |
| $VO_2max$ | Maximale Sauerstoffaufnahme |
| vs | versus |
| WHO | World Health Organization |
| Z | Zellen |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZP | Zeitpunkt |

# Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1**: Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus: Muphy, Travers und Walport, Janeway Immunologie, S.8, (2010). ..... 5

**Abb. 2**: Biologisches Wirkspektrum der Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6. Aus: Muphy, Travers und Walport, Janeway Immunologie, S.119, (2010). ..... 11

**Abb. 3**: Vergleich der Zytokinkaskade im Rahmen einer Sepsis (A) und infolge einer akuten Belastung (B), aus: (Petersen und Pedersen, 2005). ..... 14

**Abb. 4**: Muskelschäden nach exzentrischer Belastung (elektronenmikroskopische Aufnahme). In der linken Faser sind die Sarkomere intakt, rechts sind die Z-Scheiben (dicke schwarze Striche) teilweise zerstört. Aus: (Friden et al., 1983). ..... 18

**Abb. 5**: Der Versuchsleiter gibt den Probanden die letzten Anweisungen vor der 60-minütigen Belastungsintervention. a: Monitor zur Drehzahlanzeige, b: Stellschraube zur Einstellung des Bremswiderstandes, c: mechanische Bremse durch Druck des Bremsblockes auf die Schwungscheibe (gestellte Aufnahme der Firma HEEL vom 20.05.2010) ..... 36

**Abb. 6**: Versuchsaufbau bei einer Messung der Knieextensoren. (gestellte Aufnahme der Firma HEEL vom 20.05.2010) ..... 39

**Abb.7 a-d**: Chronologische Abfolge der schrittweisen Gewinnung des Zellkulturüberstandes (modifiziert nach: Gebrauchsanweisung für Durchführung der Kultur „TruCulture“, EDI GmbH) ..... 44

**Abb. 8**: Schematische Darstellung eines Multiplex-Verfahrens unter Verwendung von Mikrosphären (a, links: capture-Antikörper ist auf die Oberfläche der Mikrosphäre konjugiert. Mitte: der capture-Antikörper reagiert spezifisch mit dem Antigen. Rechts: der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Detektionsantikörper bindet mengenproportional zu dem gebundenen Antigen) und der Analyse der Mikrosphären nach dem durchflusszytometrischen Prinzip (b). Entnommen aus: „Whitepaper“ der Firma Myriad RBM ..... 45

**Abb. 9**: Verschiedene fiktive Kinetiken von Cortisol und die jeweils daraus resultierende $AUC_I$. Aus: (Fekedulegn et al., 2007), S. 655)..... 50

**Abb. 10**: Flussdiagramm der Probandenrekrutierung (Aufnahme, Zuordnung, Nachbeobachtung und Datenanalyse) ..... 52

**Abb. 11**: Zusammenhang zwischen CCL2 (Serum) und CCL2 (sVBK) zum ZP 1h..... 56

**Abb. 12**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von IL-1β sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. # hier wurde ein hochsensitives ELISA angewendet ..... 57

**Abb. 13**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von TNF-α sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. ..... 58

**Abb. 14**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) proinflammatorischer Zytokine (a: IL-1β und b: TNF-α). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben. ..... 59

**Abb. 15**: Absoluter (a: MW ± STABW) und relativer (b: Med ± IQ) Verlauf der Konzentration von IL-6 sowohl in sVBK als auch Seren. Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. #hier wurde ein hochsensitives ELISA angewendet ..... 60

**Abb. 16**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von IL-1ra sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. ..... 61

**Abb. 17**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) anti- und inflammationsregulierender Zytokine (a: IL-6 und b: IL-1ra). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben. ..... 62

**Abb. 18**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von CCL2 sowohl in sVBK als auch Seren (Med ± IQ). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben. ..... 63

**Abb. 19**: Absoluter (a: MW ± STABW ) und relativer (b: Med ± IQ) Verlauf der Konzentration von CXCL8 sowohl in Kulturen als auch Seren. Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) sind angegeben. ..... 64

**Abb. 20**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) von Chemokinen (a: CCL2 und b: CXCL8). ..... 65

**Abb. 21**: Verlauf der Konzentration von IL-6 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ..... 73

**Abb. 22**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-6 (sVBK) ..... 74

**Abb. 23**: Verlauf der Konzentration von hsCRP (Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ein Ausreißer der Placebo-Gruppe zum Zeitpunkt 24h von 21,2 mg/l ist nicht dargestellt. ..... 76

**Abb. 24**: Verteilung der $AUC_I$ von hsCRP getrennt nach Behandlungsgruppe (Whisker: 5. und 95. Perzentil, ein Ausreißer der Placebo-Gruppe von 5,6 $x10^5$ ist nicht dargestellt) ..... 76

**Abb. 25**: Verlauf der Muskelschadenmarker CK (a: Whisker: 10. und 90. Perzentil) und LDH (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Die CK-Werte eines Probanden der Placebo-Gruppe (prä: 7 376, post: 9 759, 1h: 9 917, 3h: 9 287, 24h: 8 184 U/l) sind nicht dargestellt. ..... 77

**Abb. 26**: Verlauf der Maxkraft (a: Extension, b:Flexion) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ..... 79

**Abb. 27**: Verlauf des Schmerzempfindens (a: gesamt, b:VAS) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: Min und Max) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ..... 80

**Abb. 28**: Verlauf der Leukozyten (a: Gesamtleukozyten, b: Lymphozyten, c: Monozyten, d: Neutrophile, e: Eosinophile, f: Basophile), getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ..... 83

**Abb. 29**: Annexin V positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 85

**Abb. 30**: CD62 positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 86

**Abb. 31**: CD69 positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Placebo-Gruppe zum ZP post mit 0,12 ($x10^6$/ml) bzw. 9,1 % ist nicht dargestellt..... 87

**Abb. 32**: CD95R positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 88

**Abb. 33**: CD95L positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 89

**Abb. 34**: Verlauf der Konzentration von IL-1β in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten) und im Serum (c: Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein

Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP prä von 1,27 pg/ml (Serum) nicht dargestellt ..... 91

**Abb. 35**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-1β (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe .. 92

**Abb. 36**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-1β pro 1000 Monozyten getrennt nach Behandlungsgruppe ..... 92

**Abb. 37**: Verlauf der Konzentration von TNF-α in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten, Whisker: 5.und 95. Perzentil) und im Serum (c) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP post von 93,85 pg/1000Mon ist nicht dargestellt..... 94

**Abb. 38**: Verlauf der Konzentration von TNF-β (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung ..... 95

**Abb. 39**: Verlauf der Konzentration von IL-1α (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung ..... 96

**Abb. 40**: Verlauf der Konzentration von IL-6 (sVBK) (a: normiert auf die Zahl der Monozyten ) und im Serum (b) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Nicht dargestellt sind folgende Ausreißer: Traumeel zum ZP prä von 712 pg/1000Mon und post 568 pg/1000Mon, Placebo zum ZP prä 599 pg/1000Mon ..... 97

**Abb. 41**: Verlauf der Konzentration von IL-1ra in sVBK (a) und im Serum (b: Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP 3h von 552 pg/ml im Serum nicht dargestellt ..... 98

**Abb. 42**: Verlauf der Konzentration von IL-10 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 99

**Abb. 43**: Verlauf der Konzentration von CCL2 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten, Whisker: 5.und 95. Perzentil) und im Serum (c) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP post von 35,19 pg/1000Mon ist nicht dargestellt..... 101

**Abb. 44**: Verlauf der Konzentration von CCL3 (a), CCL4 (b)und CXCL8 (c) in sVBK getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.. 102

**Abb. 45**: Verlauf der Konzentration von CXCL8 (Serum) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 103

**Abb. 46**: Verlauf der Konzentration von GM-CSF (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 104

**Abb. 47**: Verlauf der Konzentration von SCF (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 105

**Abb. 48**: Verlauf der Konzentration von IFN-γ in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten) (a: Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Zwei Ausreißer zum ZP prä von 6,87 $x10^4$ pg/ml (Placebo) und 7,81 $x10^4$ pg/ml (traumeel) nicht dargestellt..... 106

**Abb. 49**: Verlauf der Konzentration von IL-2 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den

Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung..... 107

**Abb. 50**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-2 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe.. 108

**Abb. 51**: Verlauf der Konzentration von IL-12p40 (a) und IL-12p70 (b) in sVBK getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung ..... 109

**Abb. 52**: Verlauf der Konzentration von IL-3 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 110

**Abb. 53**: Verlauf der Konzentration von IL-4 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung..... 111

**Abb. 54**: Verlauf der Konzentration von IL-5 in sVBK (a: absolut, b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten, beide: Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Vier Ausreißer eines Probanden der Traumeel-Gruppe zu den ZP prä, post, 1h und 24h von 383,00 pg/ml, 439 pg/ml, 471 pg/ml und 425 pg/ml sind nicht dargestellt. Ebenso nicht dargestellt: zwei Ausreißer der auf die Lymphozyten bezogenen Konzentration desselben Probanden von 328,18 pg/1000 Lym (1h) und 306,95 pg/1000 Lym (24h)..... 113

**Abb. 55**: Verlauf der Konzentration von IL-17 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 114

**Abb. 56**: Verlauf der Konzentration von IL-7 in getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung..... 115

**Abb. 57**: Verlauf der Konzentration von IL-15 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 116

**Abb. 58**: Verlauf der Konzentration von IL-18 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 116

**Abb. 59**: Verlauf der Konzentration von IL-23 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. ..... 117

# Tabellenverzeichnis

**Tab. 1**: Zusammensetzung einer Tablette Traumeel®S. D: Verdünnung von 1:10 (z.B. D8 = $1:10^8$) ..... 23

**Tab. 2**: Übersicht des zeitlichen Ablaufs aller Studienmaßnahmen ..... 30

**Tab. 3**: Ein- und Ausschlusskriterien ..... 32

**Tab. 4**: Tabellarische Übersicht der beteiligten Labore, den gemessenen Analyten und der dabei angewendeten Messprinzipien ..... 40

**Tab. 5**: Übersicht aller verwendeter Chemikalien, Puffer und Antikörper ..... 42

**Tab. 6**: Leerwertgrenze des Multiplex-ELISA aller für diese Studie relevanten Zytokine ..... 46

**Tab. 7**: Auflistung aller im Prüfzentrum verwendeter Laborgeräte und -verbrauchsmaterialien und deren Hersteller ..... 47

**Tab. 8**: Interpretation des Korrelationskoeffizienten r (Brosius, 1998) ..... 48

**Tab. 9**: Deskriptive Auswertung und Test auf Strukturgleichheit zum ZP prä der demographischen Charakteristika der Stichprobe getrennt nach Behandlungsgruppe Placebo (P) und Traumeel (T). Dargestellt sind: Minimum (Min), unteres Quartil (1.Q), Median (Med), oberes Quartil (3.Q), Maximum (Max), Mittelwert (MW) , Standardabweichung (STABW), p-wert des Wilcoxon-Tests auf Strukturgleichheit (p Wilcoxon) ..... 53

**Tab. 10**: Detektionsrate der sechs gemessenen Zytokine in sVBK und Seren (S) in Prozent aller gemessenen Proben. #hier wurde ein hochsensitives ELISA anstatt des Multiplex ELISA angewendet ..... 54

**Tab. 11**: Korrelationskoeffizient (r) und dazugehörige p-Werte der Zytokinkonzentrationen in sVBK und Seren zu allen 5 Zeitpunkten ..... 55

**Tab. 12**: Häufigkeit vorliegender Vorerkrankungen und/oder Begleittherapien in beiden Behandlungsgruppen und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit ..... 66

**Tab. 13**: Erkrankungen und Therapie- bzw. Behandlungsmaßnahmen (chronologisch) ..... 66

**Tab. 14**: Anzahl der Probanden [n], die die vorgegebene 60-minütige Fahrradbelastung beendeten und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit ..... 67

**Tab. 15**: Deskriptive Auswertung der Fahrzeit [min] der vorzeitigen Abbrecher getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit..... 68

**Tab. 16**: Deskriptive Auswertung der $HF_{avg}$ [S/min] getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit..... 68

**Tab. 17**: Deskriptive Auswertung der prozentualen Abweichung der $HF_{avg}$ [%] von der vorgegebenen HF getrennt nach Behandlungsgruppe. n.b.: nicht berechnet 68

**Tab. 18**: Deskriptive Auswertung der durchschnittlichen Umdrehungszahl [U/min] getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit ..... 68

**Tab. 19**: Einhaltung der Tablettendosis von 8 Stk. Innerhalb der ersten 2 Nachbelastungsstunden, getrennt nach Behandlungsgruppe..... 69

**Tab. 20**: Abweichungen der eingenommenen Tablettenzahl innerhalb der ersten 2 Nachbelastungsstunden getrennt nach Behandlungsgruppe..... 69

**Tab. 21**: Anzahl der von den Probanden eingenommenen Tabletten (insgesamt), getrennt nach Behandlungsgruppe ..... 69

**Tab. 22**: Anzahl der Probanden [n], die zu den jeweiligen Messzeitpunkten erschienen und sich Blut entnehmen ließen, getrennt nach Behandlungsgruppe ..... 70

**Tab. 23**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Hauptzielgrößen zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und

Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet (Serum)..... 70

**Tab. 24**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen im Bereich des Muskelschadens zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä..... 70

**Tab. 25**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen im Bereich der Zytokine zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet. ..... 71

**Tab. 26**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet (Serum)..... 72

**Tab. 27**: deskriptive Auswertung der IL-6 Konzentration (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe Placebo (P) und Traumeel (T) und p-Wert der ANCOVA (Zeitpunkt*Gruppe)..... 73

**Tab. 28**: Häufigkeit der unter der Messgrenze von <0,3 mg/l liegenden Werte von hsCRP in beiden Behandlungsgruppen zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ..... 74

**Tab. 29**: deskriptive Auswertung der hsCRP Konzentration im Serum getrennt nach Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T) sowie p-Wert der ANCOVA (Zeipunkt*Gruppe). Logarithmierte und zurücktransformierte Werte sind als geometrisches Mittel (MWgeo) angegeben ..... 75

**Tab. 30**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die beiden Nebenzielgrößen CK und LDH. k.NV: keine Normalverteilung 78

**Tab. 31**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die beiden Nebenzielgrößen $Maxkraft_{Ext}$ und $Maxkraft_{Flex}$. ..... 79

**Tab. 32**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) und für die beiden Nebenzielgrößen Schmerz (Gesamtscore) und Schmerz (VAS). k.NV keine Normalverteilung ..... 81

**Tab. 33**: p-Werte der ANCOVA (Interaktionseffekt) und des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ für die Nebenzielgrößen Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Basophile und Eosinophile. k.NV: keine Normalverteilung ..... 84

**Tab. 34**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen Annexin V, CD62, CD69, CD95R, und CD95L (jeweils prozentual und absolut). k.NV: keine Normalverteilung ..... 90

**Tab. 35**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-1α, IL-1β, TNF- α und TNF- β (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: keine Normalverteilung ..... 96

**Tab. 36**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-1ra, IL-6 und IL-10 (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: keine Normalverteilung ..... 99

**Tab. 37**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL8 (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: Keine Normalverteilung ..... 103

**Tab. 38**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen BDNF, GM-CSF, SCF und VEGF. k.NV: keine Normalverteilung ..... 105

**Tab. 39**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IFN-γ, IL-2, IL-12p40 und IL-12p70. k.NV: Keine Normalverteilung ..... 109

**Tab. 40**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-3, IL-4, IL-5, und IL-25 (bei Bestimmung sowohl

in sVBK als auch in Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: Keine Normalverteilung ..... 114

**Tab. 41**: p-Wert des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für den Nebenzielgrößen IL-17. k.NV: Keine Normalverteilung ..... 115

**Tab. 42**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-7, IL-15, IL-18, und IL-23. k.NV: Keine Normalverteilung ..... 117

# 1 Einführung

## 1.1 Problemstellung

Körperliche und sportliche Aktivität interagiert mit der Regulation und der Funktion des Immunsystems. Obwohl schon Anfang des 20. Jahrhunderts die Beobachtung gemacht wurde, dass es zu belastungsinduzierten Veränderungen des Immunsystems kommt, hat sich erst in den letzten ca. 25 Jahren ein eigener sportimmunologischer Forschungsbereich etabliert, welcher systematisch die Interaktion zwischen Sport, Bewegung, Training und dem Immunsystem untersucht. Während regelmäßig durchgeführtes Training mit moderater Intensität positive Auswirkungen auf zahlreiche Funktionen des Immunsystems hat (Pedersen und Hoffman-Goetz, 2000) und mit einer geringeren Infektinzidenz assoziiert ist (Gleeson et al., 2011a), werden nach akuter, erschöpfender Belastung entzündungsähnliche Effekte beobachtet. Diese zeigen wiederum eine Abhängigkeit von der Dauer und Intensität der Belastung sowie des Trainingszustands (Walsh et al., 2011). Weiterhin kommt es in der Nachbelastungsphase häufig zu einer transienten Immunsuppression. Diese Zeitspanne ist unter dem Synonym „Theorie des offenen Fensters“ bekannt geworden und geht ursprünglich auf die Beobachtung einer Nachbelastungs-Lymphozytopenie zurück (Nieman, 1994). Ob diese Phase mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht, insbesondere im Bereich der oberen Atemwege, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Walsh et al., 2011). Es wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, die Auswirkungen einer intensiven Belastung auf das Immunsystem sowie die Integrität des Muskels mit pharmakologischen Interventionen begünstigend zu beeinflussen. Befragungen unter Athleten zeigen, dass Insbesondere die Einnahme von nicht-steriodalen Antiphlogistika eine enorme Verbreitung besitzt (Gorski et al., 2011), obwohl ihre nachteiligen Effekte, speziell auf das gastrointestinale System, bekannt sind (Nieman et al., 2006). Auch die Supplementation pflanzlicher Extrakte findet unter Sportlern eine verbreitete Anwendung (Herbold et al., 2004; Froiland et al., 2004). Diese weisen in den meisten Fällen keine oder lediglich milde Nebenwirkungen auf, ihre Effekte auf spezifische Parameter des Immunsystems konnten allerdings bislang nicht belegt werden (Senchina et al., 2009). Die Modulation immunologischer Parameter durch Anwendung homöopathischer Verdünnungen ist gar noch weniger systematisch untersucht, und vorhandene Studien weisen zumeist widersprüchliche Ergebnisse auf (Bellavite et al., 2005; Bellavite et al., 2006; Bellavite et al., 2007; Bellavite et al., 2011). Traumeel®S ist ein homöopathisches Komplexpräparat aus

insgesamt 14 pflanzlichen und mineralischen Bestandteilen, welches seit mehr als 50 Jahren in Deutschland erhältlich ist. Eine Reihe von klinischen Studien konnte bereits die immunregulierenden und antiinflammatorischen Eigenschaften von Traumeel®S unter pathologischen und traumatischen Bedingungen zeigen (Schneider, 2011). Ergebnisse aus der Grundlagenforschung deuten darauf hin, dass einzelne Bestandteile von Traumeel®S in der Lage sind, die Produktion von entzündungsfördernden Botenmolekülen, sogenannten proinflammatorischen Zytokinen, *in vitro* signifikant zu hemmen (Porozov et al., 2004) und weiterhin über die Aktivierung der Synthese von antiinflammatorischen Zytokinen zur Wundheilung beizutragen (Heine, 1998). Ein möglicher Einfluss von Traumeel®S auf die belastungsinduzierte Immunantwort und den belastungsinduzierten Muskelschaden ist jedoch bislang nicht untersucht worden. Auch in der Sportimmunologie hat die Bestimmung von Zytokinprofilen zuletzt immer mehr an Bedeutung gewonnen, da sie eine zentrale Rolle in der Regulation der belastungsinduzierten Immunantwort einnehmen (Suzuki et al., 2002). Zur Zytokinbestimmung werden zuletzt vermehrt so genannte Mulitplex-Verfahren eingesetzt. Sie erlauben die simultane Messung einer Vielzahl von Analyten (bis zu 100) aus einer vergleichsweise geringen Probenmenge (Kellar et al., 2001). Dennoch, Zytokine liegen aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und geringen systemischen Konzentration sowohl unter Verwendung herkömmlicher Methoden als auch neuerer Multiplex-Verfahren häufig unter dem Detektionslimit (Suzuki et al., 2002; Timmons et al., 2009). Zudem unterliegt die Interpretation einzelner systemisch gemessener Zytokine, aufgrund ihrer überlappenden und vielfältigen Wirkspektren, erheblichen Einschränkungen (Martin und Resch, 2009). Daher kommen jüngst immer häufiger Stimulationsmodelle zur Anwendung, in denen das komplexe Zytokin-Netzwerk unter dynamischen und physiologischen Bedingungen im Vollblut untersucht wird (Schmolz et al., 2004). Die belastungsinduzierte systemische Zytokinreaktion ist bereits gut charakterisiert und in Übersichtsarbeiten beschrieben worden (Moldoveanu et al., 2001; Suzuki et al., 2002). Vor bereits 15 Jahren wurde angemerkt, dass jedoch noch kein Vergleich zwischen der belastungsinduzierten systemischen Zytokinreaktion mit jener in stimulierten Vollblutkulturen unternommen wurde (Weinstock et al., 1997; Drenth et al., 1998). Seither liegen keine entsprechenden Studien vor. Es ist daher unklar, inwiefern die belastungsinduzierte systemische Zytokinantwort durch die Verwendung von stimulierten Vollblutkulturen abgebildet werden kann, was eine Beurteilung der praktischen Bedeutsamkeit dieser Methode für sportimmunologische Studien erlauben würde.

# 2 Theoretischer Hintergrund

## 2.1 Das menschliche Immunsystem

Jedes Lebewesen ist täglich einer Reihe von Krankheitserregern ausgesetzt. Sobald diese die ersten Barrieren physikalischer und chemischer Art überwunden haben und in den Körper gelangen, kommt das Immunsystem zum Tragen (Nieman et al., 2006). Die Aufgabe des Immunsystems ist es, die Krankheitserreger zu erkennen, zu bekämpfen und schließlich zu eliminieren. Neben körperfremden Keimen wie Bakterien, Pilzen und Viren ist das Immunsystem auch in der Lage, körpereigene pathogene Keime zu bekämpfen. Hierzu zählen z.B. die Bekämpfung von potentiellen Tumorzellen und der Schutz vor Autoimmunkrankheiten (Neumann, 2008). Die Immunabwehr lässt sich in einen entwicklungsgeschichtlich älteren angeborenen (Synonym: unspezifisch) und einen erworbenen (Synonym: spezifisch oder adaptiv) Teil des Immunsystems unterscheiden. Der Kontakt mit einem Krankheitserreger löst zunächst eine schnelle Reaktion des angeborenen Immunsystems aus. Dies wird innerhalb von Tagen von einer Reaktion des erworbenen Immunsystems überlagert, welches weitaus spezifischer den Erreger erkennen und beseitigen kann. Beide Teile des Immunsystems basieren auf Aktivitäten von zellulären und humoralen, also in Körperflüssigkeiten gelösten, Abwehrsystemen. Die zelluläre Komponente des Immunsystems wird durch die weißen Blutzellen oder Leukozyten gebildet. Zu den humoralen Bestandteilen gehören z.B. Proteine des Komplementsystems, Akut-Phase-Proteine, Antikörper und Zytokine (Nieman et al., 2006). Beide Systeme arbeiten eng zusammen und werden nun im Folgenden schwerpunktmäßig hinsichtlich der für diese Arbeit relevanten Parameter etwas näher dargestellt.

### 2.1.1 Die Zellen des Immunsystems

Alle Leukozyten stammen von gemeinsamen Vorläuferzellen ab, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Diese Stammzellen reifen weiterhin zu myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen, den beiden Hauptgruppen der Leukozyten, mit eingeschränktem Potenzial heran (s. Abb. 1). Die myeloide Vorläuferzelle wiederum stellt die Vorstufe der Monozyten, Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Monozyten zirkulieren im Blut und wandern auf entsprechende Signale hin in die Gewebe ein, wo sie sich zu Makrophagen weiter ausdifferenzieren. Monozyten, Makrophagen, Granulozyten sowie dendritische Zellen gehören zur Gruppe der sogenannten Phagozyten (sogenannte „Fresszellen“). Phagozyten nehmen eingedrungene Mikroorganismen auf und töten diese. Monozyten und Makrophagen üben durch diese Eigenschaft eine wichtige

Funktion der ersten Abwehrlinie aus, spielen darüber hinaus aber noch zusätzlich eine wichtige Rolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort. Hierzu gehört z.B. die Sezernierung von Signalproteinen, die für die Entstehung einer Entzündung wichtig sind (s. Kapitel Zytokine) und die Zellen des spezifischen Immunsystems aktivieren. Neben der beschriebenen immunologischen Funktion dient die phagozytotische Eigenschaft von Makrophagen außerdem der Beseitigung von toten Zellen und Zelltrümmern (s. Kapitel Muskelschaden), weshalb sie als allgemeine Fresszellen (englisch: „scavenger cells“) bezeichnet werden. Granulozyten besitzen einen unregelmäßig geformten Zellkern, deshalb nennt man sie auch polymorphkernige Leukozyten. Ihren Namen verdanken sie ihren anfärbbaren Granula im Zytoplasma, wodurch zusätzlich die Unterscheidung in ihre Subtypen ermöglicht wird. Hierbei werden neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten (nachfolgend abgekürzt als Neutrophile, Eosinophile und Basophile bezeichnet) unterschieden. Neutrophile machen mit 50-60% der zirkulierenden Leukozyten den wichtigsten Bestandteil des angeborenen Immunsystems aus. Ihre phagozytotische Funktion üben sie mithilfe von abbauenden Enzymen und weiteren antimikrobiellen Molekülen aus, die in zytoplasmatischen Granula gespeichert sind. Eosinophile und Basophile nehmen eher eine Rolle in der Abwehr von Parasiten ein und sind bedeutend an der Entstehung einer allergischen Entzündungsreaktion beteiligt (Nieman et al., 2006).

Aus der lymphatischen Vorläuferzelle gehen die antigenspezifischen Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) hervor. Letztere reagieren nicht antigenspezifisch und werden deshalb zum angeborenen Immunsystem gezählt. NK-Zellen können anormale Zellen wie z.B. Tumorzellen erkennen und töten. Antigenspezifische Lymphozyten ermöglichen durch ihr hoch variables Repertoire an Antigenrezeptoren eine Immunantwort gegen jeden beliebigen Krankheitserreger. Der Begriff Antigen bezeichnet jede Substanz, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden kann und auf die eine Immunantwort erfolgt. Der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtheit der im Blut zirkulierenden Leukozyten beträgt 20-40% (Liesen, 1997). Bevor Lymphozyten noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten zirkulieren sie kontinuierlich durch das Blut und lymphatische Organe und haben keine funktionelle Aktivität (Martin und Resch, 2009). Man nennt sie deshalb in diesem Zustand naive (ungeprägte) Zellen. Sobald sie aktiviert wurden und ausdifferenziert sind, werden sie als Effektorzellen bezeichnet. Unter den antigenspezifischen Lymphozyten werden B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) unterschieden. Ihre Namensgebung ist auf den Ort ihrer Reifung zurückzuführen. Beide Zelltypen stammen aus dem Knochenmark, allerdings reifen nur die B-Zellen dort heran. Die Herkunft des „B“ ist auf ein lymphatisches Organ bei jungen Küken mit der Bezeichnung *Bursa*

*fabricii*, zurückzuführen. Das „B“ kann zusätzlich für die englische Bezeichnung „bone marrow“ (Knochenmark) stehen. Die Vorläufer der T-Zellen wandern hingegen aus dem Knochenmark in den Thymus, ein großes Organ im oberen Brustbereich. Die beiden genannten Organe werden aufgrund ihrer gerade beschriebenen Funktion als primäre oder zentrale lymphatische Organe bezeichnet. Zusätzlich existieren sekundäre oder periphere lymphatische Organe, zu denen die Lymphknoten, die Milz, und die mucosalen lymphatischen Gewebe des Darms, der Nasen- und Atemwege, des Urogenitaltraktes und anderer Schleimhäute gezählt werden. Reife Lymphozyten gelangen in den Blutkreislauf und zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe. Hier treffen die Lymphozyten auf ihre entsprechendes Antigen wodurch schließlich die adaptive Immunantwort ausgelöst wird (Nieman et al., 2006).

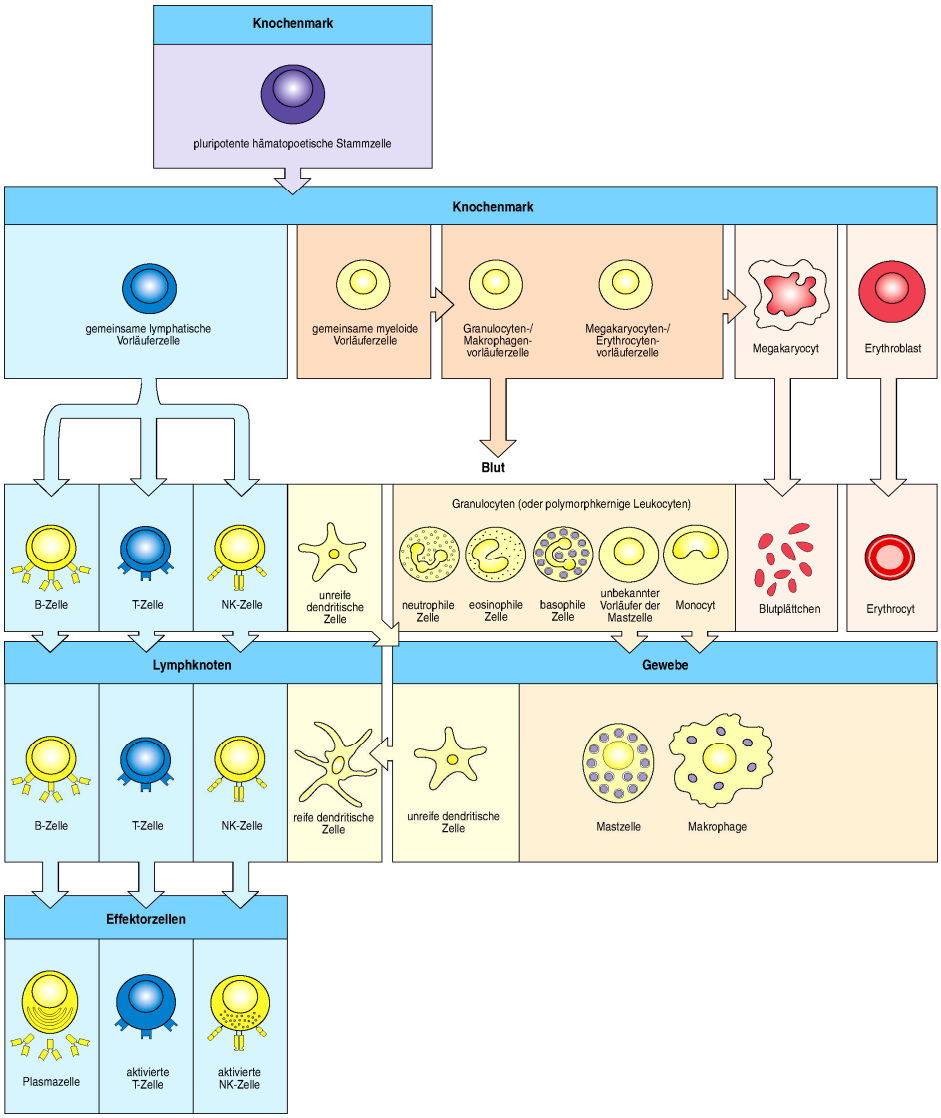



***Abb. 1**: Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus: Muphy, Travers und Walport, Janeway Immunologie, S.8, (2010).*

#### *2.1.1.1 Lymphozytenaktivierung und Apoptose*

Ein Antigenkontakt löst in naiven Lymphozyten eine verstärkte Proliferation und Differenzierung aus, wodurch Effektorlymphozyten entstehen. (Vollmar et al., 2005; Schütt und Bröker, 2011). Je nach Zelltyp, Reifungs- und Aktivierungsstatus werden an ihrer Zelloberfläche spezifische Oberflächenmoleküle exprimiert, die im Laufe der Zeit bestimmten biochemischen oder funktionellen Klassen zugeordnet und mit fortlaufenden Nummerierungen zusammengefasst wurden. Diese Oberflächenmoleküle werden mit dem Begriff „Cluster of Differentiation“ (aus dem Englischen für „Unterscheidungsgruppen“), abgekürzt mit CD, bezeichnet. Einige CDs haben u.a. Rezeptor- und/oder Signalfunktion und werden als Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen Zellsubpopulationen genutzt (Schütt und Bröker, 2011). CD69 ist z.B. eines der am frühesten exprimierten Oberflächenmoleküle während der Aktivierung von Leukozyten (Testi et al., 1989). Es ist involviert in der Vermittlung von co-stimulatorischen Signalen, die zu gesteigerter Zellproliferation, Zytokinsekretion und Zytotoxizität führen (Moretta et al., 1991). CD62L (synonym: L-Selektin) zählt zu den bedeutendsten Adhäsionsmolekülen und wird konstitutiv auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. CD62L ist am Homing der Leukozyten, d.h. an der gezielten Wanderung, zu Entzündungsorten und lymphatischen Organen beteiligt. Der Prozess der Transmigration von Lymphozyten in die entsprechenden Organe ist durch mehrere Schritte charakterisiert und startet mit der Anheftung von Lymphozyten an das Endothel. Dies wird durch die Bindung von CD62L an so genannten Homing-Rezeptoren auf Zellen hochendothelialer Venolen (HEV) gewährleistet und wird gefolgt von einem Rollen entlang des Endothels. Zudem hat CD62L auch Signalfunktion und bewirkt u.a. die vermehrte Chemokin-Rezeptor Expression (Kurokawa et al., 1995; Murphy et al., 2000; Krüger und Mooren, 2007). Nach erfolgter Immunantwort kommt der Elimination überflüssiger und potentiell autoreaktiver Zellen eine wichtige Rolle zu, da diese schädigende Auswirkungen auf den Organismus haben können. In diesem Zusammenhang spielt die Apoptose, oder auch programmierter Zelltod genannt, eine zentrale Rolle. Die Apoptose beschreibt einen kontrollierten Selbstmord der Zelle, der als Teil des Zellstoffwechsels angesehen wird und ebenso für die Entwicklung von Lymphozyten, aber auch für das immunologische Gedächtnis, bedeutsam ist (Travers und Walport, 2009). Es existieren zwei zentrale biochemische Wege, die die Mechanismen der Apoptose initiieren können. Der intrinsische Weg stellt eine Reaktion auf schädliche Reize von außen wie z.B. UV-Strahlung, Nährstoffmangel oder oxidativen Stress dar (Travers und Walport, 2009). Der extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren und deren extrazelluläre Liganden aktiviert. Hierbei spielt die Interaktion zwischen CD95R/CD95L eine entscheidende Rolle. CD95R gehört zu den

Todesrezeptoren der TNFR (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor)-Familie, dessen Bindung durch den zugehörigen Liganden, zu einer Aggregation intrazellulärer Todesdomänen und damit zur Induktion apoptose-induzierender Signalkaskaden sowie Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine führt. Der so genannte Fas Ligand wiederum, auch bekannt als CD95L oder CD178, gehört zur TNF-Superfamilie und wird u.a. auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert. Durch Bindung an seinen Rezeptoren CD95R ist CD95L in der Lage, Apoptose zu induzieren. Im Laufe der Aktivierung werden T-Lymphoyten sensitiver gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose. Ein Kennzeichen der Apoptose ist die veränderte Expression von Phospholipiden auf der Zellmembran. Während bei überlebensfähigen Zellen Phosphatidylserin (PS) auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, wird PS von Zellen, die pro-apoptotische Signale erhalten und deren Zelltod damit vorprogrammiert ist, auf der Membranaußenseite exprimiert (Fadok et al., 1992). Die veränderte PS-Expression gilt unabhängig vom Zelltyp und des Apoptose-Signalwegs als universales Merkmal der frühen Apoptosephase und wird zur Identifikation apoptotischer Zellen herangezogen. Das Phospholipid-Bindungs-Protein Annexin V besitzt unter der Präsenz von Calcium eine hohe Affinität zu PS und dient durch Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen der Erkennung apoptotischer Zellen (van Engeland et al., 1998). Im Gegensatz zur Nekrose, dem pathologischen Untergang von Zellen, wird bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion erzeugt und benachbartes Gewebe bleibt unbeschädigt (Grimm, 2003).

### 2.1.2 Zytokine

Der Sammelbegriff Zytokine (Wortherkunft aus dem Altgriechischen: Zyto = Zelle und Kinese = Bewegung) bezeichnet eine Gruppe von Botenmolekülen, die eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen und wichtig für Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge sind. Es handelt sich um kleine Polypeptide mit einem Molekulargewicht von circa 25 Kilodalton (kDa), die auch in glykolysierter Form vorhanden sein können. Zytokine werden hauptsächlich von Immunzellen, aber auch von nicht-immunologischen Zellen, wie z.B. den Endothelzellen der Blutgefäße (Travers und Walport, 2009) aber auch der Arbeitsmuskulatur (Pedersen, 2011) gebildet und synthetisiert.

Sie wirken in der Regel lokal, d.h. auf die produzierende Zelle selbst (autokrine Wirkung), auf eine Zelle in der Nähe (parakrine Wirkung), auf Zellen in unmittelbarer Nähe (juxakrine Wirkung) oder auf Zellen in weiterer Entfernung, die über die Blutbahn oder die Gewebeflüssigkeit erreicht werden können (Loppnow, 2001; Travers und Walport, 2009). Die Wirkung wird durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der

Oberfläche der Zielzellen vermittelt (Horn, 2009). Ihre Wirkungsdauer ist sehr kurz, da sie eine geringe Halbwertszeit besitzen. Da Ihre Rezeptoren jedoch eine hohe Bindungsaffinität aufweisen, genügen selbst geringe Zytokinkonzentrationen zur Entfaltung ihrer biologischen Wirksamkeit (Loppnow, 2001). Zytokine können verschiedene Effekte bei einer Vielzahl von Zellen hervorrufen, diese Eigenschaft wird auch als Pleiotropie bezeichnet. Einige wirken redundant, das bedeutet, dass sie sich in ihren Wirkungsspektren überlappen bzw. sich gegenseitig ersetzen (Martin und Resch, 2009). In vivo wirken immer mehrere Zytokine in additiver, synergistischer oder antagonistischer Form zusammen. Bis heute sind über 100 Zytokine bekannt und molekular kloniert (Martin und Resch, 2009). Eine einheitliche Nomenklatur der Zytokine existiert bis dato noch nicht. Die Bezeichnung bezieht sich entweder auf den sezernierenden Zelltyp, auf Ihre Funktion bei der Erstbeschreibung oder auf beide Eigenschaften (Greiner und Amer, 2008). Im Zusammenhang entzündlicher Prozesse, so auch in der sportimmunologischen Forschung, werden weiterhin proinflammatorische von antiinflammatorischen Zytokinen unterschieden. Diese Betrachtungsweise ist allerdings nicht immer zulässig, da Zytokine z.B. in Abhängigkeit der Zielzelle sowohl die eine als auch die andere Wirkung entfalten können (O'Shea et al., 2002). Obwohl bestimmte Zytokine zentrale Funktionen der Immunantwort übernehmen ist jedoch aufgrund des komplexen Netzwerkes eine Charakterisierung von Funktionszuständen des Immunsystems auf Grundlage der Untersuchung einzelner Zytokine nicht möglich (McInnes und Schett, 2007). Es werden insgesamt fünf funktionelle Gruppen allgemein akzeptiert. Man unterscheidet Interleukine, Interferone, Tumor Nekrose Faktoren, Koloniestimulierende Faktoren und Chemokine. Vertreter aller genannten Gruppen wurden auch in dieser Studie untersucht.

#### *2.1.2.1 Interferone*

Interferone (IFN) werden bereits in Arbeiten Mitte des 20. Jahrhunderts als Faktoren beschrieben, die von virusinfizierten Zellen produziert werden und Schutz gegenüber Viren vermitteln können (Isaacs und Lindenmann, 1957). Über die Expression unterschiedlicher Inhibitoren des Zellzyklus, welche die Virusreplikation und die zelluläre Proteinbiosynthese beeinträchtigen, hemmen infizierte Zellen mithilfe der Interferone, sowohl auf autokrinem, als auch parakrinem Weg die Virusreplikation (Horn, 2009). Neben der antiviralen Funktion sind ebenso weitere immunregulatorische Funktionen bekannt. Mittlerweile werden Interferone in Typ-I- und Typ-II-Interferone unterteilt. Die Hauptfunktion von Typ-I-Interferonen wird in ihrer antiviralen Aktivität, z.B. durch die Aktivierung von NK-Zellen, angesehen. Typ-II-Interferone, zu denen auch IFN-γ zählt, üben zusätzlich eine aktivierende Funktion auf Makrophagen aus und

können über die Induktion der MHC-Moleküle die Antigenpräsentation beeinflussen. IFN-γ induziert z.B. die MHC-Klasse-II-Exprimierung (Isaacs und Lindenmann, 1957).

#### *2.1.2.2 Interleukine*

Interleukine (IL) spielen eine besondere Rolle in der Kommunikation zwischen den Leukozyten (lat. Inter = zwischen; Leukos = weiss). Sie wurden zunächst als Lymphokine und Monokine bezeichnet, da sie als Produkte dieser Zellen identifiziert wurden (Loppnow, 2001). Es sind zurzeit mehr als 40 verschiedene Interleukine bekannt, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung unterteilt werden (Akdis et al., 2011). Sie erfüllen Aufgaben im Rahmen der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr, regulieren die Kommunikation zwischen Zellen der Immunantwort sowie die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (Travers und Walport, 2009).

Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-2 (IL-2) waren die ersten Zytokine, die als Interleukine bezeichnet wurden (Loppnow, 2001). Mittlerweile sind 11 Angehörige der IL-1-Familie bekannt. Die zwei Hauptmitglieder sind IL-1α und IL-1β, die gleiche biologische Wirkungen entfalten. Sie gehören zu den endogenen Pyrogenen (körpereigene fieberauslösende Substanzen) und besitzen hauptsächlich proinflammatorische Eigenschaften (Akdis et al., 2011). IL-1ra wird als Reaktion auf dieselben Stimuli wie IL-1 synthetisiert und bindet zudem an denselben Rezeptoren ohne jedoch eine Signaltransduktion auszulösen. Daher ist IL-1ra in der Lage, die Wirkung von IL-1 zu hemmen (Dinarello, 2009).

Die Bestimmung der Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) findet häufig in sportimmunologischen Studien statt, da es unter allen Zytokinen am stärksten auf körperliche Belastung reagiert (Pedersen, 2011). Es wird infolge einer Reihe von Stimuli u.a. von T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen sezerniert (Hurst et al., 2001). Zudem wurde bereits vielfach gezeigt, dass der arbeitende Skelettmuskel IL-6 sezerniert (Toft et al., 2011) und dadurch signifikant zur systemischen Erhöhung von IL-6 beiträgt (Hiscock et al., 2004).

#### *2.1.2.3 Tumor-Nekrose-Faktoren*

Die Bezeichnung Tumor Nekrose Faktor stammt von einer frühen Beobachtung, dass nach einer BCG- (Bacillus Calmette-Guérin) und LPS- (Lipopolysaccharid) Behandlung Faktoren ins Serum abgegeben werden, die eine Nekrose von Tumoren verursachen (Carswell et al., 1975). Die Tumor-Nekrose Faktoren (TNF) bilden eine Super-Familie von circa 20 verschiedenen Proteinen, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden. Sie sind u.a. an der Regulation der Immunantwort und der Apoptoseinduktion beteiligt. TNF-α ist der Prototyp dieser Familie und wirkt als Mediator akuter

Entzündungsreaktionen. TNF-α aktiviert Monozyten und Neutrophile, lockt diese zum Entzündungsherd und stimuliert die Chemokinproduktion durch Makrophagen (Martin und Resch, 2009).

#### *2.1.2.4 Kolonie-stimulierende Faktoren*

Die Gruppe der Kolonie-stimulierenden Faktoren umfasst Faktoren, die in der Hämatopoese die Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen regulieren (Loppnow, 2001). Hierzu zählt beispielsweise der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF), welcher neben den beschriebenen Funktionen in der Hämatopoese noch zusätzlich die antimikrobielle Aktivität von Neutrophilen und die Zytokinproduktion von Monozyten stimuliert (Loppnow, 2001; Martin und Resch, 2009).

#### *2.1.2.5 Chemokine*

Chemokine verdanken ihren Namen ihrer Haupteigenschaft, nämlich chemotaktisch zu wirken, was so viel bedeutet, dass sie eine gerichtete Migration ihrer Zielzellen auslösen. Man unterscheidet die Mitglieder der Chemokinfamilie strukturell nach der Anordnung von Cysteinen (C) und der Aminosäurenabfolge. Es existieren zwei große Unterfamilien, die CC-Chemokine und die CXC-Chemokine. Während die CC-Chemokine zwei Cysteine infolge besitzen, werden die Cysteine der CXC-Chemokine durch eine beliebige Aminosäure getrennt. Die systematische Bezeichnung der Chemokine setzt sich aus dem Familiennamen, dem Zusatz „L" (Ligand) und einer Nummer zusammen. Die Nomenklatur der Rezeptoren leitet sich von der Chemokinklasse ab, die an den Rezeptor bindet. Sie wird ergänzt durch ein „R“ (Rezeptor) und ebenso einer Nummer (Murphy et al., 2000; Martin und Resch, 2009; Travers und Walport, 2009). Chemokine werden von unterschiedlichen Zellen wie z.B. Leukozyten selbst oder Endothelzellen freigesetzt. Zu den Stimuli zählen Infektionen oder Schädigungen. Sie entfalten ihre chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, wie z.B. Monozyten, Neutrophile und andere Effektorzellen, die dadurch aus dem Blut zu den Infektionsherden geleitet werden. CXCL8 (auch IL-8 genannt) wird beispielsweise von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Lymphozyten, Endothel- und Epthelzellen nach Stimulation mit IL-1α, IL-1β, IL-17 und TNF-α produziert (Coelho et al., 2005). Zu den Effektorfunktionen von CXCL8 gehören die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Infektion oder des Schadens (Matsushima et al., 1988). Ein Großteil der Chemokine bindet an die extrazelluläre Matrix und die Oberflächen von Endothelzellen, dadurch entsteht ein Konzentrationsgefälle, wobei die Chemokinkonzentration am Infektionsherd am größten ist und mit zunehmender Entfernung abnimmt (Travers und Walport, 2009). Weiterhin werden Chemokine funktionell in homöostatische und proinflammatorische Chemokine unterschieden.

Erstere werden konstitutiv produziert und regulieren die Wanderung von Leukozyten während ihrer Reifung im Knochenmark und in sekundären lymphatischen Organen. Proinflammatorische Chemokine hingegen werden hauptsächlich als Antwort auf entzündliche Reize gebildet und leiten Leukozyten in das betroffene Gewebe (Moser und Loetscher, 2001).

### 2.1.3 Entzündung

Krankheitserreger, die die erste Abwehrlinie (Haut und Schleimhäute) überwinden, lösen eine sofortige angeborene Immunantwort aus. Hierdurch wird ein Vorgang induziert, den man als Entzündung (synonym: Inflammation von lat. *inflammatio*) bezeichnet. Die Entzündungsreaktion ist durch die vier lateinischen Begriffe *calor*, *dolor*, *rubor* und *tumor* (Wärme, Schmerz, Rötung und Schwellung) gekennzeichnet und lässt sich maßgeblich auf die Auswirkungen von Zytokinen und anderen Mediatoren auf die lokalen Blutgefäße bzw. das Endothel zurückführen. Diese werden erweitert und durchlässiger, folglich kommt es zu einem verstärkten Blutfluss und Austritt von Flüssigkeit in das Gewebe. In Abb. 2 sind die biologischen Wirkungen der für den Entzündungsprozess zentralen Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6 dargestellt.

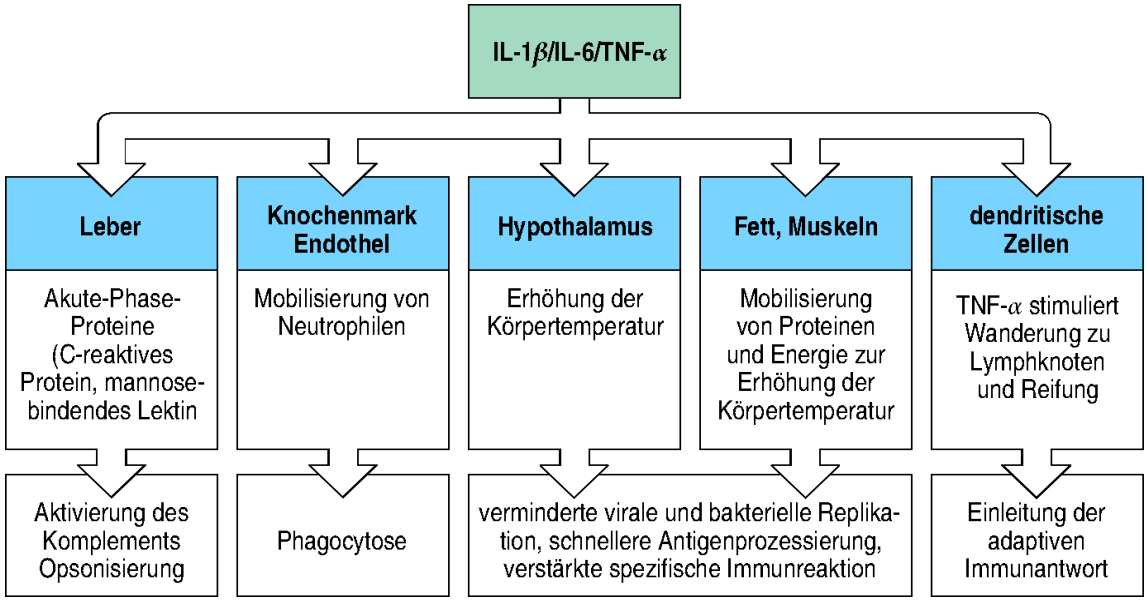



***Abb. 2**: Biologisches Wirkspektrum der Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6. Aus: Muphy, Travers und Walport, Janeway Immunologie, S.119, (2010).*

Zusammengenommen besitzen die beschriebenen lokalen Auswirkungen vorteilhafte Funktionen bei der Bekämpfung von Krankheitserregern und stellen somit eine physiologische Reaktion dar. Geht jedoch die Kontrolle über eine lokale Entzündungsreaktion verloren, kann dies in eine überschießende systemische Reaktion (SIRS – „Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom“, im Falle einer Infektion als Sepsis bezeichnet) münden, welche potenziell pathogene,

selbstzerstörerische oder manchmal gar tödliche Auswirkungen haben kann. (Beal und Cerra, 1994; Davies und Hagen, 1997a). Das SIRS wiederum ist maßgeblich durch eine überschießende systemische Zytokinfreisetzung gekennzeichnet (Cannon und St Pierre, 1998; Gleeson, 2000; Smith, 2000), wie sie z.B. bei einer Sepsis, einer akuten Pankreatitis oder einem akuten Myokardinfarkt vorzufinden ist. (Ertel et al., 1999; Zallen et al., 1999). Auch nach erschöpfender sportlicher Belastung wird häufig eine entzündliche systemische Immunreaktion beobachtet, was u.a. durch einen Anstieg von Leukozyten sowie zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine charakterisiert ist (Northoff und Berg, 1991; Cannon und St Pierre, 1998; Shephard, 2001).

## 2.2 Belastungsinduzierte Immunantwort und -funktion

### 2.2.1 Sport und Infekte der oberen Atemwege

Hochleistungssportler berichten in Phasen intensiven Trainings und Wettkämpfen über eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen der oberen Atemwege (URTI, englisch: „upper respiratory tract infections“) (Nieman et al., 1990; Peters et al., 1993). Insbesondere Ausdauerbelastungen mit hohen bis sehr hohen Intensitäten sowie großen Umfängen, scheinen die Infektrate zu erhöhen (Nieman et al., 1994; Peters, 1997). Zu den immunologischen Veränderungen, welche die transiente Immunsuppression charakterisieren und als begünstigende Faktoren der erhöhten Infektanfälligkeit gelten, werden eine verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen (Berk et al., 1990), verringerte Phagozytose- und oxidative Burst-Aktivität von Granulozyten (Gabriel et al., 1994a; Smith und Pyne, 1997), niedrigere mucosale IgA-Konzentration (Mackinnon et al., 1993) sowie eine Lymphopenie und beeinträchtigte Lymphozytenfunktion, z.B. gemessen an einer verminderten Mitogen- oder Endotoxin-stimulierten Proliferation und Zytokinproduktion *in vitro*, gezählt (Nieman et al., 1989; Berk et al., 1990). Die beschriebenen Veränderungen sind Ausdruck einer beeinträchtigten Immunitätslage, welche unter dem Synonym „Theorie des offenen Fensters“ zusammengefasst werden und das Risiko für klinische und subklinische Infektionen (zwischen 3 bis 72 Stunden) erhöhen (Nieman, 2000). Einige Autoren stellen jedoch in jüngerer Zeit Infekte als alleinige Ursache der Beschwerdesymptome der oberen Atemwege in Frage, was mit der Bezeichnung URS (englisch: “upper respiratory symptoms“) zum Ausdruck gebracht wurde. Sie identifizierten Schwächen in der Diagnosestellung in experimentellen Studien, und diskutieren belastungsinduzierte entzündliche Stimuli als alternative Ursachen (Helenius et al., 2005; Cox et al., 2008). Studien, in denen pathologische Tests zur Unterscheidung

infektiöser und nicht-infektiöser Ursachen für URS unternommen wurden, konnten zu 5% bakterielle und zu 30-40% virale Pathogene identifiziert werden (Cox et al., 2008; Spence et al., 2007). Zu der Gruppe nicht-infektiöser Auslöser für URS werden physische und mechanische Stressoren wie z.B. das Austrocknen der Atemwege (Bermon, 2007), asthmatisch und allergisch bedingte entzündliche Belastungen der Atemwege (Helenius et al., 2005) und die Migration von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. Zytokinen von der geschädigten Skelettmuskulatur zu den Atemwegen (Peake et al., 2005) gezählt.

### 2.2.2 Belastungsinduzierte systemische Immunreaktion

Quantitative Veränderungen im peripheren Blutbild gehören zu den frühesten Beobachtungen akuter belastungsinduzierter Modulationen des Immunsystems (Garrey, 1935 12). Die zellulären sowie humoralen Veränderungen nach intensiver Belastung weisen in vielen Aspekten eine Ähnlichkeit zu entzündlichen Reaktionen auf. Während und nach körperlichen Belastungen kommt es zu einem Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut (Leukozytose), wobei sich die Leukozytensubtypen unterschiedlich verhalten. Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten steigen während körperlicher Belastung über ihr Ausgangsniveau an, besonders ausgeprägt ist hierbei der Anstieg von NK-Zellen. Während Granulozyten und Monozyten in der Nachbelastungsphase erhöht bleiben oder weiter ansteigen, folgt auf die Lymphozytose ein Abfall der Lymphozyten (Lymphopenie) mit einem Minimum zwischen einer bis drei Stunden nach Belastung (Fry et al., 1992b; Fry et al., 1992a; Baum und Liesen, 1993). Für die quantitativen Veränderungen der Granulozyten scheint eine katecholaminvermittelte Rekrutierung der Zellen, sowohl von der Gefäßwand als auch aus dem Knochenmark die Blutbahn verantwortlich zu sein (Suzuki et al., 1999). Das biphasische Verhalten der Lymphozyten scheint sowohl auf Umverteilungsprozessen in lymphatische und nicht lymphatische Organe („Homing“) als auch auf einem Zelluntergang durch Apoptose (programmierter Zelltod) (Mooren et al., 2002; Krüger et al., 2009) zu beruhen. Das Homing der Lymphozyten wird maßgeblich durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten und deren Liganden auf Endothelzellen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer akuten Belastung die Dichte der Expression von CD62L (L-Selectin), eines der bedeutendsten Adhäsionsmoleküle, auf Lymphozyten verringert (Kurokawa et al., 1995) und die Konzentration von sICAM-1 (gelöste Form des Liganden ICAM-1 auf Endothelzellen) erhöht ist (Rehman et al., 1997). Der Zusammenhang zwischen erschöpfender Belastung und einer erhöhten Apoptoserate ist bereits vielfach belegt worden (Mars et al., 1998; Mooren et al., 2002; Mooren et al., 2004). Dabei konnte

anhand der Detektion typischer Todesrezeptoren (CD95R) gezeigt werden, dass Lymphozyten belastungsbedingt eine erhöhte Sensitivität gegenüber externen Apoptose-Stimuli aufweisen (Mooren et al., 2004). Neben den genannten zellulären Veränderungen reagieren ebenso humorale Komponenten des Immunsystems auf den Belastungsreiz mit einem entzündungsähnlichen Antwortmuster. Hierzu zählt u.a. ein Anstieg von pro- sowie antiinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6. Und Akute-Phase-Proteinen, wie z.B. C-reaktives-Protein (CRP). Die Zytokinreaktion ist untrennbar mit der zellulären Immunantwort verknüpft, denn Zytokine werden von Leukozyten synthetisiert und üben auf selbige immunregulierende Funktionen aus.

#### *2.2.2.1 Belastungsinduzierte Zytokinreaktion*

1983 beobachteten Cannon und Kluger (Cannon und Kluger, 1983) nach einer Ausdauerbelastung eine erhöhte pyrogene Aktivität im Plasma, was später auf die systemische Freisetzung von IL-1 zurückgeführt wurde (Cannon et al., 1986). Aufgrund der Analogie der Zytokinkaskade, ausgehend von TNF-α und/oder IL-1, wurde einer akuten, intensiven Belastung eine Sepsis-Ähnlichkeit zugeschrieben (Espersen et al., 1990; Camus et al., 1994; Camus et al., 1997; Moldoveanu et al., 2001; Shephard, 2001). Dieses Konzept ist jedoch heute umstritten, da zahlreiche Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit den systemischen Anstieg der bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β nach körperlicher Belastung nicht replizieren konnten (Moldoveanu et al., 2001; Petersen und Pedersen, 2005). Diese Diskrepanz wurde von einigen Autoren auf Schwächen der Assays zur Zytokinbestimmung in älteren Studien zurückgeführt, da diese nicht in der Lage waren, die Aktivität von IL-1α, IL-1β und IL-6 differenziert zu messen (Suzuki et al., 2002). Im Gegenteil, jüngere Forschungsergebnisse deuten zunehmend sogar eher auf antiinflammatorische Effekte akuter Belastung auf Zytokinebene hin (s. Abb. 3, Petersen und Pedersen, 2005).

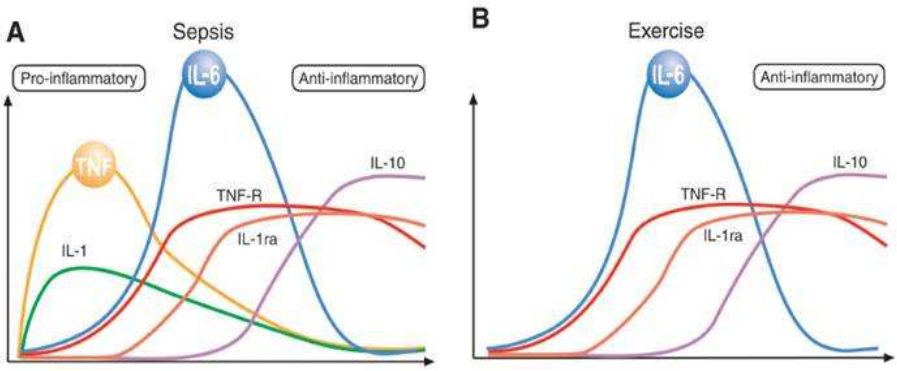



***Abb. 3**: Vergleich der Zytokinkaskade im Rahmen einer Sepsis (A) und infolge einer akuten Belastung (B), aus: Petersen und Pedersen, 2005.*

Eine zentrale Rolle scheint in diesem Zusammenhang das Zytokin IL-6 einzunehmen. Es reagiert von allen Zytokinen am sensitivsten auf Belastung und kann hierbei bis zu 100-fach im Plasma erhöht sein (Nielsen und Pedersen, 2008). Bei kaum einem anderen Zytokin besteht jedoch so große Uneinigkeit über dessen Rollenzuweisung im Entzündungsgeschehen. So wird es von einigen Autoren als „inflammatorisches“, wiederum anderen als „proinflammatorisches“ Zytokin bezeichnet. Da IL-6 nicht selber die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert, sondern vielmehr umgekehrt, wird seine Funktion aktuell häufig mit dem englischen Ausdruck „inflammation-responsive“ beschrieben (Pedersen et al., 1998; Ostrowski et al., 1999; Steensberg et al., 2003). IL-6 stimuliert wiederum die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-1ra und IL-10 (Steensberg et al., 2003), löslichen Rezeptoren von TNF-α (Tilg et al., 1997) und ist in der Lage die Endotoxin-induzierte TNF-α Produktion zu hemmen (Steensberg et al., 2003). Daher wird IL-6 von einigen Autoren eher als antiinflammatorisches Zytokin eingeordnet (Petersen und Pedersen, 2005; Pedersen, 2011). Von besonderer Relevanz für die Sportimmunlogie ist, dass der arbeitende Skelettmuskel in der Lage ist, IL-6 zu produzieren (Steensberg et al., 2002), hierdurch signifikant zur Plasma IL-6 Konzentration beizutragen (Hiscock et al., 2004) und damit als endokrinologisches Organ entscheidenden Einfluss auf die Immunreaktion zu nehmen (Pedersen und Hoffman-Goetz, 2000). So scheint eine Muskelkontraktion *per se* einen Stimulus zur Produktion von IL-6 darzustellen. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die Konzentration von IL-6 mRNA in Muskelbiopsien nach Belastung deutlich erhöht war (Ullum et al., 1994; Malm et al., 2000; Keller et al., 2001; Starkie et al., 2001; Steensberg et al., 2001a). Nach dieser Entdeckung richtete sich die Aufmerksamkeit einiger Forschergruppen auf die Identifikation weiterer sogenannter „Myokine“, zu denen neben IL-6 aktuell auch IL-15 und BDNF gezählt werden (Pedersen, 2011). Auch CXCL8 wurde zunächst als Myokin identifiziert (Akerstrom et al., 2005), dies wurde allerdings aufgrund von experimentellen Manipulationen nachträglich widerrufen (Retraction: Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle, 2011). Neben den genannten „klassischen“ pro- und antiinflammtorischen Zytokinen ist insbesondere die belastungsinduzierte systemische Freisetzung von Chemokinen (z.B. CCL2, CCL4 und CXCL8) sowie kolonie-stimulierender Faktoren (z.B. G-CSF) gut charakterisiert (Übersicht bei Suzuki et al., 2002). Ebenso vielfach untersucht worden ist die Auswirkung akuter Belastung auf Zytokine, die das Gleichgewicht zwischen $T_H1$ und $T_H2$ Zellen regulieren. Während die $T_H1$ vermittelte Immunität (z.B. über IL-2, IFN-γ) gegen intrazelluläre Pathogene geschwächt zu sein scheint, wird die $T_H2$ vermittelte Immunität (IL-4, IL-5, IL-13) gegen extrazelluläre Pathogene stimuliert (Gleeson, 2006). Zusammengenommen scheint

das Ausmaß der Zytokinantwort abhängig von Belastungsform, Intensität und Dauer zu sein (Brenner et al., 1999; Pedersen und Hoffman-Goetz, 2000; Peake et al., 2005), wobei die Intensität und die damit einhergehenden hormonellen und metabolischen Veränderungen als zentral betrachtet werden (Ostrowski et al., 2000; Peake et al., 2005).

#### *2.2.2.2 Belastungsinduzierte Akute-Phase-Reaktion*

Die Akute-Phase-Reaktion (APR) ist ein weiterer Bestandteil der systemischen Entzündungsreaktion, die durch den Anstieg einer Reihe von Akute-Phase-Proteinen (APP) gekennzeichnet ist. Zu den wichtigsten APP gehört das C-reaktive Protein (CRP) (Pepys und Hirschfield, 2003). Man ging ursprünglich davon aus, dass die CRP-Synthese auf Hepatozyten beschränkt ist (Pepys und Baltz, 1983). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch Epithel- und T-Zellen zur CRP-Genexpression bzw. CRP-Synthese in der Lage sind (Ikuta et al., 1986; Gould und Weiser, 2001; Jabs et al., 2003). Als Hauptstimulus zur CRP Synthese der Leber wird IL-6 angesehen (Pepys und Hirschfield, 2003). Die CRP Konzentration kann nach einem akuten inflammatorischen Stimulus um das bis zu 1000-fache ansteigen und erreicht üblicherweise 24-48 Stunden danach die höchsten Werte (Kushner und Rzewnicki, 1994; Pepys und Hirschfield, 2003). Der Normbereich für die systemische Konzentration von CRP wird mit <5 mg/l angegeben. Der Durchschnittswert für die (eher sitzende) Allgemeinbevölkerung wird auf etwa 2 mg/l geschätzt (Gabay und Kushner, 1999). Zu den Hauptfunktionen von CRP zählt, durch Bindung an Zellmembranoberflächen die Aufnahme und Beseitigung von beschädigten Zellen durch Phagozyten zu fördern (Chang et al., 2002). Aufgrund dieser Eigenschaft wird es als Opsonin bezeichnet. Auch an der Beseitigung von intakten, apoptotischen Zellen scheint CRP beteiligt zu sein (Gershov et al., 2000). Anstiege in der systemischen CRP-Konzentration wurden bereits nach sportlichen Belastungen unterschiedlicher Art, Intensität und Dauer beobachtet (Taylor et al., 1987, Gleeson et al., 1995; Jeukendrup et al., 2000). Selbst nach einer 60-minütigen Farradbelastung bei gerade einmal 60% der $VO_2$max unter untrainierten Probanden wurde von einem signifikanten Anstieg der CRP-Konzentration 24 Stunden nach Belastung berichtet (Smith et al., 1992). Die Annahme, dass insbesondere exzentrische Belastungen zu einem Anstieg von CRP führen, konnte in einigen Studien nicht bestätigt werden (Sorichter et al., 1995; Malm et al., 2004). Es gilt als generell akzeptiert, dass die Messung von CRP eine Bewertung des inflammatorischen Status zulässt und zur Beurteilung der Effektivität einer pharmakologischen Intervention herangezogen werden kann (Ablij und Meinders, 2002).

## 2.3 Belastungsinduzierter Muskelschaden

### 2.3.1 Ursachen und Pathophysiologie

Ungewohnte und/oder hochintensive sportliche Belastungen, wie z.B. ein Marathonlauf, Muskelarbeit mit einem sehr hohem Kraftanspruch und exzentrische Muskelbelastungen, also Muskelkontraktionen unter Entfernung von Ansatz und Ursprung, führen zu Schäden des Muskelgewebes (Allen, 2001; Close et al., 2005). Diese sind begleitet von einem im Volksmund bezeichneten „Muskelkater“. Unter Muskelkater, im englischen Sprachgebrauch als „delayed onset muscle soreness“ (DOMS) bezeichnet, versteht man verzögerte Muskelschmerzen, die etwa 8 bis 24 Stunden nach Belastung auftreten, eine Dauer von ca. einer Woche betragen können und von einer eingeschränkten Muskelfunktion begleitet werden (Newham, 1988; Connolly et al., 2003). Die betroffenen Muskeln sind kraftlos, druckempfindlich und fühlen sich steif an (Armstrong, 1984). Sowohl mechanische als auch metabolische Faktoren wurden hierbei bislang als ursächlich diskutiert. Als mechanischer Auslöser kommt insbesondere die hohe Spannungsentwicklung bei gleichzeitiger Entfernung von Ansatz und Ursprung bzw. die dadurch induzierten Mikrorisse bzw. –traumata in Frage (Skurvydas et al., 2006). Mikroskopisch betrachtet kommt es zu Zerreißungen der Z-Scheiben und vereinzelt zur nachfolgenden Auflösung der Sarkomerstruktur (Boening, 2000; Warren et al., 2001). In Abbildung 4 sind die beschriebenen Schäden nach exzentrischer Belastung in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme dargestellt.

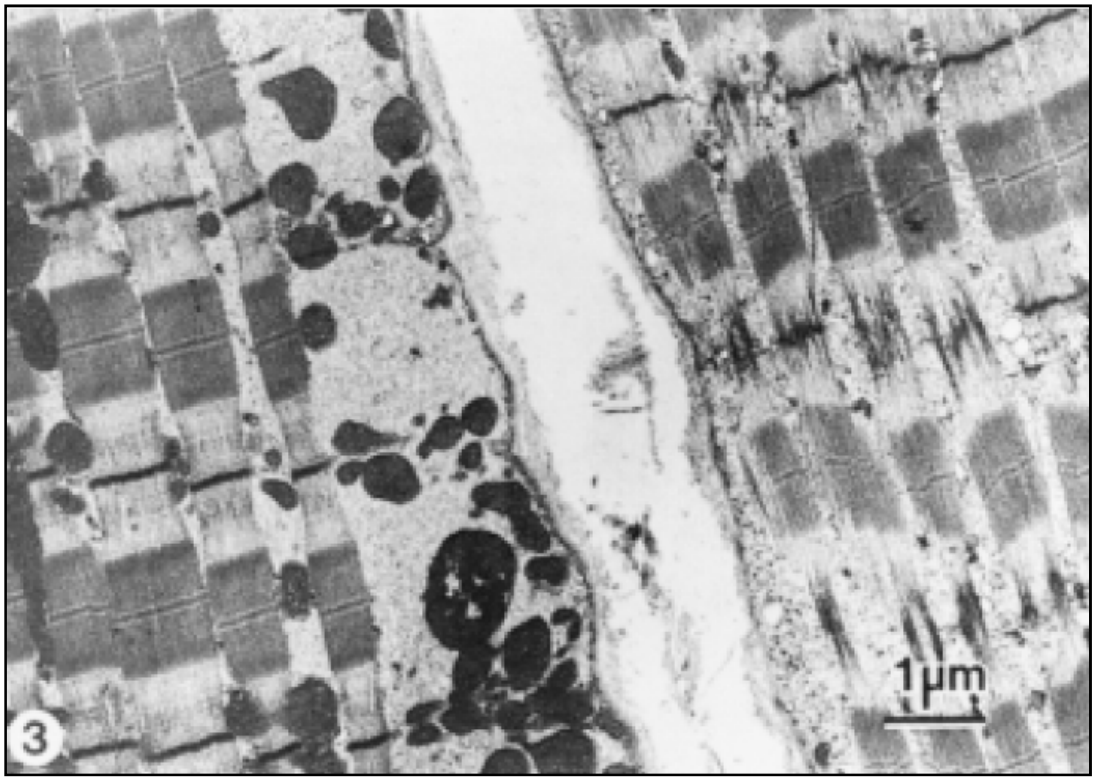



***Abb. 4**: Muskelschäden nach exzentrischer Belastung (elektronenmikroskopische Aufnahme). In der linken Faser sind die Sarkomere intakt, rechts sind die Z-Scheiben (dicke schwarze Striche) teilweise zerstört. Aus: Friden et al., 1983.*

Auch benachbarte Strukturen können von den Zerreißungen betroffen sein. Hierzu zählen Schäden des sarkoplasmatischen Retikulums, der transversalen Tubuli und des Sarkolemms (Fridén und Lieber, 1992; Proske und Morgan, 2001). Zentral in der Pathophysiologie des Muskelkaters ist die Schädigung intrazellulärer Membranstrukturen, welche zu einer Störung der zellulären Konzentration von Calcium führen, wodurch proteolytische Stoffwechselvorgänge aktiviert werden (Gissel und Clausen, 2001; Kendall und Eston, 2002; Proske und Allen, 2005). Als metabolische Ursachen kommen eine energetische Ermüdung und eine damit einhergehende Anhäufung von H+-Ionen und Abfall des pH-Wertes in Frage. Die Folge ist ein ATP-Mangel, wodurch die Energieversorgung von ATP-abhängigen Natrium-/Kalium- oder Calcium-Pumpen eingeschränkt ist. Dies wirkt sich wiederum ungünstig auf die Ionenhomöostase zwischen Intra- und Extrazellularraum aus (Fink et al., 1983; Boening, 2000; Clausen und Nielsen, 2007). Die Beobachtung, dass insbesondere Bergabläufe, die weniger einer energetischen Ermüdung noch einer nennenswerten Laktatakkumulation unterliegen aber besonders durch intensive exzentrische Muskelarbeit geprägt sind und daher einen besonders starken Muskelkater induzieren, deuten eher auf den besonderen Stellenwert mechanischer Ursachen hin (Dannecker et al., 2002).

### 2.3.2 Marker des Muskelschadens

Die gestörte Zellmembranintegrität führt zu einem erhöhten Muskelproteinefflux in die Blutbahn. Enzyme wie z.B. Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH), die eigentlich intrazellulär lokalisiert sind, können in erhöhter Konzentration im peripheren Blut nachgewiesen werden (Mokuno et al., 1987; Szumilak et al., 1998). Der Anstieg von CK unterliegt offensichtlich einer hohen Intersubjektvariabilität, steigt aber in der Regel deutlicher an als LDH. Es wurden nach intensiven exzentrischen Kontraktionen CK-Anstiege im peripheren Blut auf bis zu das 200-fache beschrieben (Newham et al., 1987).

Durch den Verlust an funktionellen kontraktilen Elementen kommt es weiterhin zu einem wesentlichen Kraftverlust (Child et al., 1998; Warren et al., 2001; Sayers und Clarkson, 2001; Hausswirth et al., 2011). Dieser ist nach exzentrischen Belastungen stärker ausgeprägt und länger anhaltend als nach konzentrischen und isometrischen Kontraktionen (Newham et al., 1983; Jones et al., 1989; Golden und Dudley, 1992). So konnte nach intensiven exzentrischen Kontraktionen ein Kraftverlust von bis zu 50% und einer Regenerationszeit von bis zu zwei Wochen festgestellt werden (Newham et al., 1987).

Der verzögert auftretende Muskelschmerz wird auf das lokale Entzündungsgeschehen zurückgeführt (Newham et al., 1983; Connolly et al., 2003; Milias et al., 2005). Im Speziellen scheinen sowohl durch Abbauprozesse entstandene Metabolite sowie eine ödembedingte Gewebsschwellung und ein damit einhergehender erhöhter Gewebsdruck als Schmerzauslöser verantwortlich zu sein. Beides führt zu einer Reizung von freien Nervenendigungen (Muskelnozizeptoren) und wirkt somit schmerzauslösend (Boening, 2000).

### 2.3.3 Lokale Entzündungsreaktion

Infolge der strukturellen Schäden kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche für den Regenerations- und Umbauprozess des Gewebes eine zentrale Rolle einnimmt. Über die Sekretion chemoattraktiver Zytokine im betroffenen Areal werden neutrophile Granulozyten und Makrophagen zum Entzündungsort rekrutiert, wo sie bis zu 24 Stunden respektive 14 Tagen nachweisbar sind (Beaton et al., 2002a; Beaton et al., 2002b; Hamada et al., 2005). Dort beseitigen sie Zelltrümmer, leiten über die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies Umstrukturierungsvorgänge ein (Nguyen und Tidball, 2003a; Nguyen und Tidball, 2003b) und tragen über die Produktion proinflammatorischer Zytokine ihrerseits zum Entzündungsgeschehen bei. Proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1β und TNF-α werden im Muskel bis zu fünf Tage nach der Belastung exprimiert (Malm et al., 2004; Hamada et al., 2005). Zu den

Chemokinen, welche eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe und deren Aktivierung einnehmen, gehören Mitglieder der CC-Familie wie z.B. CCL2, CCL3 und CCL4 (Kunkel, 1999; Baggiolini, 2001). Einige Autoren konnten außerdem zeigen, dass das Ausmaß der belastungsinduzierten systemischen Leukozytose und Zytokinfreisetzung von der Größe der geschädigten Muskelmasse abhängig ist (Cannon et al., 1990; Cannon et al., 1994; Malm et al., 2000).

## 2.4 Methoden der Zytokindiagnostik

Die Bestimmung von belastungsinduzierten Zytokinprofilen fand in der Vergangenheit zumeist im Serum bzw. Plasma statt. Hierbei wurden Wissenschaftler häufig mit dem Problem niedriger und z.T. unter den Detektionsgrenzen liegender Zytokinkonzentrationen konfrontiert. Insbesondere wenn die sportliche Belastung zu kurz oder nicht intensiv genug gewählt wurde, konnten häufig keine Veränderungen der Analyte im Serum aufgedeckt werden (Übersicht bei Suzuki et al., 2002). Die Bewertung von systemisch gemessenen Zytokinkonzentrationen unterliegt zudem einer Reihe von Schwierigkeiten und Einschränkungen. Zum Einen entspricht die Plasma-Konzentration eines Zytokins nicht der tatsächlich synthetisierten Menge, da dabei die periphere Aufnahme nicht berücksichtigt wird. Sprenger et al. fanden z.B. enorme Konzentrationsanstiege einiger Zytokine im Urin, während im Plasma keine signifikanten Änderungen beobachtet wurden (Sprenger et al., 1992). Neben der zellulären Aufnahme wird die systemische gemessene Zytokinkonzentration außerdem von der Konzentration löslicher Zytokinrezeptoren beeinflusst (Suzuki et al., 2002). Daher erscheint die Betrachtung von Plasma-Konzentrationen alleine, für die Untersuchung des systemischen Zytokinstatus als unzureichend (Northoff et al., 1994). Für die Interpretation kommt weiterhin erschwerend hinzu, dass die zelluläre Herkunft und die zugrundeliegenden Stimuli der systemisch gemessenen Analyte nicht eindeutig identifizierbar sind. Eine Bewertung der klinischen Relevanz von Konzentrationsveränderungen einzelner Zytokine fällt zudem wegen ihrer diversen Eigenschaften (Pleiotropie, Redundanz) schwer (McInnes und Schett, 2007).

Aufgrund der aufgeführten Probleme wurden zunehmend die Überstände von Zellkulturen für die Untersuchung der Zytokinproduktion von peripheren Leukozyten eingesetzt. In diesem Fall richtete sich die Untersuchung auf die Funktionsbestimmung und Abwehraktivität einzelner Leukozytensubpopulationen. Dies erfolgte zumeist durch die Isolation von periphreren mononukleären Leukozyten und nachfolgender Stimulation durch Mito- oder Antigene *in vitro* (Drenth et al., 1995; Baum et al., 1997; DeRijk et al., 1997; Bassit et al., 2000). Diese Methode erfordert jedoch eine

Auftrennung der Blutbestandteile durch mehrere Arbeitsschritte, welche mit einer Reihe von Nachteilen und Störfaktoren behaftet sind. Dazu gehört u.a., dass bereits durch Lagerung und Transport ein nennenswerter Einfluss auf die Vitalität, Funktion und Reaktivität von Leukozyten ausgeübt werden kann (Damsgaard et al., 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Zellkulturen ein im Vergleich zu Vollblut verändertes Mengenverhältnis von Monozyten zu Lymphozyten aufweisen (de Groote et al., 1992). Nicht zuletzt werden die Zellen aus ihren *in vivo* Bedingungen, welche durch ein komplexes Signalnetzwerk aus Zellen, Proteinen und anderen costimulierenden Signalen gekennzeichnet sind, herausgelöst. Selbst für Blutplättchen konnte gezeigt werden, dass sie entscheidenden Einfluss auf die Leukozytenfunktion nehmen (Li, 2008).

In der jüngeren Vergangenheit wurden vermehrt Vollblutkulturen (mit oder ohne Stimulantien) eingesetzt. Durch die Verwendung von Vollblut wird eine möglichst präzise Abbildung der *in vivo* Bedingungen ermöglicht (Schmolz et al., 2004). Hierbei bleiben die Integrität aller Blutbestandteile und ihre Interaktion untereiander erhalten, weshalb von einigen Autoren statt *in vitro* der Ausdruck *ex vivo* verwendet wurde (Drenth et al., 1998). Zudem erübrigt sich das Auftrennen der Blutbestandteile, wodurch eine Beeinflussung der Zellratio und Zellaktivierung vermieden wird (de Groote et al., 1992). Aus den genannten Gründen wird Vollblutkulturen gegenüber Zellkulturen eine Überlegenheit zur Untersuchung der *in vitro* bzw. *ex vivo* Zytokinproduktion zugeschrieben (de Groote et al., 1992; Yaqoob et al., 1999; Schmolz et al., 2004; Damsgaard et al., 2009). Für die Zytokinproduktion in Vollblut- und Zellkulturen konnte bereits eine hohe Korrelation nachgewiesen werden (Yaqoob et al., 1999; Damsgaard et al., 2009), ein Vergleich mit der systemischen Konzentration wurde bislang noch nicht unternommen. Da die intraindividuelle Variabilität der Zytokinpoduktion bei wiederholten Messungen in sVBK gering zu sein scheint, wird die Verwendung von sVBK speziell für die Untersuchung von Behandlungseffekten in Interventionsstudien empfohlen (Damsgaard et al., 2009).

## 2.5 Pharmakologische und nutritive Gegenmaßnahmen der belastungsinduzierten Immunreaktion

Diverse Versuche wurden bislang unternommen, die immunologischen Negativfolgen einer intensiven Belastung durch Arzneimittel und Supplemente positiv zu beeinflussen. Diese Strategien weisen Ähnlichkeiten mit der Anwendung von immunonutritiven Maßnahmen bei schweren Krankheiten wie z.B. einer Sepsis auf (Nieman, 2008). Frühere Studien richteten ihre Aufmerksamkeit auf die Einnahme von hochdosierten Vitamin- und/oder Mineralsupplementen, allerdings konnte

zusammengenommen kein Nutzen nachgewiesen werden (Nieman et al., 2000; Gleeson et al., 2004; Davison und Gleeson, 2005; Davison und Gleeson, 2006).

Weitere Studien beschäftigten sich mit der Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID, engl.: „nonsteroidal anti-inflammatory drugs“), wie z.B. Ibuprofen, insbesondere im Rahmen von muskelschädigenden Belastungsmodellen. Manche Autoren berichten von begünstigenden Effekten auf die Muskelintegrität (Baldwin et al., 2001), andere Gruppen berichten hingegen von nachteiligen Effekten auf Marker des Muskelschadens (Donnelly et al., 1990) und des oxidativen Stress (McAnulty et al., 2007). Zudem besitzen NSAID Nebenwirkungen im Bereich des gastrointestinalen System (Nieman et al., 2006). Unter Nahrungsergänzungsmitteln besteht hauptsächlich für die Einnahme von Kohlenhydraten vor und/oder während sportlicher Belastung die größte Einigkeit hinsichtlich der Minderung der belastungsinduzierten Inflammation (Nieman, 1998; Davison und Gleeson, 2005; Gleeson, 2007; Chen et al., 2008). Weitere Studien finden sich zu Supplementen der Gruppe der Probiotika, β-Glucane, Flavanoide und Polyphenole wie z.B. Quercetin oder Curcumin. Die Befunde für eine mögliche Minderung der belastungsinduzierten Entzündungsreaktion und des Risiko für URTI sind allerdings heterogen (Lyall et al., 2009; Murphy et al., 2009; Nieman et al., 2009; Bakker et al., 2010). Einzig für Polyphenole konnten auch in Humanstudien antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden (Nieman, 2008; Nieman et al., 2009), weshalb ihre Einnahme für Athleten derzeit empfohlen werden kann (Walsh et al., 2011). Untersuchungen zeigen, dass besonders die Anwendung pflanzlicher Supplemente unter Athleten (gegenüber der Allgemeinbevölkerung) einen hohen Zuspruch findet (Baylis et al., 2001; Froiland et al., 2004; Herbold et al., 2004). Allerdings finden sich keine eindeutigen Belege für die Effekte von pflanzlichen Extrakten auf die Immunfunktion (Übersicht bei Senchina et al., 2009). Für homöopathische Verdünnungen existieren über den klinischen Anwendungsbereich hinaus noch weniger Daten im sportimmunologischen Kontext.

### 2.5.1 Traumeel®S

Bei dem in dieser klinischen Studie eingesetzten Prüfpräparat handelt es sich um Traumeel®S Tabletten. Traumeel®S Tabletten sind ein registriertes homöopathisches Komplexpräparat (BfArM Reg.-No.: 2522108.00.00) ohne Angabe einer therapeutischen Indikation, welches seit nahezu 50 Jahren in Deutschland und vielen anderen Ländern erhältlich ist. Traumeel®S wird von der Firma Biologische Heilmittel HEEL GmbH (Baden-Baden) gemäß des Deutschen Homöopathischen Arzneibuchs (HAB), sowie aktuellen EU-GMP Richtlinien und entsprechenden nationalen

Regularien hergestellt. Traumeel® wurde von dem deutschen Arzt Dr. Hans-Heinrich Reckeweg in den 1930ern entwickelt. Die Darreichungsformen von Traumeel®S umfassen neben Tabletten außerdem Salbe, Gel und Ampullen zur Injektion. Traumeel®S enthält 12 pflanzliche und 2 mineralische Bestandteile in homöopathischer Verdünnung zwischen $1:10^2$ und $1:10^8$ (Tab. 1).

***Tab. 1**: Zusammensetzung einer Tablette Traumeel®S. D: Verdünnung von 1:10 (z.B. D8 = $1:10^8$)*

| ***Inhaltsstoff*** | ***Potenz*** | ***Menge*** |
|---|---|---|
| *Achillea millefolium* *(Schafgarbe)* | *D3* | *15 mg* |
| *Aconitum napellus* *(Eisenhut)* | *D3* | *30 mg* |
| *Arnica montana* *(Arnika)* | *D2* | *15 mg* |
| *Atropa belladonna* *(Tollkirsche)* | *D4* | *75 mg* |
| *Bellis perennis* *(Gänseblümchen)* | *D2* | *6 mg* |
| *Calendula officinalis* *(Ringelblume)* | *D2* | *15 mg* |
| *Chamomilla recutita* *(Kamille)* | *D3* | *24 mg* |
| *Echinacea angustifolia* *(schmalblättriger Sonnenhut)* | *D2* | *6 mg* |
| *Echinacea pupurea* *(roter Sonnenhut)* | *D2* | *6 mg* |
| *Hamamelis virginiana* *(Zaubernuss)* | *D2* | *15 mg* |
| *Hepar sulfuris* *(kalkartige Schwefelleber)* | *D8* | *30 mg* |
| *Hypericum perforatum* *(Johanniskraut)* | *D2* | *3 mg* |
| *Mercurius solubilis Hahnemanni* *(Gemenge, das im Wesentlichen Mercuroamidonitrat enthält)* | *D8* | *30 mg* |
| *Symphytum officinale* *(Beinwell)* | *D8* | *24 mg* |
| ***Trägersubstanzen*** | | |
| *Lactose-Monohydrat*<br>*Magnesiumstearat* | | *6,0 mg*<br>*1,5 mg* |
| *Total pro Tablette* | | ***301,5 mg*** |

Zu den Hauptanwendungsgebieten von Traumeel®S im Bereich des Sports gehören nach Angaben des Herstellers akute musculoskeletale Verletzungen wie z.B. Distorsionen, Dislokationen, Kontusionen, Hämatome, post-traumatische Ödeme und Weichteilschwellungen. Weitere Anwendungsgebiete sind inflammatorische und degenerative Prozesse, ebenso hauptsächlich das musculoskeletale System betreffend. Aufgrund der geringen Konzentrationen der Bestandteile von Traumeel®S existieren keine pharmakokinetischen Daten.

### 2.5.2 Wirksamkeit von Traumeel®S

#### *2.5.2.1 RCT im Bereich entzündlicher Erkrankungen*

In einer randomisierten, placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie von Oberbaum et al. wurde die Wirksamkeit von Traumeel®S bei 32 Chemotherapie-Patienten nach einer Stammzelltransplantation hinsichtlich der Entstehung und des Verlaufs einer Stomatitis untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Traumeel®S signifikant gegenüber Placebo in der Lage war, den Schweregrad und die Dauer der Chemotherapie-induzierten Stomatitis zu reduzieren (Oberbaum et al., 2001). Diese Ergebnisse konnten jedoch in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie nicht repliziert werden (Sencer et al., 2012). Auch hier wurden bei insgesamt 181 Patienten nach Stammzelltransplantation die Häufigkeit und der Verlauf einer Chemotherapie-induzierten Mucositits untersucht. Zwischen Traumeel- und Placebo-Behandlung fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

#### *2.5.2.2 RCT im Bereich musculoskeletales System*

Zell et al. (Zell et al., 1988) untersuchten in einer Doppelblindstudie die Wirksamkeit von Traumeel®S bei der Behandlung akuter Sprunggelenksdistorsionen unter 73 Patienten. Sie konnten einen signifikant schnelleren Heilungsverlauf der Traumeel®S-Gruppe nachweisen. Weiterhin berichteten am 10. Tag signifikant weniger Patienten, die mit Traumeel®S-Salbe behandelt wurden, über Schmerzen bei Bewegungsausführung. Diese Ergebnisse werden gestützt durch eine weitere Doppelblindstudie von Böhmer & Ambrus (Böhmer & Ambrus, 1992). Hier führte die Behandlung verschiedener musculoskeletaler Sporttraumata mit Traumeel®S-Salbe gegenüber einem Placebo zu einer signifikant größeren Reduktion der Schwellung und des Schmerzempfindens. In einer Studie von Thiel et al. wurde die Wirksamkeit einer 8-tägigen Behandlung mit einer Traumeel®S-Injektionslösung bei 73 Hämarthrose Patienten überprüft. Der therapeutische Nutzen konnte anhand der Zielgrößen Bewegungsradius zwischen betroffenem und gesundem Gelenk, Reduktion der Schwellung sowie des Schmerzempfindens nachgewiesen werden (Thiel, 1994).

#### *2.5.2.3 Prä-klinische Studien*

Erkenntnisse über die antiinflammatorischen Effekte von Traumeel®S stammen von Porozov et al. (Porozov et al., 2004). Diese Gruppe untersuchte die Effekte von Traumeel®S auf die Funktion von aktivierten T-Zellen, Monozyten und Darmepithelzellen hinsichtlich Ihrer Sekretion von IL-1β, TNF-α und CXCL8 *in vitro*. Sie fanden eine signifikante Reduzierung der Sekretion aller 3 genannten Zytokine um mindestens 50%. Weiterhin war die Fähigkeit von T-Zellen und Monozyten zur Proliferation nicht beeinflusst. Weitere Daten aus der Grundlagenforschung deuten darauf hin, dass die organischen Komponenten von Traumeel®S Lymphozyten zur Synthese und Sekretion von TGF-β („transforming growth factor-β") in Vollblutkulturen stimulieren. TGF-β ist ein Zytokin mit antiinflammatorischen Funktionen und wirkt zudem stimulierend auf Fibroblasten. Da letztere z.B. Proteoglykane und Glucasaminoglykane produzieren und damit den Aufbau der Extrazellulärmatrix unterstützen, wurde von den Autoren geschlussfolgert, dass durch die Anwendung von Traumeel®S die Wundheilung unterstützt wird (Heine und Schmolz, 1998). Eine Untersuchung von Conforti et al. (Conforti et al., 1997) konnte weiterhin zeigen, dass Traumeel®S im Rahmen eines adjuvanten Arthritis Modells sifgnifikant gegenüber Placebo in der Lage war, das Krankheitsgeschehen in der Akut-Phase (gemessenen an einem Arthritis-Index) zu reduzieren ohne jedoch gleichzeitig Einfluss auf die Zellfunktion von Leukozyten zu nehmen. In derselben Studie wurden zudem die Effekte von Traumeel®S auf ein bei Versuchstieren durch Carrageen induziertes Ödem untersucht. Die lokale Injektion von Traumeel®S führte gegenüber einer NaCl-Injektion zu einer um 15% (p=0,05) verringerten Ödembildung. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Lussignoli et al. (Lussignoli et al., 1999) unter Verwendung eines ähnlichen Modells im Tierversuch. Zusätzlich zur Injektion von Traumeel®S bekamen einige Versuchstiere lediglich eine Kombination einzelner Bestandteile von Traumeel®S (*Arnica montana, Hamamelis virginiana, Achillea millefolium, Aconitum napellus* etc.) injiziert. Hierbei waren die Effekte von Traumeel®S größer als jene, welche durch Verwendung einzelner Bestandteile erzielt wurden. Dies wurde auf die Überlegenheit der Synergie aller Bestandteile zurückgeführt (Lussignoli et al., 1999). Darüber hinaus wurde gegenüber der Kontrollgruppe 5 Stunden nach Induzierung des Ödems eine signifikant geringere Konzentration von IL-6 im Serum nachgewiesen (Lussignoli et al., 1999).

#### *2.5.2.4 Zusammenfassung*

Zusammenfassend deuten die hier vorgestellten Studienergebnisse auf immunregulierende, antiödematöse und antiexsudative Eigenschaften von

Traumeel®S unter pathologischen und traumatischen Bedingungen hin, welche jedoch eher lokal limitiert zu sein scheinen. Diese Eigenschaften scheinen über eine Modulation inflammatorischer Prozesse auf Zytokinebene ausgeübt zu werden. Als Mechanismus auf molekularer Ebene wird die Beeinflussung des Nukleären Faktors kB (NF-kB von engl.: „nuclear factor-kB“) diskutiert. NF-kB bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen reguliert, die maßgeblich an einer Entzündungsreaktion beteiligt sind (Li und Verma, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Helenalin in der Lage ist, selektiv NF-kB zu hemmen (Lyss et al., 1998). Chemisch betrachtet ist Helenalin ein Sesquiterpen-Lacton, welches in der Pflanzenfamilie der *Asteraceae* (Korbblüler) vorkommt und dem antitumorale (Powis et al., 1994) und antiinflammatorische (Lyss et al., 1998) Eigenschaften zugesprochen werden. Zur Familie der Korbblütler zählen wiederum *Arnica montana, Bellis perennis, Echinacea, Achillea millefolium, Calendula officinalis* und *Chamomilla recutita*, allesamt Bestandteile von Traumeel®S. Ob die beschriebenen Mechanismen jedoch auch für Traumeel®S zutreffen, ist jedoch momentan noch nicht wissenschaftlich abgesichert. Insofern ist die Evidenz der Wirksamkeit von Traumeel®S zum heutigen Kenntnisstand als gering zu bewerten, was die Durchführung weiterer klinischer Untersuchungen sowohl im prä- als auch klinischen Forschungsbereich notwendig erscheinen lässt (Schneider, 2011). Über die Anwendung von Traumeel®S im sportimmunologischen Kontext, sowohl auf systemischer als auch lokaler (z. B. den Muskel betreffend) Ebene, existieren keine Daten.

# 3 Untersuchungsziele

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel im Rahmen von 2 Studienabschnitten zu überprüfen, inwieweit infolge einer 60-minütigen intensiven Ausdauerbelastung…

Studienabschnitt A:

…die Kinetiken und die Detektionsrate von 6 ausgewählten Zytokinen in Überständen stimulierter Vollblutkulturen (nachfolgend mit „sVBK“ gekennzeichnet) und im Serum (nachfolgend mit „Serum“ gekennzeichnet) miteinander übereinstimmen. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der Zytokine IL-1β, IL-1ra, IL-6, CCL2, CXCL8 und TNF-α (Serum und sVBK) der Placebo-Gruppe zur explorativen Analyse herangezogen. Die gewonnen Erkenntnisse sollten eine Beurteilung der Vergleichbarkeit sowie der Vor- und Nachteile beider Methoden zur Untersuchung der belastungsinduzierten Zytokinantwort ermöglichen.

Studienabschnitt B:

…die Einnahme von Traumeel®S-Tabletten modulierende Effekte auf belastungsinduzierte strukturelle und entzündlichen Veränderungen, subjektive Beschwerden als auch funktionelle Leistungsparameter auszuüben vermag. Dazu wurden die 24-Stunden-Nachbelastungswerte von IL-6 und hsCRP als Hauptzielgrößen festgelegt und zwischen einer Placebo- und Verum-Gruppe miteinander verglichen. Die 24-Stunden-Nachbelastungswerte weiterer 24 Zytokine, quantitativer und funktionaler immunologischer zellulärer Parameter, Marker des Muskelschadens, der Maximalkraft der Oberschenkelmuskulatur und des subjektiven Schmerzempfindens wurden außerdem als Nebenzielgrößen einer explorativen Analyse unterzogen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten eine Beurteilung der Wirksamkeit von Traumeel®S in der Modulation der belastungsinduzierten Immun- und Entzündungsantwort als auch des belastungsinduzierten Muskelschadens ermöglichen.

# 4 Hypothesen

Basierend auf dem beschriebenen Kenntnisstand über die immunregulierenden und antiinflammatorischen Eigenschaften von Traumeel (Conforti et al., 1997; Heine & Schmolz, 1998; Lussignoli et al., 1999; Porozov et al., 2004;) wurden im Rahmen der vorliegenden Studie folgende gerichtete Alternativ- ($H_1$) und Nullhypothese ($H_0$) formuliert:

$H_1$: Infolge einer 60-minütigen Belastung auf dem Spinning-Rad bei 80%$VO_2$max ist die Konzentration von IL-6 (sVBK) und hsCRP über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Einnahme von Traumeel®S-Tabletten im Mittel geringer als nach Einnahme von Placebo-Tabletten.

$H_0$: Infolge einer 60-minütigen Belastung auf dem Spinning-Rad bei 80%$VO_2$max unterscheidet sich die Konzentration von IL-6 (sVBK) und hsCRP über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Einnahme von Traumeel®S-Tabletten im Mittel nicht von jener nach Einnahme von Placebo-Tabletten.

# 5 Material und Methoden

## 5.1 Studiendesign

Die vorliegende Pilot-Studie entsprach einem Placebo-kontrollierten, randomisierten, doppelblinden Parallel-Gruppen-Design und wurde in der Abteilung für Sportmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (monozentrisch) durchgeführt. Die Studienteilnahme der Probanden erstreckte sich über insgesamt 2 Tage. Das Screening der potentiellen Teilnehmer erfolgte innerhalb von 8 Tagen vor Studieneinschluss. Am Morgen von Tag 1, zwischen 08.00-10.00 Uhr, erschienen die Probanden nüchtern (ab spätestens 22.00 Uhr des Vorabends) im Prüfzentrum und erhielten ein standardisiertes Frühstück (2 Scheiben Vollkornbrot, Konfitüre und ein Glas Wasser). Die Studienaktivitäten an Tag 1 umfassten die erneute Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien, die Probanden-Randomisierung, die Belastungsintervention, die Erfassung der Zielgrößen zu insgesamt 4 Zeitpunkten sowie die Einnahme der Studienmedikation. Der einzige und zugleich letzte Nachbeobachtungstermin fand am Morgen von Tag 2, genau 24 Stunden nach Beendigung der Belastungsintervention, statt (s. Übersicht in Tab. 2). Die Probanden wurden aufgefordert mindestens 48 Stunden vor Studienbeginn sowie während ihrer Studienteilnahme keinen anderen sportlichen und körperlich anstrengenden Tätigkeiten nachzugehen (z.B. Anfahrt zum Prüfzentrum mit dem Fahrrad). Bis zum letzten Messzeitpunkt an Tag 1 (3 Stunden nach der Belastung) war es den Probanden untersagt, Nahrung zu sich zu nehmen. Die Flüssigkeitsaufnahme wurde auf Wasser beschränkt und war *ad Libitum* gestattet.

***Tab. 2**: Übersicht des zeitlichen Ablaufs aller Studienmaßnahmen*

| ***Maßnahme/ Erfassung von*** | ***Screening Tag -7 bis 0*** | ***Tag 1*** | | | | | ***Tag 2*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***Vorbelastung*** | | ***Nachbelastung*** | | | ***morgens*** |
| | | ***vorab*** | ***ZP 1*** | ***ZP 2*** | ***ZP 3*** | ***ZP 4*** | ***ZP 5*** |
| *Demographische Informationen* | X | | | | | | |
| *Ergebnisse der sportmedizinischen Untersuchung* | X | | | | | | |
| *zurückliegende und Begleiterkrankungen* | X | X | | | | | X |
| *zurückliegende und begleitende Medikation* | X | X | | | | | X |
| *Ein- und Ausschlusskriterien* | X | X | | | | | |
| *Aufklärungsgespräch* | X | | | | | | |
| *Schriftliche Einwilligung des Probanden* | X | | | | | | |
| *Standardfrühstück* | | X | | | | | |
| *Randomisierung/ Studieneinschluss* | | X | | | | | |
| *Blutentnahme* | | | X | X | X | X | X |
| *McGill Schmerzfragebogen* | | | X | X | X | X | X |
| *Maximalkrafttest* | | | X | X | X | X | X |
| *Studienmedikation* | | | | *1 Tabl. alle 15 min nach Belastung (8x insgesamt) 6h und 10h nach Belastung je 2 Tabl.* | | | *1x2 Tabl. morgens* |
| *Evaluation unerwünschter Ereignisse* | | | | | | X | X |
| *Dokumentation der Tabletteneinnahme* | | | | | | X | X |
| ***ZP: Zeitpunkt der Datenerfassung*** | | ***direkt vorher (prä)*** | ***direkt danach (post)*** | ***1h*** | ***3h*** | ***24h*** | |
| | | ***60 min Fahrrad bei 80% $VO_2$max*** | | | | | |

## 5.2 Zielgrößen

### 5.2.1 Studienabschnitt A

In Studienabschnitt A wurden die Konzentrationskinetiken folgender 6 Zytokine im Serum sowie in sVBK miteinander verglichen und zusätzlich deren Detektionsrate in Prozent aller gemessenen Proben ermittelt:

- IL-1β und TNF-α (proinflammatorisch)
- IL-1ra (antiinflammatorisch)
- IL-6 (inflammationsregulierend)
- CCL2 und CXCL8 (chemotaktisch)

### 5.2.2 Studienabschnitt B

#### *5.2.2.1 Hauptzielgrößen*

Als Hauptzielgrößen im klinischen Studienabschnitt B wurden die 24-Stunden-Nachbelastungswerte von IL-6 (sVBK) und von hsCRP festgelegt.

#### *5.2.2.2 Nebenzielgrößen*

Die 24-Stunden-Nachbelastungswerte aller nachfolgend aufgeführten Nebenzielgrößen wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen:

*Muskelschaden:*

CK, LDH

Isometrische Maximalkraft Knie-Extension ($Maxkraft_{Ext}$), Isometrische Maximalkraft Knie-Flexion ($Maxkraft_{Flex}$)

Schmerz (gesamt) und Schmerz (VAS), (Das subjektive Schmerzempfinden wurde durch den „McGill Pain Questionnaire“ erfasst und der Gesamtscore sowie die visuelle Analogskala ausgewertet)

*Weißes Blutbild*

Anzahl der Gesamtleukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen

*Apoptose und Aktivierung von Lymphozyten*

Annexin V-, CD62-, CD69-, CD95R- und CD95L-positive Lymphozyten (prozentual und absolut)

*Zytokine in sVBK:*

CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8, GM-CSF, IFN-γ, IL-1ra, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, SCF, TNF-α, TNF-β

*Zytokine in sVBK pro Monozyt/Lymphozyt*

Als zusätzliche Nebenzielgrößen wurden außerdem die Konzentrationen von CCL2, IL-1β, IL-6 und TNF-α (sVBK) pro 1000 Monozyten (pg/1000Mon) und die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5 und IFN-γ (sVBK) pro 1000 Lymphozyten (pg/1000Lym) berechnet.

*Zytokine im Serum*

s. Zielgrößen Studienabschnitt A

## 5.3 Probandenselektion

Es wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt:

***Tab. 3**: Ein- und Ausschlusskriterien*

| ***Einschlusskriterien*** | ***Ausschlusskriterien*** |
|---|---|
| *1. Geschlecht: männlich* | *1. Trainingsumfang/Woche ≥ 6 Stunden* |
| *2. Alter ≥ 18 und ≤ 40 Jahre* | *2. Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (einschl. hochdosierte Vitamine und Mineralien)* |
| *3. BMI ≥ 18.5 und < 27,5 kg/m$^2$* | *3. Chronische Immunschwäche* |
| *4. Relative maximale Sauerstoffaufnahme ($VO_2$max) < 53 ml/kg x min* | *4. Akuter Infekt* |
| *5. Guter Allgemeinzustand* | *5. Herz- und/oder Kreislauf-Erkrankungen* |
| *6. Nichtraucher* | *6. Pathologischer EKG-Befund* |
| *7. Kaukasier* | *7. Erkrankungen des Bewegungsapparates* |
| *8. Sportmedizinische Untersuchung und Leistungsdiagnostik auf einem Fahrradergometer innerhalb von maximal 3 Monaten vor Studienbeginn* | *8. Jeglicher klinischer Zustand, der eine systemische Dauertherapie erfordert oder die Studienziele beeinträchtigt* |
| *9. Ist willens, sein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme zu geben* | *9. Überempfindlichkeit gegen Korbblütler (z.B. Echinacea)* |
| | *10. Laktoseintoleranz* |
| | *11. Drogen- oder Alkoholmissbrauch* |
| | *12. Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung innerhalb von 4 Wochen vor Studienbeginn* |

### 5.3.1 Rekrutierung

Die Ansprache potentieller Studienteilnehmer erfolgte sowohl elektronisch per E-Mail als auch telefonisch. Weiterhin wurden Plakate an öffentlichen städtischen sowie universitären Standorten ausgehängt sowie Anschreiben per E-Mail-Verteiler (JLU Gießen, THM Mittelhessen) und Veröffentlichungen in lokalen Printmedien unternommen.

## 5.4 Sportmedizinische Untersuchung

Die Durchführung einer sportmedizinischen Untersuchung gehörte nicht zu den Studienbestandteilen, zählte jedoch zu den Voraussetzungen einer Studienteilnahme. Zu den obligatorischen Bestandteilen einer sportmedizinischen Untersuchung gehören:

- Anamnese (Krankengeschichte und Sportanamnese)
- umfassende körperliche Untersuchung (internistisch und orthopädisch)
- Ruhe-EKG
- Lungenfunktion
- Belastungs-Untersuchung (inkl. Belastungs-EKG)

Die Belastungs-Untersuchung ist standardisiertes Verfahren in der Sportmedizin zur Beurteilung der Ausdauerleistungsfähigkeit und des kardiopulmonalen Systems und damit u.a. auch der Sporttauglichkeit der betreffenden Person. Hierbei wird üblicherweise eine Fahrrad- oder Laufbandergometrie eingesetzt, welche durch standardisierte Protokolle bezüglich des Belastungsschemas gekennzeichnet ist und je nach Zielperson bis zur subjektiven Erschöpfung durchgeführt wird. Begleitend zum EKG wird außerdem der arterielle Blutdruck gemessen und fakultativ geringe Blutmengen zur Laktatbestimmung aus dem Ohrläppchen entnommen und/oder eine Atemgasanalyse per Spirometrie durchgeführt. Hinsichtlich der Eignung zur Studienteilnahme spielte neben der medizinischen Befunderhebung ebenso der Trainingsstatus bzw. die Ausdauerleistungsfähigkeit des Probanden eine entscheidende Rolle. Letztere wurde anhand der sogenannten maximalen Sauerstoffaufnahme ($VO_2$max) beurteilt. Die $VO_2$max wird spirometrisch gemessen und beschreibt die Menge Sauerstoff (ml/min), die eine Person bei Ausbelastung maximal verwerten kann. Sie wird hauptsächlich durch alle an der oxidativen Energiebereitstellung beteiligten Organsysteme bestimmt und daher auch als „Bruttokriterium“ der Ausdauerleistungsfähigkeit bezeichnet (Hollmann et al., 2000).

## 5.5 Screening

Alle Kandidaten im Alter von 18-40 Jahren, die an einer Studienteilnahme interessiert waren und denen im Rahmen einer sportmedizinischen Untersuchung ihre

Sporttauglichkeit attestiert worden war, durchliefen innerhalb von maximal 8 Tagen vor ihrer Teilnahme, spätestens am gleichen Morgen, das Screening. Dieses umfasste:

- Erfassung demographischer Daten wie Alter, Größe, Körpergewicht, BMI, Ethnität
- Überprüfung der fristgemäßen Teilnahme an einer sportmedizinischen Untersuchung (innerhalb von max. 3 Monaten), der Sporttauglichkeit sowie der $VO_2$max
- Befragung und Dokumentation von Begleiterkrankungen und –therapien innerhalb der letzten 3 Monate
- Abschließende Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien

## 5.6 Prüfmedikation

### 5.6.1 Herstellung und Umverpackung

Die Studienmedikation wurde von der Firma Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden, zur Verfügung gestellt. Die Tabletten wurden in Runddosen mit einem Stopfen aus Kunststoff, die insgesamt 50 Tabletten enthielten und in einer Pappbox umverpackt waren, bereitgestellt. Die Beschriftung der Dose sowie der Umverpackung wurde gemäß GCP-Verordnung entworfen.

### 5.6.2 Dosierung

An Tag 1 belief sich die Dosierung der Prüfmedikation (Traumeel®S bzw. Placebo) auf insgesamt 12 Tabletten. Dies entspricht der maximal zugelassenen Dosierung pro Tag bei akuten Zuständen gemäß der Neufassung der Dosierungsempfehlungen der Kommission D für homöopathische Arzneimittel des BfArM (Stand 17.03.2004). In den ersten 2 Stunden nach Belastungsbeendigung bzw. –abbruch wurden 8 Tabletten in einem Abstand von je 15 Minuten eingenommen. Weitere 2 Tabletten wurden 6 sowie 10 Stunden nach Belastungsbeendigung bzw. –abbruch eingenommen. Die letzte Einnahme von 2 Tabletten erfolgte vor dem abschließenden Besuch im Prüfzentrum am Morgen von Tag 2. Zwar lautet die Dosierungsempfehlung des BfArM (Kommission D) für akute Zustände, eine Tablette jede halbe Stunde einzunehmen, die hier vorliegende Studiendosierung von 8 Tabletten innerhalb von 2 Stunden wurde jedoch als gut tolerierbar erachtet, insbesondere bei gesunden Probanden.

### 5.6.3 Überwachung der Compliance

Die Einnahme der Prüfmedikation an Tag 1 wurde während der gesamten Anwesenheit des Probanden im Prüfzentrum überwacht. Während der Nachbelastungsphase wurde die Einnahme der ersten 8 Tabletten im Datenerhebungsbogen dokumentiert bevor der Proband das Prüfzentrum verließ. Die weiteren Tabletteneinnahmen fanden zu Hause bzw. außerhalb des Prüfzentrums statt

und wurden im Zuge des Abschlusstermins an Tag 2 evaluiert und wiederum im Datenerhebungsbogen erfasst. Sollten Tabletten verlorengegangen oder beschädigt worden sein, so wurde dies in den Datenerhebungsbögen dokumentiert.

## 5.7 Maskierung der Behandlungsgruppen

Die vorliegende klinische Prüfung wurde hinsichtlich der beiden Behandlungsgruppen Traumeel®S vs Placebo als Doppel-Blindstudie durchgeführt. Die Verblindung wurde durch identische Farbe, Geruch, Geschmack und Größe von Verum und Placebo gewährleistet. Die Generierung des Randomisierungsplans erfolgte durch die Firma Heel GmbH entsprechend den internen Standardvorgehensweisen. Weiterhin wurden dem Prüfzentrum vom Hersteller für jede Medikationsnummer ein verschlossenes Notfallkuvert mit der entsprechenden Kodierung zur Verfügung gestellt. Während der gesamten Studiendauer, d.h. bis zur finalen Schließung der Datenbank waren sowohl die Probanden als auch die Prüfärzte, das gesamte Studien- und Monitoring-Personal sowie die Statistiker hinsichtlich der Therapiegruppen verblindet. Erst nach schriftlicher Bestätigung über Schließung der Datenbank wurde der medizinischen Statistik vom Hersteller eine Demaskierungsliste zur Verfügung gestellt. Ausschließlich im Falle eines medizinischen Notfalls, wenn zugleich die Kenntnis über die Art der eingenommen Prüfmedikation als essentiell betrachtet wurde, war es erlaubt, die Verblindung im Einzelfall aufzuheben. Die Entscheidung darüber oblag dem Hauptprüfer und das Vorgehen wurde entsprechend in den Datenerhebungsbögen dokumentiert.

## 5.8 Regulatorisches

Die vorliegende klinische Studie entsprach hinsichtlich ihrer Organisation und Durchführung den Leitlinien und Vorgaben der ICH („International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“), der „guten klinischen Praxis“ (GCP-Verordnung) und dem deutschen Arzneimittelgesetz (AMG). Entsprechend wurde vorab sowohl eine Zulassung der lokalen Ethik-Kommission (AZ 44/09) als auch eine Genehmigung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (Vorlage-Nummer: 4035343), als zuständige Bundesoberbehörde, eingeholt. Weiterhin wurde die zuständige Behörde auf Landesebene (Regierungspräsidium Darmstadt) über die Durchführung dieser klinischen Studie informiert und diese in der EudraCT-Datenbank („European Database for Clinical Trials“) unter der Nummer 2009-010897-39 und dem Studiencode TEIR-1 („Effects of Traumeel®S Tablets on Exercise Induced Inflammatory Immune Response“) registriert. Der Studieneinschluss aller Teilnehmer geschah erst nach

umfassender Aufklärung, anschließender Bedenkzeit und schriftlicher Einwilligung. Zum Zwecke der Qualitätssicherung wurde ein unabhängiger Monitor vom Leiter dieser klinischen Studie für die Überwachung der gesamten Studientätigkeiten beauftragt. Dies umfasste hauptsächlich einen Einleitungsbesuch, 2 Routine-Monitoringbesuche sowie einen Abschlussbesuch mit Finalisierung aller Studiendokumente.

## 5.9 Studienmaßnahmen

### 5.9.1 Belastungsintervention

Die Belastungsintervention fand auf Spinningrädern des Typs Spinner®Elite der Firma StarTrac statt. Die Dauer wurde auf exakt 60 Minuten festgelegt, es sei denn der Proband musste aufgrund einer vorzeitigen Erschöpfung oder anderer Gründe abbrechen. Als Belastungsintensität wurde die entsprechende Herzfrequenz (HF) bei 80% der relativen $VO_2$max herangezogen. Die HF wurde mit Brustgurten des HR Monitoring Team Systems der Firma acentas™ erfasst und mit der dazugehörigen Software (Version „basic“) auf einem PC aufgezeichnet und ausgewertet. Die Software erlaubte weiterhin eine laufende Überwachung der aktuellen HF auf einem PC-Monitor sowohl durch das Studienpersonal als auch den Probanden selbst. Zur Steuerung der Belastungsintensität wurde der Proband aufgefordert, selbständig den Bremswiderstand zu modifizieren und eine Umdrehungszahl von 75 bis 85 Umdrehungen/Minute (U/min) einzuhalten.

***Abb. 5**: Der Versuchsleiter gibt den Probanden die letzten Anweisungen vor der 60-minütigen Belastungsintervention. a: Monitor zur Drehzahlanzeige, b: Stellschraube zur Einstellung des Bremswiderstandes, c: mechanische Bremse durch Druck des Bremsblockes auf die Schwungscheibe (gestellte Aufnahme der Firma HEEL vom 20.05.2010)*

Während der gesamten Belastungsdauer wurden die Probanden durch einen Arzt sowie weiteres Studienpersonal überwacht. Die durchschnittliche HF ($HF_{avg}$), die durchschnittliche Umdrehungszahl, die Dauer bis zum Belastungsabbruch und die Uhrzeit bei Abbruch wurden in den Datenerhebungsbögen dokumentiert.

### 5.9.2 Randomisierung

Die Randomisierung fand an Tag 1 unmittelbar vor Studieneinschluss statt und wurde durch Zuweisung der nächstniedrigen Medikations-Nummer vorgenommen, welche zugleich als Probanden-Identifikationsnummer diente. Der offizielle Studieneinschluss wurde durch die erste Blutabnahme zum Zeitpunkt 1 (prä) repräsentiert.

### 5.9.3 Blutabnahmen

Zu jedem Messzeitpunkt wurden insgesamt etwa 20 ml Blut per Safety-Multifly®-Adapter (Sarstedt) aus einer Antekubitalvene in liegender Position entnommen. Im Einzelnen wurde das Blut in dieser Reihenfolge portioniert:

- 1,0 ml sVBK (TruCulture®, EDI GMbH)
- 7,5 ml Li-Heparin (Sarstedt)
- 7,5 ml Serum-Gel (Sarstedt)
- 2.7 ml EDTA K (Sarstedt)
- 1,2 ml Serum Z (Sarstedt)

### 5.9.4 Schmerzfragebogen – SF-MPQ

Der MPQ (“McGill Pain Questionnaire”), auch bekannt als “McGill pain index“, ist ein Fragebogen zur Selbstbeurteilung des Schmerzes und wurde von den Herren Melzack und Torgerson 1971 an der McGill-Universität (Montreal, Kanada) entwickelt (Melzack, 1975). Der SF-MPQ („Short Form McGill Pain Questionnaire“) ist die Kurzfassung des MPQ und wurde aus Gründen der Praktikabilität entwickelt (Melzack, 1987). Der in dieser Studie eingesetzte SF-MPQ entspricht der überarbeiteten Version von Tal Akabi und Oesch (Oesch, 2007), welche auf der validierten Übersetzung des MPQ aus dem Englischen für die Schweiz basiert (Radvila et al., 1987). Der SF-MPQ besteht aus insgesamt 4 Subskalen. Dazu gehört die Beurteilung der affektiven und sensorischen Komponente des Schmerzes anhand von 11 bzw. 4 Adjektiven, denen eine Zahl von 0 (=wird nicht empfunden) bis 3 (=wird stark empfunden) zugeordnet werden muss, eine visuelle Analogskala von 0 bis 100 und eine Likert-Skala von 0 bis 5. Zur Auswertung wird die Summe der 4 Subskalen berechnet. Es ist eine Maximalpunktzahl von 150 möglich. Die Test-Retest-Reliabilität des MPQ wird für alle Subskalen mit gut bis sehr gut angegeben (Intraklassen-Korrelationskoeffizient von 0,75 bis 0,96). Widersprüchliche Untersuchungsergebnisse liegen allerdings hinsichtlich der

diskrimierenden Validität zwischen verschiedenen Schmerztypen vor, weshalb die Verwendung der Gesamtpunktzahl empfohlen wird und diese hauptsächlich als Verlaufsparameter in Frage kommt (Dubuisson und Melzack, 1976; Turk et al., 1985). Die Probanden wurden angewiesen ausschließlich die aktuellen Empfindungen ihrer unteren Extremitäten für ihre Beurteilung zu berücksichtigen (Hinweis: „von der Hüfte abwärts“). Hierbei war es außerdem gestattet, zwischen sitzender und stehender Position zu wechseln und kurzzeitig bis etwa 90° Kniegelenkswinkeln in die Hocke zu gehen, um auf diese Weise kurzfristig die Zielmuskulatur zu beanspruchen und somit sensitivere Empfindung zu ermöglichen.

### 5.9.5 Maximalkraftmessung

Zur Messung der Maximalkraft der Knieextensoren (*M. quadriceps femoris*) und der ischiocruralen Muskulatur (*M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*) wurde das Testgerät m3+ Diagnos der Firma Schnell Trainingsgeräte GmbH (Peutenhausen) eingesetzt. Das m3+ Diagnos erlaubt dank der flexiblen Anbringung verschiedener Steckelemente wie z.B. Sitzen und Polstern sowie der flexiblen Einstellung (360°) von Last- und Trainingsarm einen multifunktionalen Einsatz in den Bereichen Krafttraining und -testung. Der Lastarm ist hierbei an einen Zug-, Druck- und Kraftaufnehmer gekoppelt, welcher die Daten an eine Analysesoftware (Diagnos Professional V1.0) übermittelt. Die Testung der Maximalkraft entsprach einer isometrischen Maximalkraftmessung und wurde als Drehmoment in Newtonmeter (Nm) angegeben. Hierzu nahmen die Probanden bei jeder Messung wie im Folgenden beschrieben standardisierte Positionen auf dem Gerät ein. Sie wurden aufgefordert mit maximal möglicher Kraft Druck gegen das Polster auszuüben während sie vom Versuchsleiter durch Zuruf zusätzlich motiviert wurden. Nachdem das Gerät durch den Versuchsleiter kalibriert worden war, wurde dem Probanden signalisiert, dass das System messbereit sei. Der Beginn der Kraftentfaltung wurde vom Probanden, ohne ein Startsignal abwarten zu müssen, frei gewählt. Jede Messung dauerte exakt 5 Sekunden und wurde mit einem Abstand von 30 Sekunden jeweils einmal wiederholt. Der beste Versuch wurde für die Datenauswertung herangezogen.

#### *5.9.5.1 Knieextension*

Die Messung der Maximalkraft der Kniestreckermuskulatur erfolgte sitzend mit 90° Hüftgelenkswinkel auf einer Sitzfläche mit gepolsterter Rückenlehne, die am Messgerät angebracht war. Um Hilfs- oder Ausweichbewegungen zu verhindern, wurden die Probanden mit einem integrierten Gurt an den Sitz fixiert und zusätzlich angewiesen die Arme vor der Brust zu verschränken. Zur Kraftmessung wurde das Gerät so eingestellt, dass die Drehachse des Trainingsarms mit der Drehachse des Kniegelenks

übereinstimmte und die Polsterrolle in 150°-Stellung (auf die Maschine bezogene Neutral-Null-Methode) oberhalb der Malleolengabel lag. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Beine etwa hüftbreit auseinander lagen, die Zehenspitzen während der Messung angezogen wurden sowie eine aufrechte Sitzposition bewahrt wurde.

***Abb. 6**: Versuchsaufbau bei einer Messung der Knieextensoren. (gestellte Aufnahme der Firma HEEL vom 20.05.2010)*

#### *5.9.5.2 Knieflexion*

Die Messung der Maximalkraft der Knieflexoren erfolgte in Bauchlage. Der Trainingsarm befand sich in 60°-Stellung (auf die Maschine bezogene Neutral-Null-Methode) in Übereinstimmung mit der Drehachse des Kniegelenks, und das Polster wurde oberhalb des oberen Sprunggelenks angebracht.

## 5.10 Laborchemische Untersuchungen

An der Analyse der laborchemischen Parameter waren insgesamt 4 verschiedene Labore beteiligt. Neben der Abteilung für Sportmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen waren zusätzlich die Labore der Firmen Synlab Medizinisches Versorgungszentrum GmbH (Kassel), Myriad RBM (Austin, Texas) und EDI GmbH (Reutlingen) für die Analyse unterschiedlicher Zielgrößen verantwortlich. Die Befunde von Synlab wurden sowohl elektronisch im LDT-Dateiformat per DFÜ (Datenfernübertragung) mit der Software iLabClient (Vers. 2.94) als auch schriftlich per Kurier dem Prüfzentrum zur Verfügung gestellt. Die Befundübermittlung aus den USA und von EDI GmbH erfolgte per E-Mail als passwortgeschützte Excel-Datei. Alle gemessenen Zielgrößen wurden laufend von den Prüfärzten hinsichtlich ihrer klinischen Auffälligkeit bewertet und dies auf den Befunden abgezeichnet. Tabelle 4

bietet eine Übersicht aller beteiligten Labore, der untersuchten Parameter und den dabei verwendeten Probenmaterialien und Messprinzipien.

***Tab. 4**: Tabellarische Übersicht der beteiligten Labore, den gemessenen Analyten und der dabei angewendeten Messprinzipien*

| ***Zielgröße*** | ***Labor (Standort)*** | ***Proben-material bzw. -gewinnung*** | ***Messprinzip (Gerätename und/oder Hersteller)*** |
|---|---|---|---|
| *hsCRP* | *Synlab (Kassel)* | *Serum* | *Partikelverstärkter immunologischer Trübungstest (Cobas c502, Roche)* |
| *CK, LDH* | *Synlab (Kassel)* | *Serum* | *IFCC vers.2 UV-Test (Cobas c701, Roche)* |
| *Lymphozyten, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten* | *Synlab (Kassel)* | *Kalium-EDTA-Blut* | *Optoelektronisch (XE2100, Sysmex)* |
| *Annexin V, CD62, CD69, CD95R, CD95L* | *Labor der Abteilung für Sportmedizin der JLU Gießen* | *Lithium-Heparin-Blut + Ficoll-Lymphozyten Isolation* | *Durchfluss-zytometrie (COULTER® EPICS XL-MCL, Beckman-Coulter)* |
| *IL-1ra, IL-1β, IL-6, CCL2, CXCL8, TNF-α* | *Myriad RBM (Austin, Texas)* | *Serum* | *Multiplex-ELISA (Luminex xMAP)* |
| *IL-1ra, IL-1β, IL-6, CCL2, CXCL8, TNF-α GM-CSF, IFN-γ, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CCL3, CCL4, SCF, TNF-β* | *Myriad RBM (Austin, Texas)* | *Überstände stimulierter Vollblutkulturen* | *Multiplex-ELISA (Luminex xMAP)* |

## 5.10.1 Messung der Lymphozytenaktivierung und -apoptose

### *5.10.1.1 Lymphozytenisolierung*

Die Isolierung von Lymphozyten erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation aus 7,5 ml heparinisiertem Vollblut. Vor Beginn der Isolierung wurden die benötigten Puffer mit HCl und/oder NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das heparinisierte Blut in ein Spitzröhrchen (15 ml) überführt und mit 3 ml TRIS-BSS-Puffer gemischt. In zwei weitere Spitzröhrchen (15 ml) wurden jeweils 3 ml Biocoll vorgelegt, woraufhin die gleichmäßige Verteilung des Blut-Puffer-Gemisches in beide Röhrchen erfolgte. Dies geschah durch vorsichtige Überschichtung, um eine Durchmischung der Phasen zu vermeiden und damit den Biocoll-Gradienten zu erhalten. Anschließend erfolgte die erste Zentrifugation beider Spitzröhrchen für 20 min, mit einer Zentrifugalkraft von 654 *g* (2000 U/min), geringster Beschleunigung und ohne aktive Bremse (1/0) bei 8℃. Durch die Auftrennung der Blutbestandteile ergaben sich vier Phasen. Nun wurden die Lymphozytenringe mit Hilfe einer Mikropipette entnommen, zusammen in ein Spitzröhrchen (15 ml) überführt und mit TRIS-BSS auf 10 ml aufgefüllt. Zur Waschung der Lymphozyten erfolgte nun eine weitere Zentrifugation mit folgenden Einstellungen: 10 min bei 654 *g* (2000 U/min), Beschleunigung/Bremse (4/4), 8℃. Anschließend wurde der Überstand der zentrifugierten Spitzröhrchen verworfen und es erfolgte eine zweite Waschung der Lymphozyten mit den gleichen Einstellungen wie bei Waschgang Nr.1.

### *5.10.1.2 Antikörperbeladung*

Nach dem zweiten Waschgang wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 500 µl Bindungspuffer resuspendiert. Je 100 µl dieser Suspension wurden anschließend auf 5 Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt und mit den jeweiligen Antikörpern versehen. Nun wurden die Antikörper mit der Zellsuspension mit Hilfe eines Vortexers vermischt und für eine 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Dunkelheit gelagert. Im Anschluss erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min, mit den Einstellungen: 156 *g* (1200 U/min), Beschleunigung und Bremse (2/2), 20℃. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das Pellet in 100 µl TRIS-BSS resuspendiert. Schließlich erfolgte ohne zeitliche Verzögerung die Messung am Durchflusszytometer.

### *5.10.1.3 Durchflusszytometrie*

Die isolierten und mit Antikörper beladenen Lymphozyten wurden mittels des FSC (englisch: „Forward-Scatter“) und SSC (englisch: „Sideward-Scatter“) mit einer Reinheit von ca. 95% gegatet. Anhand einer Einfarbmessung wurden die für den jeweiligen

Marker positiven oder negativen Zellen im FL-1 (Fluoreszenz 1) Kanal für die FITC markierten Antikörper bzw. im FL-2 Kanal für die PE markierten Antikörper quantifiziert (Beckman Coulter EPICS XL).

#### *5.10.1.4 Puffer und Antikörper*

***Tab. 5**: Übersicht aller verwendeter Chemikalien, Puffer und Antikörper*

| ***Bezeichnung*** | ***Bestandteile/Spezifikation*** |
|---|---|
| *Bindungspuffer* | *HEPES (2,38 g/l)*<br>*NaCl (8,18 g/l)*<br>*$CaCl_2$ (0,277 g/l)* |
| *Biocoll* | *enthält Ficoll 400, hydrophiles Polymer mit einem Molekülgewicht von etwa 400 000 Dalton; Dichte 1,077 g/m* |
| *TRIS-BSS Puffer* | *NaCl (6,9 g/l)*<br>*KCl (0,4 g/l)*<br>*HEPES (2,383 g/l)*<br>*$Na_2HPO_4$ (0,0568 g/l)*<br>*$KH_2PO_4$ (0,06 g/l)*<br>*Glucose (1,0 g/l)* |
| *Annexin V* | *FITC-konjugiert* |
| *Anti-human CD62L* | *FITC-konjugiert*<br>*Klon: LT-TD180* |
| *Anti-human CD69* | *FITC-konjugiert*<br>*Klon: FN50* |
| *Anti-human CD95R* | *FITC-konjugiert*<br>*Klon: LT95* |
| *Anti-human CD95L* | *PE-konjugiert*<br>*Klon: NOK-1* |

### 5.10.2 Großes Blutbild

Nachdem im Prüfzentrum das Blut in EDTA K Monovetten (2,7 ml, Sarstedt) abgenommen worden war, wurden die Proben per Kurier zu Synlab übermittelt. Die Bestimmung des großen Blutbildes erfolgte nach dem optoelektronischen Messprinzip an einem XE2100 der Firma Sysmex.

### 5.10.3 hsCRP

Die Bestimmung von hsCRP wurde ebenfalls bei Synlab unter Verwendung eines partikelverstärkten immunologischen Trübungstests am Cobas c502 der Firma Roche durchgeführt. Der Messbereich wird vom Hersteller mit 0,3-350 mg/l angegeben. Als Probenmaterial diente ebenfalls EDTA K-Blut.

### 5.10.4 Muskelschadenmarker

Die Aktivitätsbestimmungen von CK und LDH aus dem Serum (Serum Z Monovetten, 1,2 ml, Sarstedt) erfolgten bei Synlab per UV-Test am Cobas c701 der Firma Roche. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 3 U/l respektive 5 U/l.

### 5.10.5 Zytokinbestimmung

Insgesamt 25 Zytokine wurden per Multiplex-ELISA in sVBK gemessen. Sechs dieser Zytokine (CCL2, CXCL8, IL-1ra, IL-1β, IL-6, TNF-α) wurden außerdem per Multiplex-ELISA in Serum-Proben gemessen, was zugleich die Grundlage des methodischen Studienabschnitts A darstellte. Wiederum zwei dieser Zytokine (IL-1β und IL-6) wurden zusätzlich per hoch-sensitiven ELISA bestimmt, da die Detektionsrate im Serum per Mulitplex unter 50% betrug. Der Versand aller Proben zur Zytokinbestimmung zu den jeweiligen Laboren erfolgte auf Trockeneis.

#### *5.10.5.1 Stimulierte Vollblutkulturen*

Um stets ein standardisiertes Volumen im Kulturgefäß gewährleisten zu können wurde zunächst eine Neutral-Monovette benutzt, welche dem Zweck diente, den Butterfly-Schlauch komplett mit Blut zu füllen (Abb. 7a). Zur Durchführung der Vollblutkulturen wurden 1,0 ml Vollblut per Safety-Multifly®-Adapter (Sarstedt) in Spritzenzylinder („TruCulture“ der Firma EDI GmbH) entnommen, die zugleich als Abnahme- und Kulturgefäß dienten. Letztere waren mit einem speziellen Kulturmedium (auf der Basis von RPMI 1640) gefüllt, welches sowohl Heparin als auch die Stimulantien Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* Serotyp O55:B5) und *Staphylococcus Enterotoxin* B (SEB, Enterotoxin des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus*) in der Konzentration 0,1 µg/ml enthielt.

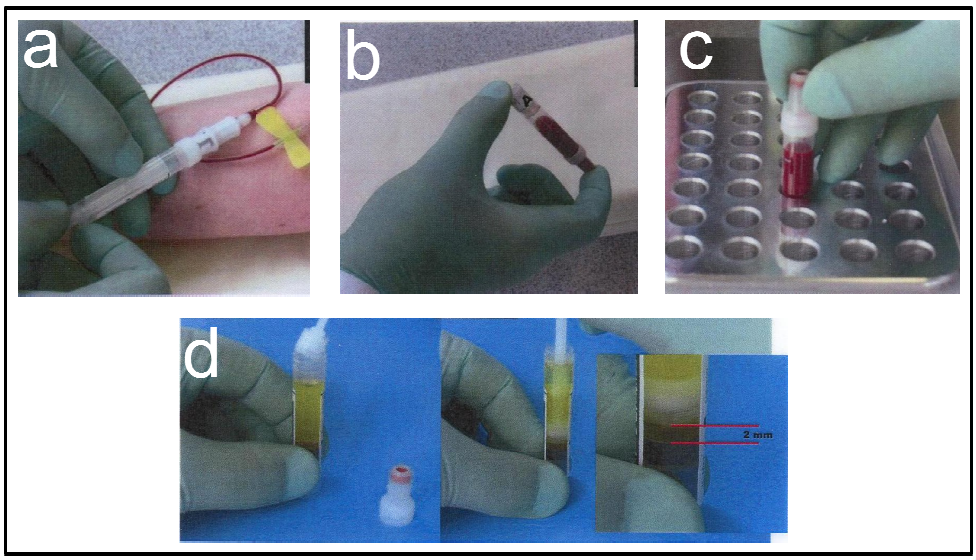



***Abb.7 a-d**: Chronologische Abfolge der schrittweisen Gewinnung des Zellkulturüberstandes (modifiziert nach: Gebrauchsanweisung für Durchführung der Kultur „TruCulture“, EDI GmbH)*

Nach vorsichtiger Vermengung des Blutes mit dem Kulturmedium (Abb. 7b) wurden die Kulturgefäße für genau 24 Stunden in einem Blockthermostat (VLM GMbH) bei 37℃ inkubiert (Abb. 7c). Nach Ablauf der Kulturdauer wurden die Kulturen durch Einführen eines Ventilkolbens, welcher das Sediment (Zellen) vom Überstand hermetisch separiert, beendet (Abb. 7d). Anschließend wurden alle Proben ohne Verzögerung bei -80℃ tiefgefroren.

### *5.10.5.2 Multiplex ELISA*

Die Messung von 25 Zytokinen erfolgte nach dem Prinzip eines Multiplex-ELISA bei der Firma Myriad RBM (Austin, Texas). Grundlage dieser Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, sogenannter Mikrosphären oder Beads, die analog zu ELISA als Festphase für biochemische Nachweisreaktionen dienen. Durch die Verwendung verschiedener Beads, die sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden und jeweils ein spezifisches Nachweisreagenz auf sich tragen, können in einem geringen Probenvolumen viele verschiedene Analyte simultan gemessen werden. Die Analyse erfolgt schließlich nach dem durchflusszytometrischen Prinzip.

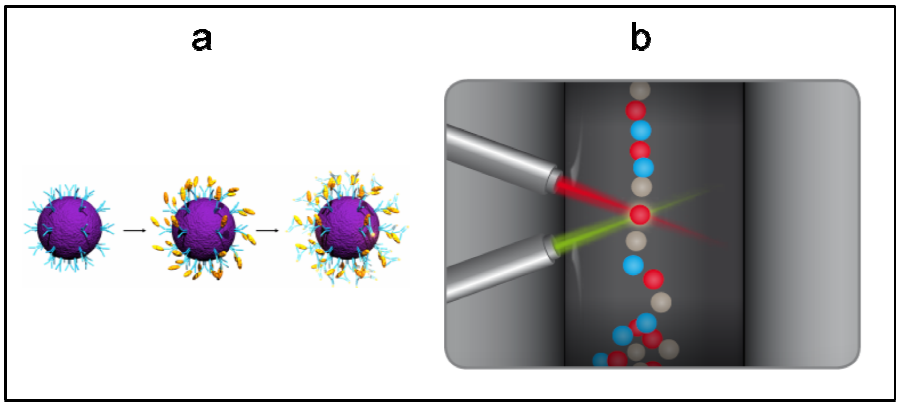



***Abb. 8**: Schematische Darstellung eines Multiplex-Verfahrens unter Verwendung von Mikrosphären (a, links: capture-Antikörper ist auf die Oberfläche der Mikrosphäre konjugiert. Mitte: der capture-Antikörper reagiert spezifisch mit dem Antigen. Rechts: der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Detektionsantikörper bindet mengenproportional zu dem gebundenen Antigen) und der Analyse der Mikrosphären nach dem durchflusszytometrischen Prinzip (b). Entnommen aus: „Whitepaper" der Firma Myriad RBM*

Die Analysen der Firma Myriad RBM sind CLIA („Clinical Laboratory Improvement Amendments") zertifiziert. Alle Multiplex-Verfahren werden für die Qualitätsparameter Sensitivität, dynamischer Bereich, Linearität, Kreuzreaktivität und Präzision validiert. Für jeden Analyten wird antikörperchargenspezifisch eine sogenannte Leerwertgrenze bestimmt. Die Leerwertgrenze wird definiert als der durchschnittliche Wert für 20 Messungen von analytfreien Proben plus 3 Standardabweichungen. In Tab. 6 ist die untere Leerwertgrenze des Multiplex-ELISA aller, für diese Arbeit relevanten, Zytokine aufgeführt.

***Tab. 6**: Leerwertgrenze des Multiplex-ELISA aller für diese Studie relevanten Zytokine*

| *Zytokin* | *Einheit* | *Leerwertgrenze* |
|---|---|---|
| *CCL2* | *pg/ml* | *52* |
| *CCL3* | *pg/ml* | *13* |
| *CCL4* | *pg/ml* | *38* |
| *CXCL8* | *pg/ml* | *3,5* |
| *GM-CSF* | *pg/ml* | *57* |
| *IFN-γ* | *pg/ml* | *1,9* |
| *IL-10* | *pg/ml* | *15* |
| *IL-12p40* | *ng/ml* | *1,2* |
| *IL-12p70* | *pg/ml* | *94* |
| *IL-13* | *pg/ml* | *57* |
| *IL-15* | *ng/ml* | *1,3* |
| *IL-17* | *pg/ml* | *6,6* |
| *IL-18* | *pg/ml* | *54* |
| *IL-1α* | *ng/ml* | *0,16* |
| *IL-1β* | *pg/ml* | *1,5* |
| *IL-2* | *pg/ml* | *60* |
| *IL-23* | *ng/ml* | *0,82* |
| *IL-3* | *ng/ml* | *0,17* |
| *IL-4* | *pg/ml* | *104* |
| *IL-5* | *pg/ml* | *33* |
| *IL-6* | *pg/ml* | *12* |
| *IL-7* | *pg/ml* | *53* |
| *SCF* | *pg/ml* | *56* |
| *TNF-α* | *pg/ml* | *4,0* |
| *TNF-β* | *pg/ml* | *46* |

#### *5.10.5.3 Hochsensitives ELISA*

Die Detektionsrate von IL-1β und IL-6 per Multiplex lag unter 50%. Daher wurde zusätzlich ein hochsensitives ELISA (Kits von eBioscience) durch die Firma EDI GmbH (Reutlingen) durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze für IL-1β und IL-6 wird vom Hersteller mit 0,05 pg x $ml^{-1}$and 0,03 pg x $ml^{-1}$ angegeben.

### 5.10.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

***Tab. 7**: Auflistung aller im Prüfzentrum verwendeter Laborgeräte und -verbrauchsmaterialien und deren Hersteller*

| ***Bezeichnung (Typ/Modell)*** | ***Hersteller*** |
|---|---|
| *Durchflusszytometer (COULTER® EPICS XL-MCL)* | *Beckman-Coulter* |
| *Laborwaage (ABT Analysenwaage)* | *Kern & Sohn GmbH* |
| *Metallblock-Thermostat (Typ HP-2V-130-K1R)* | *VLM GmbH* |
| *Mikropipetten* | *Eppendorf* |
| *pH –Meter (WINLAB® DATA LINE)* | *Windaus-Labortechnik* |
| *Tiefkühlschrank (HS5586 -60℃ bis -86℃)* | *Hettich* |
| *Vortex Schüttler* | *VWR* |
| *Zentrifuge (Universal 320R)* | *Hettich* |
| *EDTA K Monovetten (2,7 ml)* | *Sarstedt* |
| *ILCS® (Kulturgefäße mit Medium und LPS/SE-B)* | *EDI GmbH* |
| *Kanüle/ Adapter (Safety-Multifly®-Set , 0,9 x 19 mm)* | *Sarstedt* |
| *Lithium-Heparin Monovetten (7,5 ml)* | *Sarstedt* |
| *Neutral Monovette (2,7 ml)* | *Sarstedt* |
| *Pipettenspitzen* | *Eppendorf* |
| *Reagenz- und Zentrifugenröhre (15 ml und 50 ml)* | *Sarstedt* |
| *Reaktionsgefäße (Safe-lock Tubes)* | *Eppendorf* |
| *Reiningungsflüssigkeit Durchflusszytometer (Cleanse)* | *Beckman-Coulter* |
| *Serum-Gel Monovetten (9 ml)* | *Sarstedt* |
| *Serum Z Monovetten (1,2 ml)* | *Sarstedt* |
| *Systemflüssigkeit Durchflusszytometer (Sheath)* | *Beckman-Coulter* |

## 5.11 Statistik

### 5.11.1 Studienabschnitt A

Im Rahmen des methodischen Studienabschnitts A wurden die Kinetiken von ausgewählten pro-, anti- und inflammationsregulierenden Zytokinen im Serum und sVBK nach einer intensiven Fahrradbelastung explorativ untersucht. Zur deskriptiven Auswertung der Zytokinkonzentrationen wurden In Abhängigkeit der Datenverteilung der Median (Med) ± Interquartilsabstand (IQ) oder Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STABW) angegeben. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Zytokinkinetiken in Seren und Kulturen zu ermöglichen, wurden zu jedem Nachbelastungszeitpunkt relative Konzentrationsveränderungen durch Division mit dem Vorbelastungszeitpunkt berechnet. Weiterhin wurden auf die Monozytenzahl normierte Zytokinkonzentrationen ermittelt (pg x $1000^{-1}$ Monozyten). Zur explorativen Analyse wurde ein Friedmann-Test für Messwiederholungen sowie ein post hoc Test nach Bonferroni-Holm durchgeführt. Bei Verletzung der Sphärizität wurde eine Korrektur nach Greenhouse-Geisser vorgenommen. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Zytokinen in sVBK und im Serum wurde die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson angewendet. Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten r erfolgte nach Brosius (1998, Tab. 8).

***Tab. 8**: Interpretation des Korrelationskoeffizienten r (Brosius, 1998)*

| | |
|---|---|
| *0 < r ≤ 0,2* | *Sehr schwache Korrelation* |
| *0,2 < r ≤ 0,4* | *Schwache Korrelation* |
| *0,4 < r ≤ 0,6* | *Mittlere Korrelation* |
| *0,6 < r ≤ 0,8* | *Starke Korrelation* |
| *0,8 < r < 1,0* | *Sehr starke Korrelation* |
| *1* | *Perfekte Korrelation* |

Alle Auswertungen erfolgten mit der Software IBM® SPSS® Statistics for MS-Windows Version 19.0.0 (Statistical Package for the Social Sciences) und Microsoft-Excel (2007). Die Erstellung von Abbildungen erfolgte mit Graph Pad Prism für Windows (Version 5.01).

### 5.11.2 Studienabschnitt B

Die Analyse aller Haupt- und Nebenzielgrößen erfolgte nach dem Intention-to-Treat Prinzip, hierbei gehen alle Probanden entsprechend ihrer Randomisierung in die Analyse ein, unabhängig davon, was nach der Randomisierung tatsächlich mit ihnen passiert. In einem ersten Schritt wurden die Gruppen hinsichtlich ihrer demographischen Daten sowie aller Zielgrößen zum Vorbelastungszeitpunkt per Wilcoxon-Test und exakten Test von Fisher auf Strukturgleichheit überprüft. Des Weiteren fand vor der Durchführung statistischer Tests eine Rohdatenbereinigung statt, da einige Zielgrößen, insbesondere Zytokine, unter- oder oberhalb der jeweiligen Nachweisgrenzen lagen. Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze wurden durch die Hälfte des kleinsten gemessenen Wertes des jeweiligen Assays ersetzt. Messwerte oberhalb des messbaren Bereichs wurden durch den höchsten messbaren Wert ersetzt. Fehlende Werte wurden nach der Methode „last observation carried forward“ durch den letzten Messwert fortgeschrieben.

Zur Überprüfung von $H_0$ wurde ein Wilcoxon-Test der „area under the curve with respect to the increase” ($AUC_I$) durchgeführt. Die $AUC_I$ wird als die Fläche unter der Kurve über der baseline minus der Fläche über der Kurve unter der baseline definiert (Pruessner et al., 2003) und wurde zwischen ZP post bis 24h unter Verwendung der Trapez-Regel bestimmt. Sie stellt somit einen Index der Veränderung, unter Berücksichtigung sowohl über Ausgangsniveau ansteigender als auch unter Ausgangsniveau abfallender Werte, dar. Eine beispielhafte Darstellung von unterschiedlichen fiktiven Verläufen von Cortisol und daraus resultierender Werte der $AUC_I$ ist in Abb. 9 zu sehen.

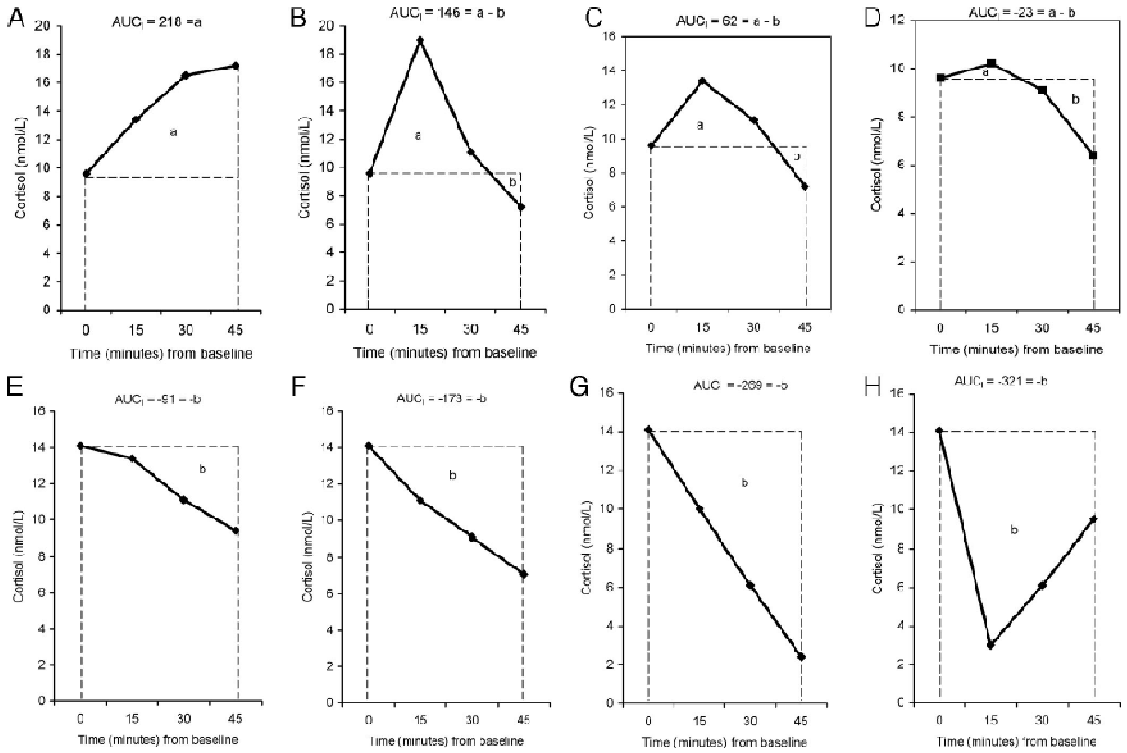



***Abb. 9**: Verschiedene fiktive Kinetiken von Cortisol und die jeweils daraus resultierende $AUC_I$. Aus: (Fekedulegn et al., 2007), S. 655).*

Die Verwendung der $AUC_I$ hat zum Vorteil, dass die unterschiedlich großen zeitlichen Abstände zwischen den Messzeitpunkten im Gegensatz zu linearen Modellen berücksichtigt werden können und durch die Generierung einer einzigen Variablen aus wiederholten Messwerten, Tests mit größerer Power zur Anwendung kommen können (Pruessner et al., 2003). Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Um den eventuellen Einfluss von Baseline-Werten und/oder des Assays auf die Zielgrößen ausschließen zu können wurde zu explorativen Zwecken zusätzlich eine zweifaktorielle (Zeitpunkt*Gruppe) univariate Varianzanalyse (ANOVA) für Messwertwiederholungen eingesetzt und diese um eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) erweitert. Nach Durchführung der ANCOVA wurden die Residuen auf Normalverteilung überprüft. Falls die Anwendungsvoraussetzungen nicht erfüllt waren und auch nach Transformation keine Normalverteilung vorlag, wurde auf die Durchführung einer ANCOVA verzichtet. Neben der Überprüfung von $H_{0,}$ wurden der Vergleich der $AUC_I$ und die ANCOVA zur explorativen Analyse aller Nebenzielgrößen eingesetzt.

In Abhängigkeit der Datenverteilung wurden als Maß der zentralen Tendenz und Dispersionsmaß der Median (Med) ± Interquartilsabstand (IQ) oder Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (STABW) angegeben. Zur weiteren deskriptiven Auswertung aller Zielgrößen wurden relative Veränderungen in Prozent des Vorbelastungswertes (%), Anzahl der Beobachtungen (N), Minima (Min) und Maxima (Max) sowie unteres

Quartil (Q1) und oberes Quartil (Q2) berechnet. Zur graphischen Darstellung aller Zielgrößen wurden Box-Whisker-Plots (Sofern die Whisker nicht Min und Max repräsentieren ist dies gekennzeichnet) erstellt. Alle Auswertungen erfolgten mit der Software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institut, Cary, NC) und Microsoft-Excel (2007). Die Erstellung von Abbildungen erfolgte mit Graph Pad Prism für Windows (Version 5.01).

# 6 Ergebnisse

## 6.1 Studienverlauf

In Abb. 10 ist der Verlauf der Studie unter Differenzierung der Phasen Aufnahme, Zuordnung, Nachbeobachtung und Datenanalyse beider Studienabschnitte dargestellt.

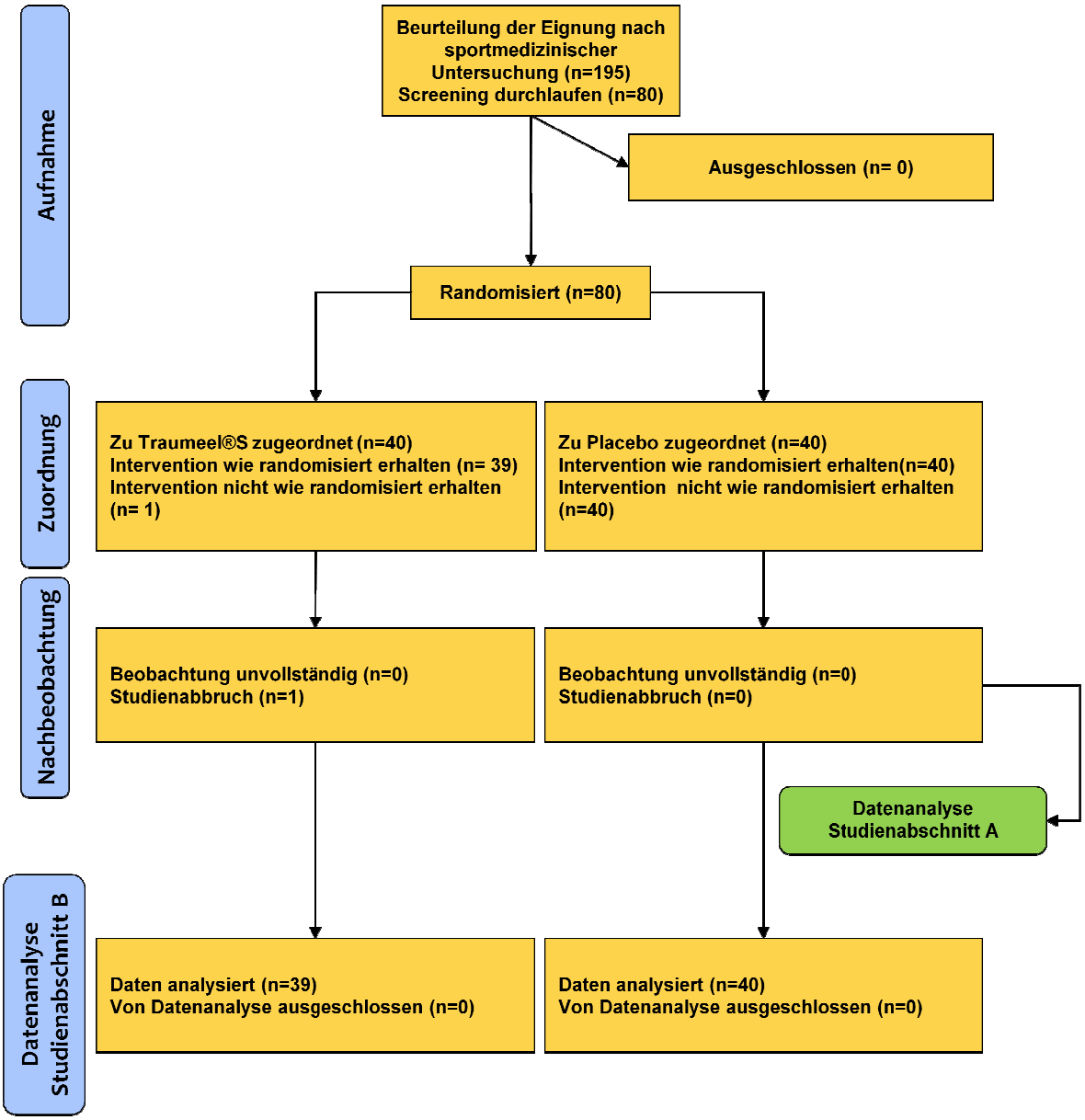



***Abb. 10**:Flussdiagramm der Probandenrekrutierung (Aufnahme, Zuordnung, Nachbeobachtung und Datenanalyse)*

## 6.2 Stichprobe

In Tab. 9 sind die demographischen Charakteristika Alter, Größe, Gewicht, BMI sowie die $VO_2$max und die entsprechende HF bei 80% der $VO_2$max für beide Behandlungsgruppen und die Ergebnisse des Tests auf Strukturgleichheit dargestellt.

***Tab. 9**: Deskriptive Auswertung und Test auf Strukturgleichheit zum ZP prä der demographischen Charakteristika der Stichprobe getrennt nach Behandlungsgruppe Placebo (P) und Traumeel (T). Dargestellt sind: Minimum (Min), unteres Quartil (1.Q), Median (Med), oberes Quartil (3.Q), Maximum (Max), Mittelwert (MW) , Standardabweichung (STABW), p-Wert des Wilcoxon-Tests auf Strukturgleichheit (p Wilcoxon)*

| Gruppe | Min | 1. Q | Med | 3. Q | Max | MW | STABW | p Wilcoxon |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Alter [Jahre]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *20* | *22,0* | *25,0* | *27,5* | *37* | *25,5* | *4,3* | *0.6291* |
| ***T*** | *18* | *22,0* | *26,0* | *28,0* | *39* | *25,6* | *4,3* | |
| ***Größe [cm]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *164* | *175,5* | *181,0* | *186,0* | *196* | *181,0* | *7,2* | *0.2347* |
| ***T*** | *166* | *175,0* | *180,0* | *184,0* | *193* | *179,2* | *6,5* | |
| ***Gewicht [kg]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *63,5* | *73,6* | *79,8* | *83,4* | *93,5* | *78,5* | *7,2* | *0.1480* |
| ***T*** | *56,5* | *70,0* | *77,0* | *83,0* | *89,5* | *75,5* | *8,5* | |
| ***Body-Mass-Index [kg/m$^2$]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *18.9* | *22,6* | *24,5* | *25,8* | *27,4* | *24,0* | *2,2* | *0.2941* |
| ***T*** | *19.4* | *22,4* | *23,4* | *24,7* | *27,3* | *23,5* | *2,2* | |
| ***$VO_2$max[ml/kg*min]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *38,0* | *45,0* | *46,8* | *50,4* | *52,9* | *46,9* | *4,1* | *0.8483* |
| ***T*** | *32,8* | *43,7* | *48,4* | *50,4* | *52,9* | *46,3* | *5,5* | |
| ***HF bei 80%$VO_2$max [S/min]*** | | | | | | | | |
| ***P*** | *137* | *157,0* | *166,5* | *174,0* | *185* | *164,5* | *11,6* | *0.6065* |
| ***T*** | *129* | *157,0* | *168,0* | *177,0* | *192* | *166,0* | *13,8* | |

## 6.3 Ergebnisse Studienabschnitt A

### 6.3.1 Detektionsrate und Korrelationsanalysen

In Tab. 10 ist die Detektionsrate der sechs Zytokine getrennt nach sVBK und Seren aufgeführt. In sVBK wurde eine Detektionsrate von 100% aller 6 Zytokine erzielt. Die Detektionsrate von IL-1ra (Serum) lag vor Belastung bei 93% und in der Nachbelastungsphase zwischen 88-98%. Die Detektionsrate von TNF-α (Serum) lag vor Belastung bei 90% und in der Nachbelastungsphase zwischen 85-90%. Die Detektionsrate von CCL2 (Serum) lag zu allen ZP bei 100%. Die Detektionsrate von CXCL8 (Serum) lag vor Belastung bei 95% und in der Nachbelastungsphase zwischen 95-98%. Die Detektionsrate von IL-1β und von IL-6 lag jeweils unter 50%, im Fall von IL-1β sogar unter 2% (beides nicht dargestellt), weshalb zusätzlich ein hsELISA angewendet wurde. Hierdurch wurde eine Detektionsrate von IL-1β (Serum) von immerhin 35% vor Belastung und von 35-45% in der Nachbelastungsphase erzielt. Die Detektionsrate von IL-6 (Serum) lag vor Belastung bei 95% und in der Nachbelastungsphase zwischen 95-100%.

***Tab. 10**: Detektionsrate der sechs gemessenen Zytokine in sVBK und Seren (S) in Prozent aller gemessenen Proben. #hier wurde ein hochsensitives ELISA anstatt des Multiplex ELISA angewendet*

| | ***Detektionsrate [%]*** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***IL-1ra*** | | ***IL-1β*** | | ***IL-6*** | | ***TNF-α*** | | ***CCL2*** | | ***CXCL8*** | |
| | *sVBK* | *S* | *sVBK* | *S#* | *sVBK* | *S#* | *sVBK* | *S* | *sVBK* | *S* | *sVBK* | *S* |
| *prä* | *100* | *93* | *100* | *35* | *100* | *95* | *100* | *90* | *100* | *100* | *100* | *95* |
| *post* | *100* | *93* | *100* | *35* | *100* | *100* | *100* | *90* | *100* | *100* | *100* | *98* |
| *1h* | *100* | *95* | *100* | *40* | *100* | *95* | *100* | *85* | *100* | *100* | *100* | *95* |
| *3h* | *100* | *98* | *100* | *40* | *100* | *98* | *100* | *85* | *100* | *100* | *100* | *95* |
| *24h* | *100* | *88* | *100* | *45* | *100* | *98* | *100* | *85* | *100* | *100* | *100* | *98* |
| *MW* | *100* | *93* | *100* | *39* | *100* | *97* | *100* | *87* | *100* | *100* | *100* | *96* |

Sowohl die IL-6 als auch IL-1ra Konzentrationen wiesen zwischen sVBK und Seren sehr schwache bis schwache lineare Zusammenhänge auf ($p>0,05$, Tab. 11). Die Korrelationskoeffizienten für IL-1β (sVBK und Serum) fielen schwach (prä, 1h, 3h und 24h) bis mittel positiv (post) und nicht statistisch auffällig aus (Tab. 11). Zwischen der TNF-α Konzentration im Serum und sVBK wurde ein sehr schwacher (3h und 24h) bis

schwacher (prä, post und 1h) negativer Zusammenhang ermittelt (alle p>0,05, Tab. 11). CXCL8 wies zu allen Zeitpunkten einen sehr schwachen Zusammenhang zwischen Seren und sVBK auf (alle p>0,05, Tab. 11). Für CCL2 wurden sehr schwache (3h und 24h) bis schwache (prä, post und 1h) positive Zusammenhänge, unter denen ZP 1h statistisch auffällig ausfiel, ermittelt (r=0,358, p=0,0233, Abb. 11).

***Tab. 11**: Korrelationskoeffizient (r) und dazugehörige p-Werte der Zytokinkonzentrationen in sVBK und Seren zu allen 5 Zeitpunkten*

| ***r (p)*** | ***IL-1ra*** | ***IL-1β*** | ***IL-6*** | ***TNF-α*** | ***CCL2*** | ***CXCL8*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *prä* | *-0,098 (0,5638)* | *0,260 (0,3689)* | *0,047 (0,9119)* | *-0,240 (0,1581)* | *0,257 (0,1093)* | *-0,025 (0,8833)* |
| *post* | *-0,225 (0,1801)* | *0,431 (0,1241)* | *0,205 (0,3476)* | *-0,283 (0,0946)* | *0,243 (0,1302)* | *-0,029 (0,8629)* |
| *1h* | *-0,071 (0,6711)* | *0,376 (0,1510)* | *0,245 (0,3118)* | *-0,336 (0,0518)* | ***0,358 (0,0233)*** | *0,076 (0,6495)* |
| *3h* | *0,048 (0,7708)* | *0,244 (0,3624)* | *-0,007 (0,9771)* | *-0,067 (0,7048)* | *-0,123 (0,4491)* | *-0,138 (0,4102)* |
| *24h* | *0,090 (0,6074)* | *0,245 (0,3278)* | *0,213 (0,5821)* | *-0,155 (0,3810)* | *0,077 (0,6365)* | *-0,015 (0,9288)* |

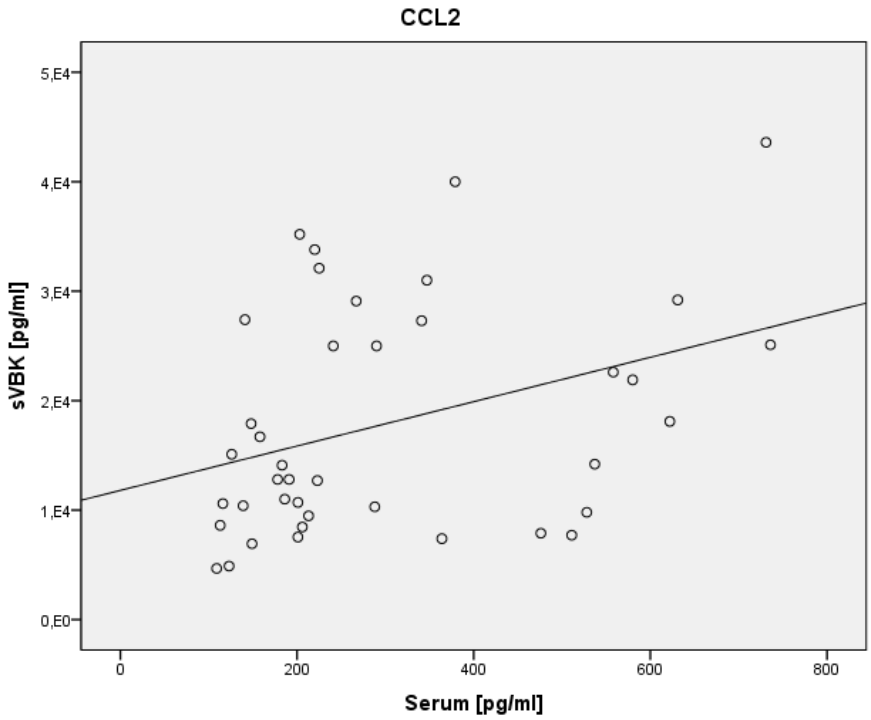



***Abb. 11**: Zusammenhang zwischen CCL2 (Serum) und CCL2 (sVBK) zum ZP 1h*

### 6.3.2 Verlauf proinflammatorischer Zytokine

Sowohl in sVBK (8 160,75 ± 3614,39 pg/ml, p>0,05) als auch im Serum (0,17 ± 0,11 pg/ml, p>0,05) lag eine geringfügig erhöhte Konzentration von IL-1β zum ZP post vor. Die höchste Konzentration von IL-1β (sVBK) wurde mit 10 026,23 ± 5 576,23 pg/ml (p=0,0028) zum ZP 3h beobachtet. Mit 0,18 ± 0,14 pg/ml lag auch im Serum zu diesem ZP die höchste Konzentration von IL-1β vor (p>0,05, Abb. 12a). Dies entsprach einem relativen 1,27- (± 0,51) fachen Anstieg in sVBK und einem 1,46- (± 0,51) fachen Anstieg im Serum (n=12, Abb. 12b). Bezogen auf die IL-1β (sVBK) Konzentration pro Monozyt wurde eine statistisch auffällige Verringerung zum ZP 1h festgestellt (p=0,0017, Abb. 14a).

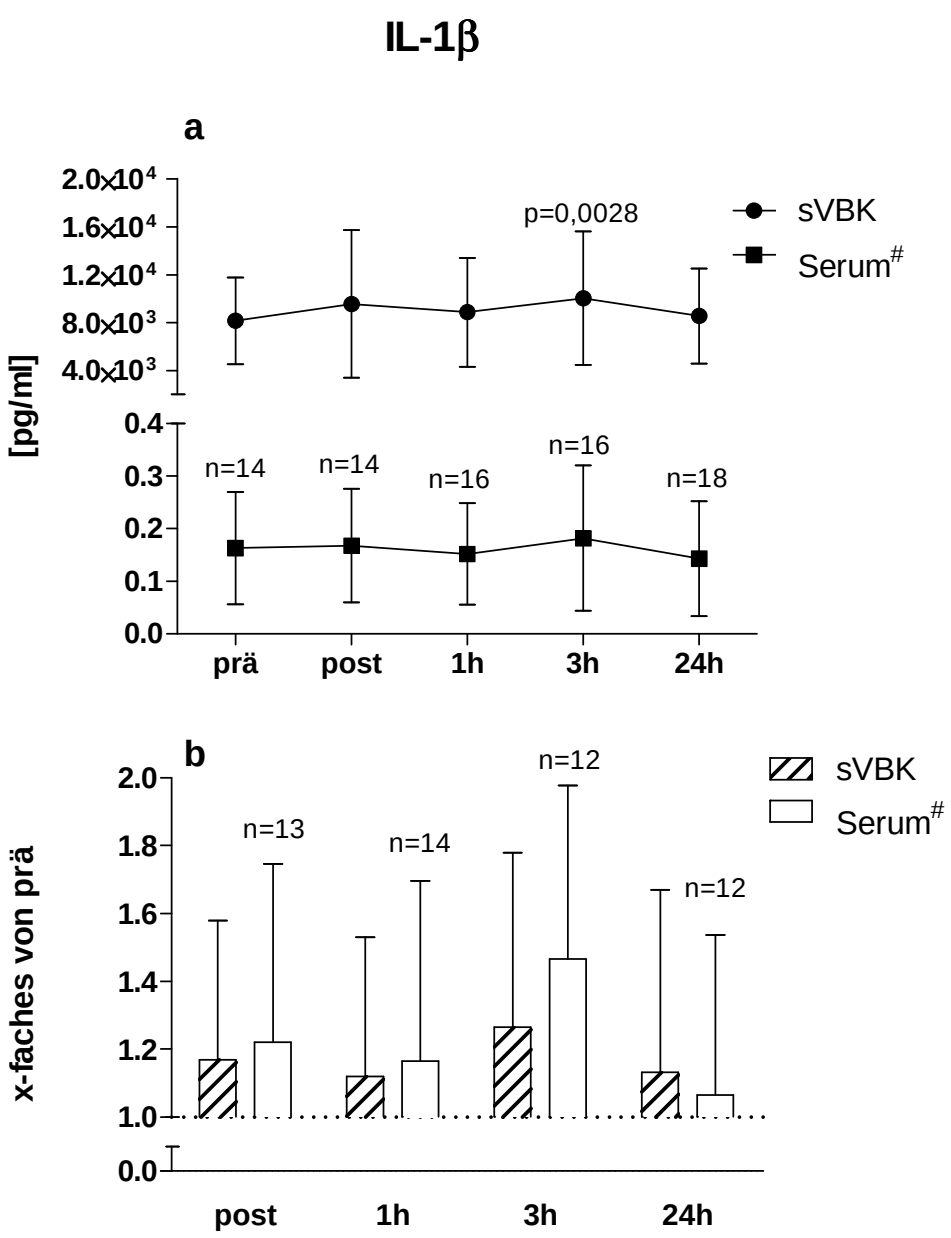



***Abb. 12**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von IL-1β sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. # hier wurde ein hochsensitives ELISA angewendet*

Die Konzentration von TNF-α stieg, wenngleich nicht statistisch auffällig, sowohl in sVBK (9 021,00 ± 4 607,99 pg/ml, p>0,05) als auch im Serum (4,57 ± 2,91 pg/ml, p>0,05, n=36) zum ZP post an. Während dies bereits den größten Anstieg von TNF-α (Serum) darstellte, kam es im weiteren Verlauf zu einem Peak von TNF-α (sVBK) zum ZP 3h (9 453,75 ± 4 325,94 pg/ml (p>0,05, Abb. 13a). Dies entsprach zum jeweiligen Höhepunkt einem mittleren relativen 1,47 (± 0,82) -fachen Anstieg in sVBK und einem 1,38 (± 0,90) –fachen Anstieg im Serum (n=33) (Abb. 13b). Auch die um die

Monozytenzahl korrigierte TNF-α (sVBK) Konzentration wies keine statistisch auffälligen Veränderungen auf (Abb. 14b).

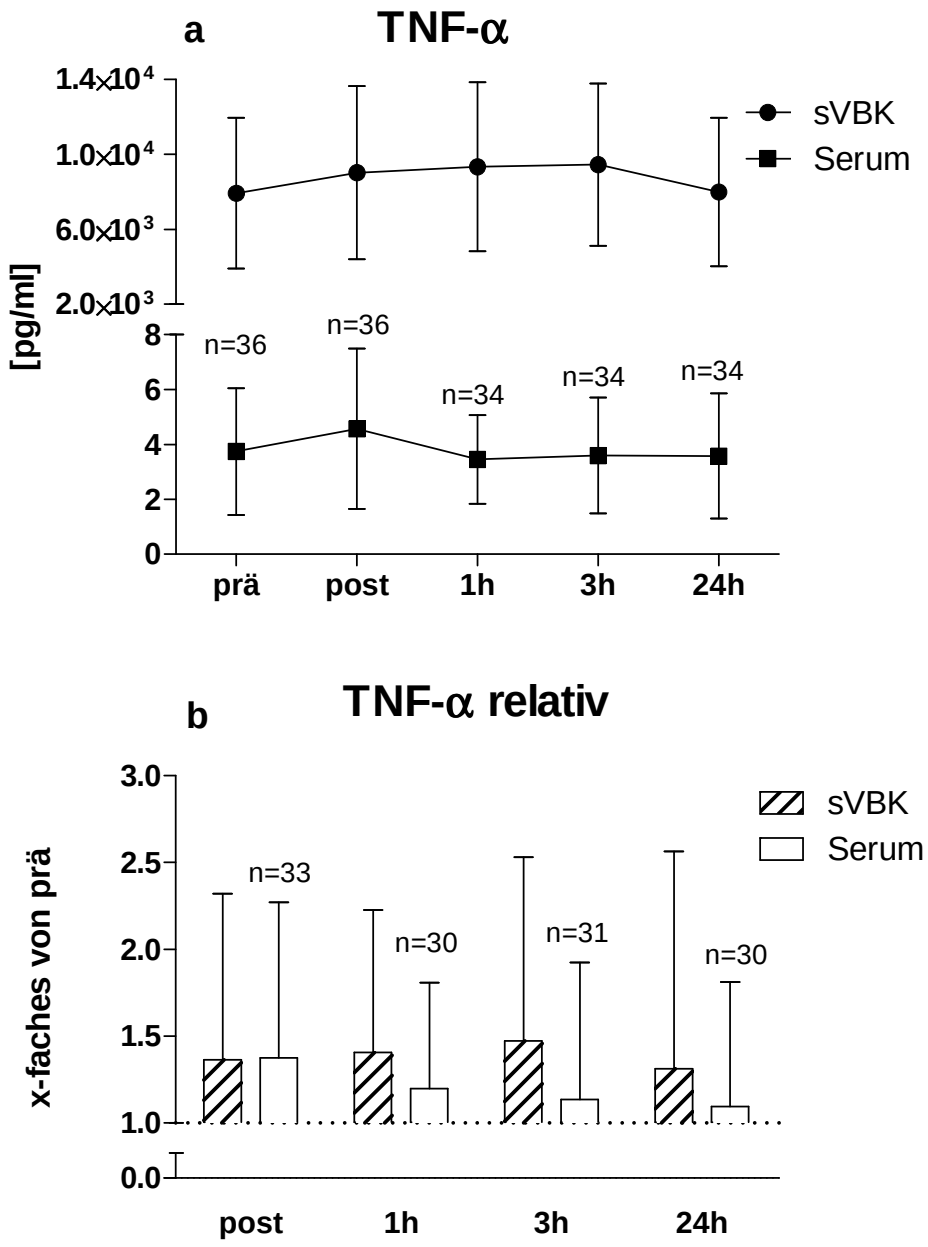



***Abb. 13**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von TNF-α sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Abweichende Fallzahl (n) ist angegeben.*

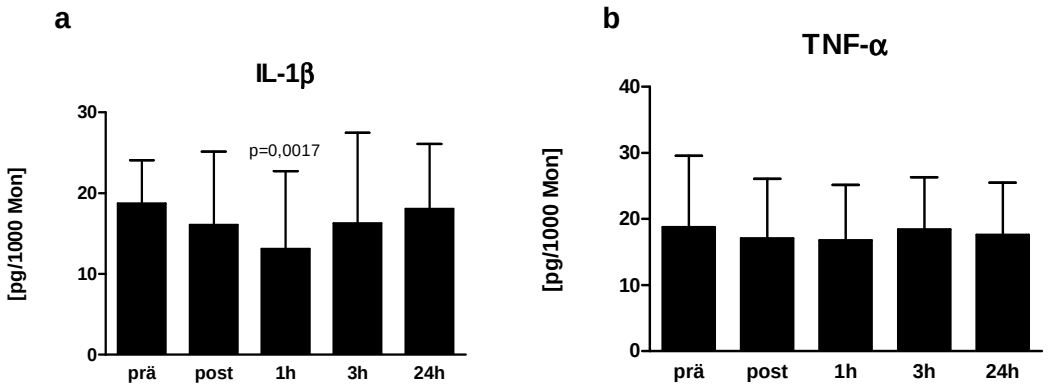



***Abb. 14**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) proinflammatorischer Zytokine (a: IL-1β und b: TNF-α). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben.*

### 6.3.3 Verlauf inflammationsregulierender und antiinflamatorischer Zytokine

Eine 60-minütige Fahrradbelastung hatte einen Anstieg von IL-6 (sVBK) von 80 760,00 ± 31 134,36 pg/ml (prä) auf 105 465,00 ± 44 486,60 pg/ml zum ZP post (p<0,0000) zur Folge. Bis zum ZP 3h blieb IL-6 (sVBK) erhöht (p<0,0001). Eine vergleichbare Kinetik war bei IL-6 (Serum) zu beobachten. Nach einem initialen Anstieg von 0,58 ± 0,47 pg/ml (prä) auf 1,79 ± 0,89 pg/ml zum ZP post (p<0,0000) blieb IL-6 (Serum) ebenfalls bis zum ZP 3h erhöht (1,46 ± 1,21 pg/ml, p<0,0001). Nach 24h lag die mittlere IL-6 Konzentration (sVBK und Serum) nahezu wieder auf Vorbelastungsniveau (Abb. 15a). Relativ betrachtet stieg IL-6 (sVBK) bis zu 1,36 (± 0,58) -fach im Mittel an, für IL-6 (Serum) war ein mittlerer 2,64 (± 0,66) bis 3,67 (± 3,10) -facher Anstieg zu beobachten (Abb. 15b). Die um die Monozytenzahl korrigierte IL-6 (sVBK) Konzentration wies nach Belastung keine statistisch auffällige Veränderung auf (Abb. 17a).

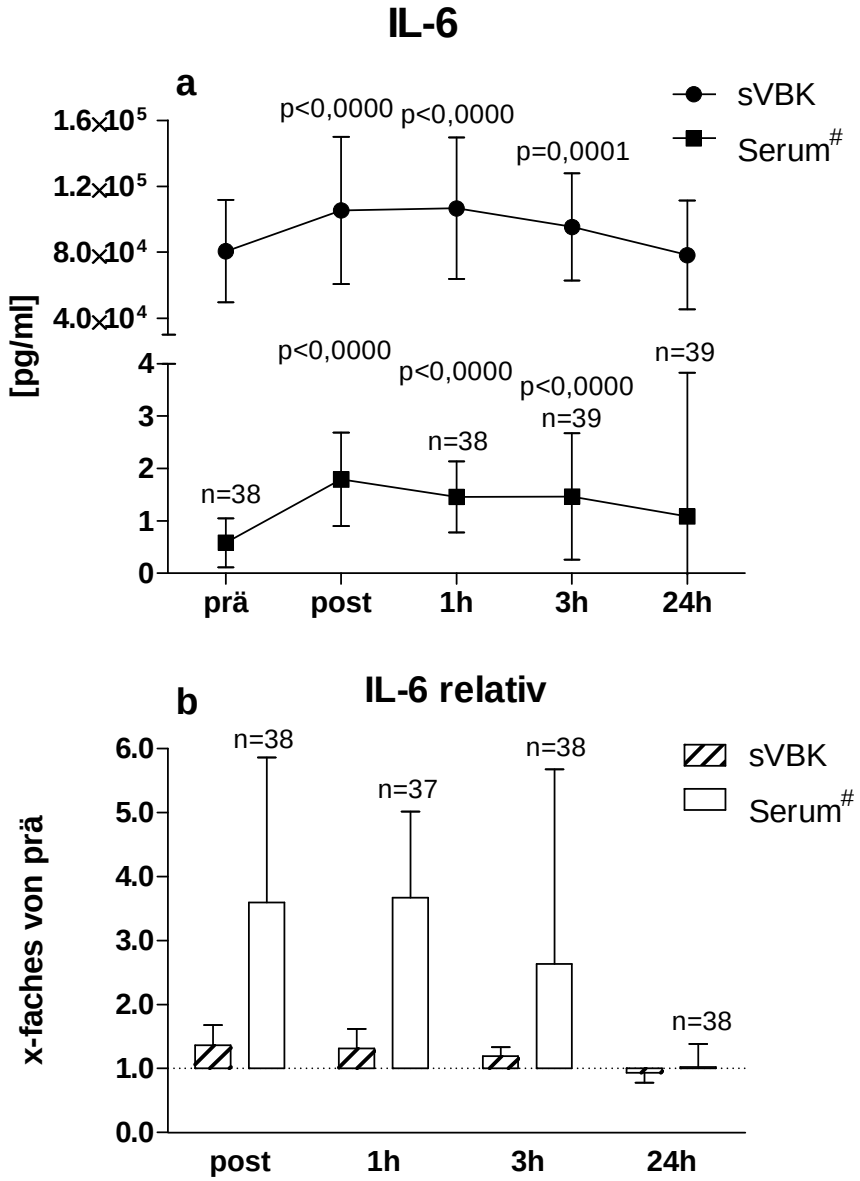



***Abb. 15**: Absoluter (a: MW ± STABW) und relativer (b: Med ± IQ) Verlauf der Konzentration von IL-6 sowohl in sVBK als auch Seren. Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben. #hier wurde ein hochsensitives ELISA angewendet*

Direkt nach Belastung wurde ein Anstieg von IL-1ra (sVBK) von 9 292,75 ± 4 708,32 pg/ml (prä) auf 13 289,75 ± 7 243,69 pg/ml (p<0,0000) beobachtet, welcher sich bis zu zum ZP 3h mit 20 983,50 ± 10 195,27 pg/ml fortsetzte (p<0,0000). Zum ZP 24h wurde eine mit dem Vorbelastungsniveau vergleichbare IL-ra (sVBK) Konzentration ermittelt (p>0,05). Die Kinetik von IL-1ra (Serum) war mit der von IL-1ra (sVBK) vergleichbar. Zum ZP 3h wurde ebenfalls mit 92,81 ± 53,23 pg/ml (n=39) gegenüber prä mit 63,70 ±

60,20 pg/ml (n=37) die im Verlauf höchste IL-1ra (Serum) Konzentration gemessen (p=0,0009, Abb. 16a). Zu den ZP post und 1h wurde jedoch im Gegensatz zu sVBK keine gegenüber prä statistisch auffällige Veränderung beobachtet (p>0,05). Während es zu einem mittleren 1,50- (± 0,68, post) bis 2,52- (± 1,13, 3h) fachen Anstieg von IL-1ra (sVBK) kam, wurde ein mittlerer 1,25- (± 0,56, post) bis 1,50- (± 0,68, 3h) facher Anstieg von IL-1ra (Serum) beobachtet (Abb. 16b). Die um die Monozytenzahl korrigierte IL-1ra (sVBK) Konzentration wies zu den ZP 1h und 3h einen deutlichen Anstieg auf (beide p<0,0000, Abb. 17b).

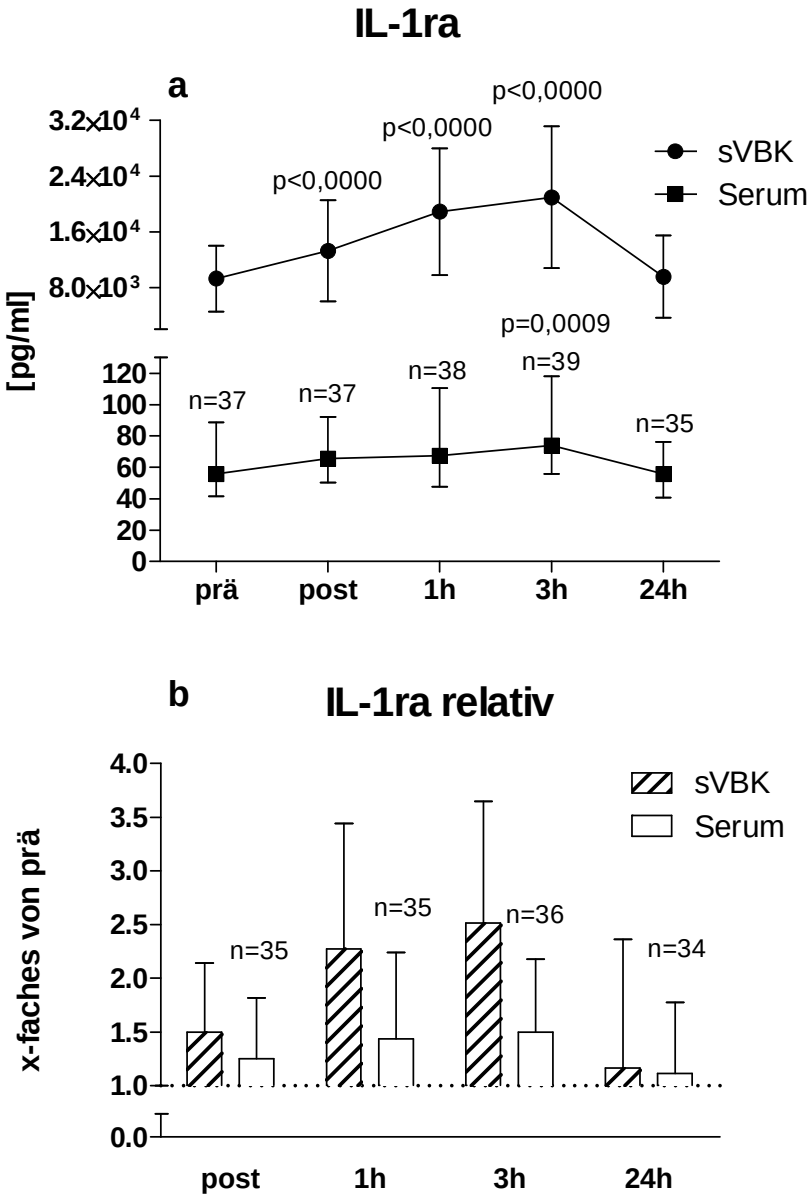



***Abb. 16**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von IL-1ra sowohl in sVBK als auch Seren (MW ± STABW). Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) ist angegeben.*

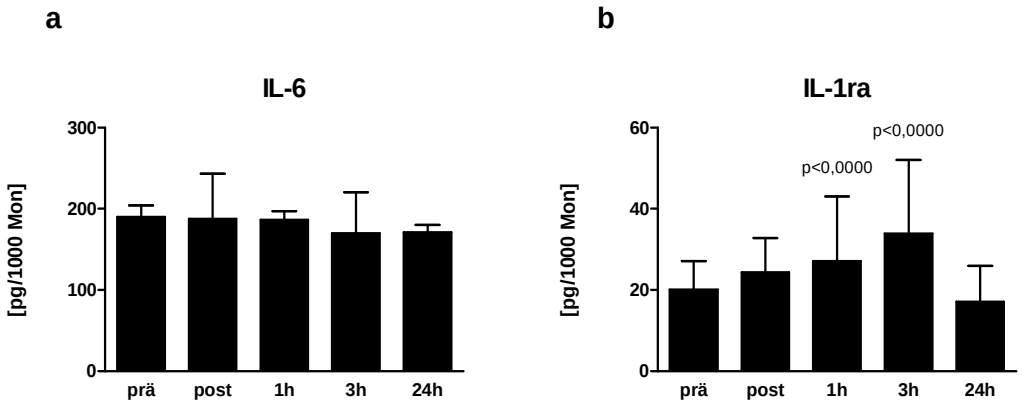



***Abb. 17**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) anti- und inflammationsregulierender Zytokine (a: IL-6 und b: IL-1ra). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben.*

### 6.3.4 Verlauf von Chemokinen

Infolge der Fahrradbelastung kam es zu einem frühzeitigen Anstieg von CCL2 (sVBK) zum ZP post mit 15 900,00 ± 15 280,00 pg/ml gegenüber prä 9 680,31 ± 8 152,50 pg/ml ($p<0,0000$), der sich bis zum ZP 3h fortsetzte (14 450,00 ± 11 530,00 pg/ml, $p<0,0006$). Zum ZP 24h lag mit 10 700,00 ± 9 262,50 pg/ml kein statistisch auffälliger Unterschied mehr zu prä vor ($p>0,05$). Zum ZP post wurde mit 235,50 ± 349,75 pg/ml gegenüber prä 217,50 ± 298,00 pg/ml ebenfalls der höchste Anstieg von CCL2 (Serum) ermittelt ($p=0,0004$). Die nachfolgend gemessenen Konzentrationen von CCL2 (Serum) waren jedoch nur noch geringfügig erhöht (alle $p>0,05$, (Abb. 18a). Es kam zu einem mittleren 1,45 (± 0,81, 3h) bis 1,74 (± 0,65, 1h) -fachen Anstieg von CCL2 (sVBK). CCL2 (Serum) wies einen maximal 1,21 (± 0,37) -fachen mittleren Anstieg (post) auf (Abb. 18b). Die auf die Monozytenzahl bezogene CCL2 (sVBK) Konzentration wies keine statistisch auffällige Veränderung auf (Abb.20a).

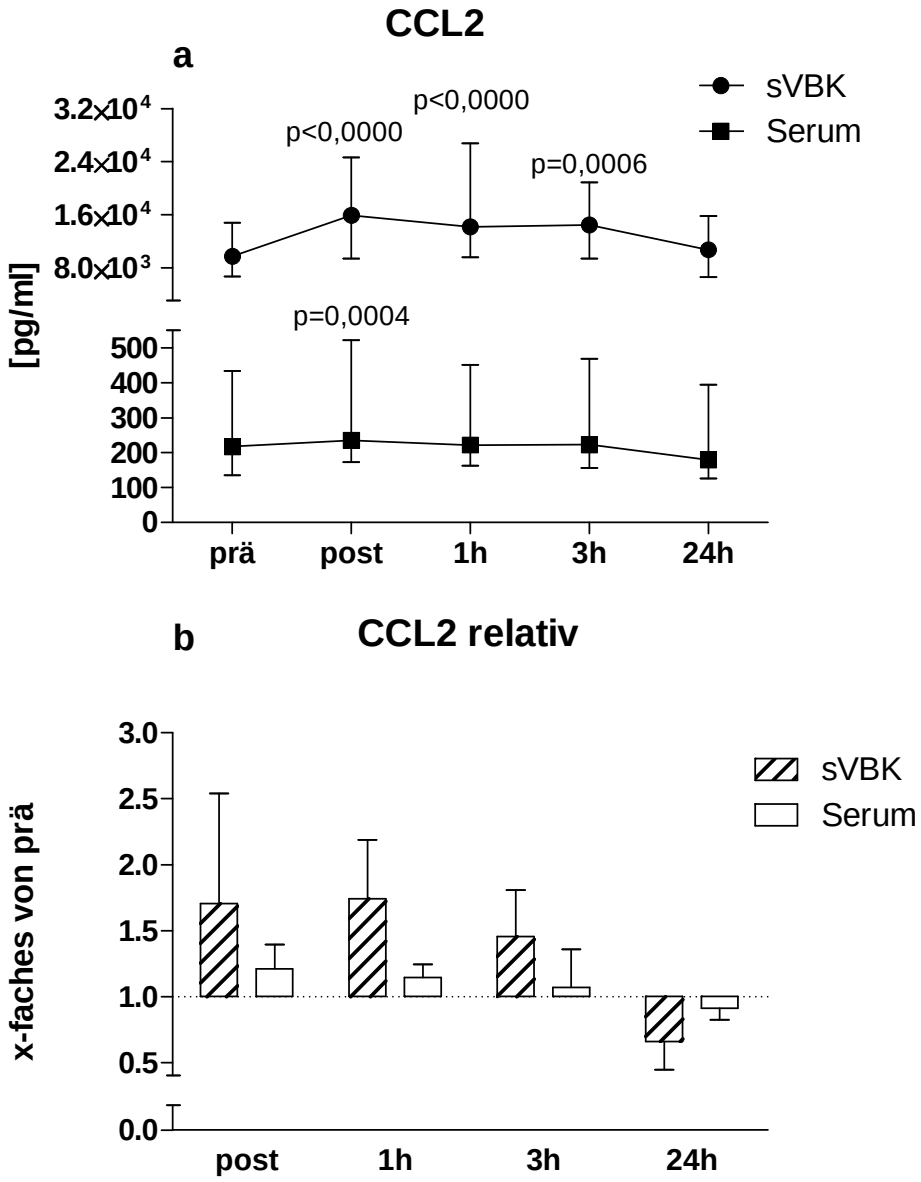



***Abb. 18**: Absoluter (a) und relativer (b) Verlauf der Konzentration von CCL2 sowohl in sVBK als auch Seren (Med ± IQ). Auffällige p-Werte (vs prä) sind angegeben.*

Infolge der Fahrradbelastung kam es zu einem frühzeitigen Anstieg von CXCL8 (sVBK), der mit 87 951,90 ± 41 267,34 pg/ml zum ZP post (p<0,0000) und mit 90 189,40 ± 36 209,08 pg/ml zum ZP 1h (p<0,0000) gegenüber 62 450,00 ± 32 761,74 pg/ml (prä) am stärksten ausgeprägt war (Abb. 19a).

CXCL8 (Serum) stieg direkt nach Belastung an und wies gleichermaßen zu den ZP post mit 9,32 ± 5,15 pg/ml (p=0,0005) und 1h mit 9,31 ± 5,12 pg/ml (p=0,0002) gegenüber 7,67 ± 3,95 pg/ml (prä) die ausgeprägtesten Anstiege auf (Abb.19a). Relativ

betrachtet kam es zu einem mittleren um bis zu 1,57- (± 0,69, 1h) fachen Anstieg von CXCL8 (sVBK) und einem mittleren bis zu 1,19- (± 0,38, 1h) fachen Anstieg von CXCL8 (Serum, Abb. 19b). Die um die Monozytenzahl korrigierte Konzentration von CCL2 (sVBK) stieg von ursprünglich 24,29 ± 19,52 pg/1000 Mon auf 27,42 ± 24,50 pg/1000 Mon zum ZP post an. Per Friedman-Test wurde ein p-Wert von 0,002 für einen Zeiteffekt ermittelt. Der im Einzelvergleich prä vs. post ermittelte p-Wert war allerdings infolge der α-Justierung nach Bonferroni-Holm nicht statistisch auffällig. Die entsprechende Überprüfung der CXCL8 Konzentration pro Monozyt (sVBK) ergab keine statistische Auffälligkeit (Abb. 20b).

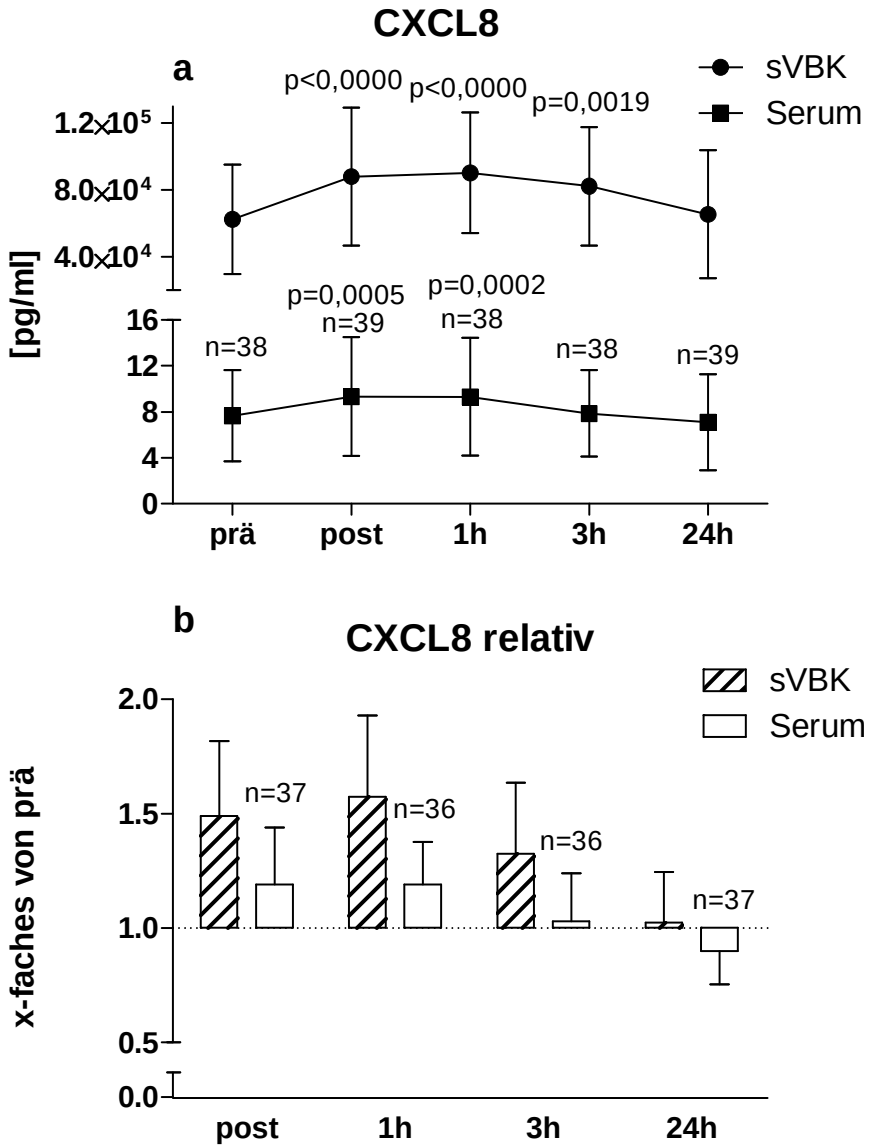



***Abb. 19**: Absoluter (a: MW ± STABW ) und relativer (b: Med ± IQ) Verlauf der Konzentration von CXCL8 sowohl in Kulturen als auch Seren. Auffällige p-Werte (vs prä) und abweichende Fallzahl (n) sind angegeben.*

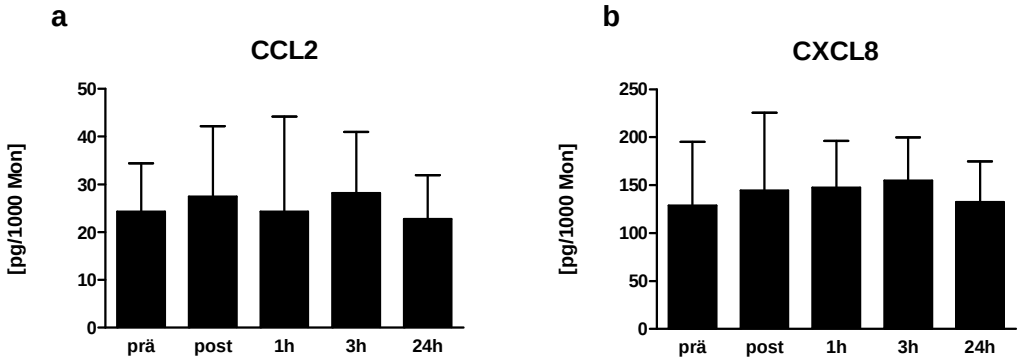



***Abb. 20**: Verlauf der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration (Med ± IQ) von Chemokinen (a: CCL2 und b: CXCL8).*

## 6.4 Ergebnisse Studienabschnitt B

### 6.4.1 Vorerkrankungen und/oder Begleittherapien

12 Probanden insgesamt, davon 4 der Placebo- und 8 der Traumeel-Gruppe, gaben vor Studieneinschluss an, Vorerkrankungen (innerhalb der letzten 3 Monate) und/oder Begleiterkrankungen aktuell zu haben bzw. gehabt zu haben (Tab. 12).

***Tab. 12**: Häufigkeit vorliegender Vorerkrankungen und/oder Begleittherapien in beiden Behandlungsgruppen und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit*

| **Gruppe** | **ja** | | **nein** | | **Summe** | **p** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *[%]* | *n* | *[%]* | *N* | |
| *Placebo* | *4* | *10.00* | *36* | *90.00* | *40* | *0.2247* |
| *Traumeel* | *8* | *20.51* | *31* | *79.49* | *39* | |

Tab. 13 bietet eine Übersicht der Spezifikationen der von den Probanden genannten Erkrankungen und Therapie- bzw. Behandlungsmaßnahmen sowie deren Persistenz zum Zeitpunkt des Screenings.

***Tab. 13**: Erkrankungen und Therapie- bzw. Behandlungsmaßnahmen (chronologisch)*

| **Gruppe** | **Erkrankung** | **Therapie- bzw. Behandlungsmaßnahme** | **Persistenz** |
|---|---|---|---|
| *Traumeel* | *allergisches Asthma Bronchiale* | *Bedarfsspray Salbutamol* | *überdauernd* |
| *Placebo* | *Gastrointestinale Beschwerden* | *Riopan Magengel, Pantoprazol 20 mg* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Entzündung im Karpaltunnel rechts* | *Voltaren-Salbe* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Tonsillitis* | *Tonsillektomie Ibuprofen 800 Tabl.* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Grippaler Infekt* | *Paracetamol* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Grippaler Infekt* | *Paracetamol 500 mg + Aspirin Komplex* | *geheilt* |
| *Placebo* | *Grippaler Infekt* | *1 Kapsel Gelomyrtol* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Grippaler Infekt* | *Aspirin Complex 2-malige Anwendung* | *geheilt* |
| *Traumeel* | *Abszess* | *10 Tabletten Doxycyclin* | *geheilt* |

| Gruppe | Erkrankung | Therapie- bzw. Behandlungsmaßnahme | Persistenz |
|---|---|---|---|
| *Traumeel* | *Grippaler Infekt* | *Ambroxol 3x3 Tabl.* | *geheilt* |
| *Placebo* | *bakterielle Infektion* | *metronidazol stada 6 x 1 Tabl.* | *geheilt* |
| *Placebo* | *Schilddrüsenunterfunktion* | *Jodid-ratiopharm 200 µg* | *überdauernd* |

## 6.4.2 Compliance

### *6.4.2.1 Nüchternheit und Standardfrühstück*

Alle eingeschlossenen und ausgewerteten (N=79) Probanden gaben an, am Morgen von Tag 1 der Untersuchung nüchtern (spätestens ab 22.00 Uhr des Vorabends) gewesen zu sein. Ebenso nahmen alle 79 Probanden das Standardfrühstück zu sich.

### *6.4.2.2 Belastungsintervention*

Insgesamt 11 und damit 86% aller Probanden, davon 5 der Placebo- und 6 der Traumeel-Gruppe, mussten die 60-minütige Fahrradbelastung vor Ablauf der vorgegebenen 60 min abbrechen (Tab. 14). Bei allen (Placebo) bzw. 5 von 6 (Traumeel) Probanden war der vorzeitige Abbruch durch eine vorzeitige Erschöpfung begründet. Ein Proband der Traumeel-Gruppe musste aufgrund von Wadenkrämpfen vorzeitig abbrechen. Im Mittel fuhren diese 11 Probanden 46 min (Placebo) bzw. 41 min (Traumeel) aber wenigstens 33 min (Placebo) bzw. 31 min lang (Traumeel, Tab. 15).

***Tab. 14**: Anzahl der Probanden [n], die die vorgegebene 60-minütige Fahrradbelastung beendeten und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit*

| Gruppe | <60 min | | =60 min | | Summe | p |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *[%]* | *n* | *[%]* | *N* | |
| ***Placebo*** | *5* | *12.50* | *35* | *87.50* | *40* | *0.7555* |
| ***Traumeel*** | *6* | *15.38* | *33* | *84.62* | *39* | |

***Tab. 15**: Deskriptive Auswertung der Fahrzeit [min] der vorzeitigen Abbrecher getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit*

| Gruppe | n | Min | Q1 | Median | Q2 | Max | MW | STABW | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Placebo** | 5 | 33 | 45.0 | 48.0 | 51.0 | 51 | 45.6 | 7.5 | 0,3591 |
| **Traumeel** | 6 | 31 | 31.0 | 38.5 | 50.0 | 54 | 40.5 | 9.7 | |

Die Probanden erzielten im Mittel eine $HF_{avg}$ von 163 ± 11 S/min (Placebo) und 164 ± 13 S/min (Traumeel, Tab. 16).

***Tab. 16**: Deskriptive Auswertung der $HF_{avg}$ [S/min] getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit*

| Gruppe | n | Min | Q1 | Median | Q2 | Max | MW | STABW | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Placebo** | 40 | 135 | 154 | 167 | 170 | 182 | 163 | 11 | 0,8453 |
| **Traumeel** | 38 | 129 | 157 | 165 | 173 | 190 | 164 | 13 | |

Dies entsprach einer mittleren Abweichung der vorgegebenen HF von -1 ± 2 % (Placebo) und -1 ± 3 % (Traumeel, Tab. 17).

***Tab. 17**: Deskriptive Auswertung der prozentualen Abweichung der $HF_{avg}$ [%] von der vorgegebenen HF getrennt nach Behandlungsgruppe. n.b.: nicht berechnet*

| Gruppe | n | Min | Q1 | Median | Q2 | Max | MW | STABW | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Placebo** | 40 | -5 | -2 | -1 | 0 | +4 | -1 | 2 | n.b. |
| **Traumeel** | 38 | -10 | -3 | -1 | 0 | +2 | -1 | 3 | |

Die durchschnittlich getretene Umdrehungszahl lag bei 82 ± 4 U/min (Placebo) und 82 ± 4 U/min (Traumeel, Tab. 18).

***Tab. 18**: Deskriptive Auswertung der durchschnittlichen Umdrehungszahl [U/min] getrennt nach Behandlungsgruppe und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit*

| Gruppe | n | Min | Q1 | Median | Q2 | Max | MW | STABW | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Placebo** | 40 | 76 | 79 | 81 | 85 | 93 | 82 | 4 | 0,9200 |
| **Traumeel** | 38 | 75 | 79 | 83 | 85 | 90 | 82 | 4 | |

#### *6.4.2.3 Tabletteneinnahme*

Insgesamt 5 Probanden, davon 2 der Placebo- und 3 der Traumeel-Gruppe, gaben an, innerhalb der ersten zwei Nachbelastungsstunden nicht die vorgegebene Dosis von insgesamt 8 Tabletten eingenommen zu haben (Tab. 19).

***Tab. 19**: Einhaltung der Tablettendosis von 8 Stk. Innerhalb der ersten 2 Nachbelastungsstunden, getrennt nach Behandlungsgruppe*

| **Gruppe** | **nein** | | **ja** | | **Summe** |
|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *%* | *n* | *%* | *N* |
| ***Placebo*** | *2* | *5,00* | *38* | *95,00* | *40* |
| ***Traumeel*** | *3* | *7,69* | *36* | *92,31* | *39* |
| ***Gesamt*** | *5* | *6,33* | *74* | *93,67* | *79* |

Stattdessen gab je 1 Proband beider Behandlungsgruppen an, 7 Tabletten eingenommen zu haben, und 1 Proband der Placebo-Gruppe sowie 2 Probanden der Traumeel-Gruppe gaben an, 9 Tabletten eingenommen zu haben (Tab. 20).

***Tab. 20**: Abweichungen der eingenommenen Tablettenzahl innerhalb der ersten 2 Nachbelastungsstunden getrennt nach Behandlungsgruppe*

| **Gruppe** | **7** | | **9** | | **Summe** |
|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *%* | *n* | *%* | *N* |
| ***Placebo*** | *1* | *50,00* | *1* | *50,00* | *2* |
| ***Traumeel*** | *1* | *33,33* | *2* | *66,67* | *3* |
| ***Gesamt*** | *2* | *40,00* | *3* | *60,00* | *5* |

Bei Rückgabe der Prüfmedikation zum letzten Nachbeobachtungszeitpunkt (24h) gaben n=34 (85%) Probanden der Placebo-Gruppe und n=35 (90%) Probanden der Traumeel-Gruppe an, die vorgegebene Gesamtdosis von exakt 14 Tabletten eingenommen zu haben. Alle ausgewerteten 79 Probanden gaben die restliche Prüfmedikation zurück (Tab. 21).

***Tab. 21**: Anzahl der von den Probanden eingenommenen Tabletten (insgesamt), getrennt nach Behandlungsgruppe*

| **Gruppe** | **12** | | **13** | | **14** | | **15** | | **17** | | **Summe** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* | *N* |
| ***Placebo*** | *1* | *2.50* | *4* | *10.00* | *34* | *85.00* | *1* | *2.50* | *0* | *0.00* | *40* |
| ***Traumeel*** | *1* | *2.56* | *1* | *2.56* | *35* | *89.74* | *1* | *2.56* | *1* | *2.56* | *39* |
| ***Gesamt*** | *2* | *2.53* | *5* | *6.33* | *69* | *87.34* | *2* | *2.53* | *1* | *1.27* | *79* |

#### *6.4.2.4 Blutabnahmen*

Alle 40 (Placebo) bzw. 39 (Traumeel) Probanden erschienen zu allen 5 Messzeitpunkten und gaben Blut ab (neben den weiteren Messungen und Datenerhebungen, Tab. 22).

***Tab. 22**: Anzahl der Probanden [n], die zu den jeweiligen Messzeitpunkten erschienen und sich Blut entnehmen ließen, getrennt nach Behandlungsgruppe*

| **Gruppe** | **ZP1** | | **ZP2** | | **ZP3** | | **ZP4** | | **ZP5** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* | *n* | *%* |
| ***Placebo*** | *40* | *100* | *40* | *100* | *40* | *100* | *40* | *100* | *40* | *100* |
| ***Traumeel*** | *39* | *100* | *39* | *100* | *39* | *100* | *39* | *100* | *39* | *100* |
| ***Gesamt*** | *79* | *100* | *79* | *100* | *79* | *100* | *79* | *100* | *79* | *100* |

### 6.4.3 Strukturgleichheit der Zielgrößen

Nachfolgend werden die p-Werte des Tests auf Strukturgleichheit zwischen den Behandlungsgruppen aller Zielgrößen dargestellt. Lediglich für IL-2 (sVBK) wurde ein auffälliger p-Wert ermittelt.

***Tab. 23**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Hauptzielgrößen zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet (Serum).*

| **Zielgrößen** | **P** | **T** | **p** |
|---|---|---|---|
| *IL-6 [pg/ml]* | *81 750,00* | *70 900,00* | *0.3592* |
| *hsCRP [mg/l]* | *0,50* | *0,40* | *0.4378* |

***Tab. 24**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen im Bereich des Muskelschadens zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä.*

| **Zielgrößen** | **P** | **T** | **p** |
|---|---|---|---|
| *Schmerz (VAS) [Score]* | *0* | *0* | *0.9872* |
| *Schmerz (gesamt) [Score]* | *1* | *0* | *0.6033* |
| *$Maxkraft_{Flex}$ [Nm]* | *207,00* | *195,30* | *0.3490* |
| *$Maxkraft_{Extl}$ [Nm]* | *407,70* | *409,40* | *0.9063* |
| *CK [U/l]* | *114,00* | *136,00* | *0.4801* |
| *LDH [U/l]* | *170,50* | *173,00* | *0.7057* |

***Tab. 25**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen im Bereich der Zytokine zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet.*

| Zielgrößen | P | T | p |
|---|---|---|---|
| CCL2 (Serum [pg/ml]) | 217,50 | 276,00 | 0.0917 |
| CCL2 [pg/ml] | 9 680,00 | 7 980,00 | 0.4242 |
| CCL3 [pg/ml] | 48 350,00 | 45 300,00 | 0.1481 |
| CCL4 [pg/ml] | 451 500,00 | 410 000,00 | 0.1683 |
| CXCL8 (Serum [pg/ml]) | 6,73 | 8,12 | 0.0870 |
| CXCL8 [pg/ml] | 53 950,00 | 45 200,00 | 0.2492 |
| GMCSF [pg/ml] | 71,65 | 137,00 | 0.0917 |
| IFN-γ [pg/ml] | 4 415,00 | 5 760,00 | 0.2203 |
| IL-10 [pg/ml] | 856,50 | 913,00 | 0.7058 |
| IL-12p40 [ng/ml] | 18,65 | 19,40 | 0.6379 |
| IL-12p70 [pg/ml] | 104,50 | 110,00 | 0.8908 |
| IL-15 [ng/ml] | 0,59 | 0,35 | 0.3852 |
| IL-17 [pg/ml] | 115,00 | 174,00 | 0.2354 |
| IL-18 [pg/ml] | 183,00 | 190,00 | 0.9804 |
| IL-1ra (Serum [pg/ml]) | 55,10 | 47,80 | 0.1869 |
| IL-1ra [pg/ml] | 8 860,00 | 7 800,00 | 0.9531 |
| IL-1α [ng/ml] | 0,74 | 0,72 | 0.9883 |
| IL-1β (Serum [pg/ml]) | 0,04 | 0,04 | 0.8474 |
| IL-1β [pg/ml] | 7 685,00 | 7 390,00 | 0.8753 |
| IL-2 [pg/ml] | 706,00 | 1 370,00 | **0.0350** |
| IL-23 [ng/ml] | 7,42 | 8,56 | 0.9883 |
| IL-25 [pg/ml] | 119,50 | 117,00 | 0.8560 |
| IL-3 [ng/ml] | 0,045 | 0,074 | 0.1335 |
| IL-4 [pg/ml] | 161,00 | 208,00 | 0.0809 |
| IL-5 [pg/ml] | 52,15 | 58,40 | 0.4414 |
| IL-6 (Serum [pg/ml]) | 0,51 | 0,52 | 0.2041 |
| IL-7 [pg/ml] | 5,87 | 5,87 | 0.5854 |
| SCF [pg/ml] | 251,50 | 233,00 | 0.7388 |
| TNF-α (Serum [pg/ml]) | 2,92 | 2,66 | 0.9491 |
| TNF-α [pg/ml] | 7 745,00 | 7 590,00 | 0.7574 |
| TNF-β [pg/ml] | 446,00 | 461,00 | 0.7987 |

***Tab. 26**: Median (Med) und p-Wert des Tests auf Strukturgleichheit der Nebenzielgrößen zwischen beiden Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T), jeweils zum ZP prä. Zytokine, die nicht in sVBK sondern im Serum gemessen wurden sind gekennzeichnet (Serum).*

| *Zielgrößen* | *P* | *T* | *p* |
|---|---|---|---|
| *Leukozyten [Z/nl]* | *4,95* | *5,30* | *0.4559* |
| *Basophile [%]* | *0,50* | *0,50* | *0.9882* |
| *Basophile [Z/nl]* | *0,03* | *0,02* | *0.8947* |
| *Eosinophile [%]* | *2,90* | *3,00* | *0.8753* |
| *Eosinophile [Z/nl]* | *0,15* | *0,16* | *0.4502* |
| *Neutrophile [%]* | *53,15* | *52,00* | *0.8831* |
| *Neutrophile [Z/nl]* | *2,52* | *2,69* | *0.6626* |
| *Lymphozyten [%]* | *34,35* | *34,80* | *0.5695* |
| *Lymphozyten [Z/nl]* | *1,73* | *1,75* | *0.7912* |
| *Monozyten [%]* | *8,70* | *8,40* | *0.8291* |
| *Monozyten [Z/nl]* | *0,45* | *0,41* | *0.8178* |
| *Annexin V [%]* | *8,55* | *8,95* | *0.8130* |
| *CD62 [%]* | *64,24* | *61,17* | *0.4537* |
| *CD69 [%]* | *0,74* | *0,98* | *0.1606* |
| *CD95 [%]* | *16,90* | *17,65* | *0.9014* |
| *CD95L [%]* | *9,91* | *7,15* | *0.7439* |

## 6.4.4 Hauptzielgrößen

### *6.4.4.1 IL-6*

In beiden Behandlungsgruppen war direkt nach Belastung eine erhöhte mittlere Konzentration von IL-6 (sVBK) zu verzeichnen. Während die Placebo-Gruppe zum ZP 1h mit 106 615,00 ± 42 756,96 pg/ml ein Maximum erreichte (+32% vs prä), lag dieses in der Traumeel-Gruppe mit 106 621,00 ± 43 184,42 pg/ml (+36%) bereits post vor (Abb. 21). In der nachfolgenden Phase fiel die Konzentration von IL-6 (sVBK) in beiden Gruppen stetig ab. Mit 78 415,00 ± 32 977,47 pg/ml (-3% vs prä) war in der Placebo-Gruppe 24 Stunden nach Belastung eine gegenüber dem Vorbelastungswert etwas reduzierte mittlere IL-6 Konzentration (sVBK) zu beobachten, wohingegen in der Traumeel-Gruppe mit 86 379,49 ± 37 181,26 pg/ml (Traumeel, +10% vs prä) nach wie vor ein erhöhtes Level vorlag. Die mittlere 24-Stunden-Konzentration von IL-6 (sVBK), gemessen an der $AUC_I$, lag bei 6,45 ± 0,23 $x10^8$ (Placebo) bzw. 1,34 ± 2,51 $x10^9$ (Traumeel, Abb. 22). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt

werden (p=0,1158). Auch durch eine ANCOVA konnte kein Hinweis auf einen Interaktionseffekt Zeitpunkt*Gruppe aufgedeckt werden (p=0,3005, Tab. 27).

***Tab. 27**: deskriptive Auswertung der IL-6 Konzentration (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe Placebo (P) und Traumeel (T) und p-Wert der ANCOVA (Zeitpunkt*Gruppe)*

| ***IL-6 [pg/ml]*** | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***ZP*** | ***N*** | ***Min*** | ***Q1*** | ***Med*** | ***Q2*** | ***Max*** | ***MW ± STABW*** | ***[%] vs prä*** | ***p*** |
| *P* | *prä* | *40* | *23 400* | *62 400* | *81 750* | *100 000* | *174 000* | *80 760,00 ± 31 134,36* | *100* | |
| | *post* | *40* | *21 200* | *74 250* | *99 550* | *139 000* | *202 000* | *105 465,00 ± 44 486,60* | *+31* | |
| | *1h* | *40* | *32 500* | *74 650* | *103 500* | *126 500* | *221 000* | *106 615,00 ± 42 755,96* | *+32* | |
| | *3h* | *40* | *34 000* | *69 800* | *94 100* | *115 000* | *183 000* | *95 292,50 ± 32 483,77* | *+18* | |
| | *24h* | *40* | *21 200* | *55 350* | *72 200* | *97 600* | *168 000* | *78 415,00 ± 32 977,47* | *-3* | |
| *T* | *prä* | *39* | *23 600* | *50 700* | *70 900* | *94 300* | *189 000* | *78 492,31 ± 39 391,51* | *100* | ***0.3005*** |
| | *post* | *39* | *38 000* | *71 800* | *103 000* | *127 000* | *229 000* | *106 620,51 ± 43 184,42* | *+36* | |
| | *1h* | *39* | *30 300* | *73 000* | *94 900* | *124 000* | *231 000* | *101 205,13 ± 43 360,26* | *+29* | |
| | *3h* | *39* | *37 100* | *66 500* | *86 000* | *119 000* | *179 000* | *93 230,77 ± 35 402,94* | *+19* | |
| | *24h* | *39* | *33 600* | *57 400* | *83 200* | *111 000* | *174 000* | *86 379,49 ± 37 181,26* | *+10* | |

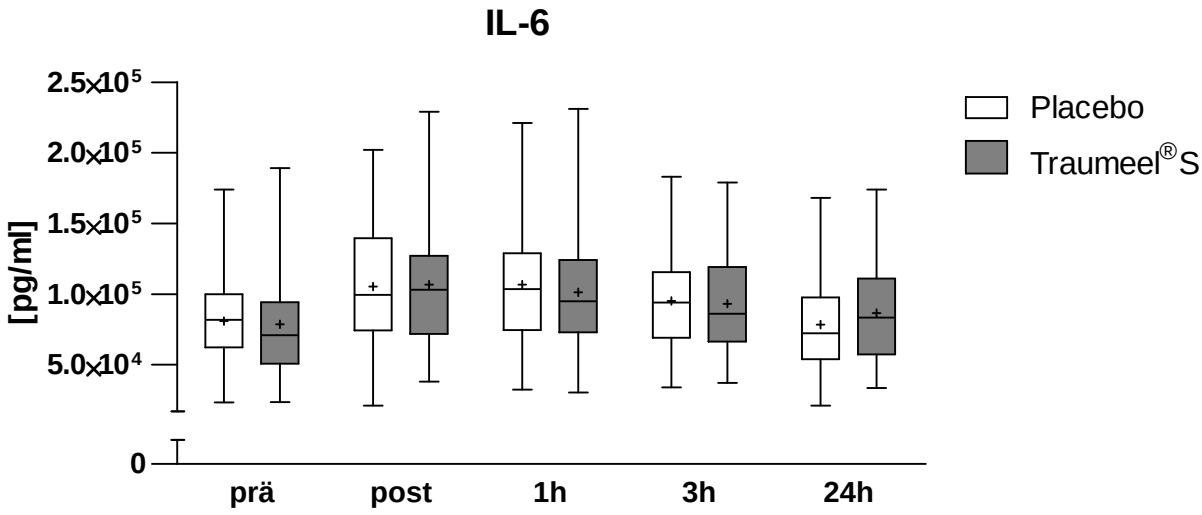



***Abb. 21**: Verlauf der Konzentration von IL-6 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

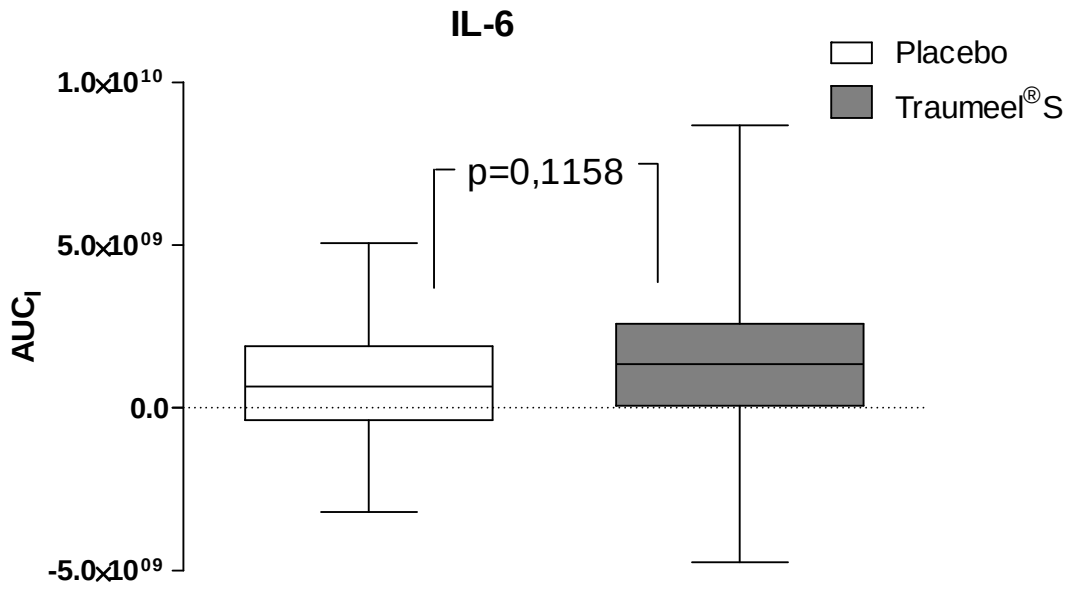



***Abb. 22**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-6 (sVBK)*

#### *6.4.4.2 hsCRP*

Die Konzentration von hsCRP lag in beiden Behandlungsgruppen mehrfach unterhalb der Detektionsgrenze von 0,3 mg/l, daher wurden die fehlenden Werte durch den Wert 0,15 mg/l, also die halbe Messgrenze, ersetzt (Tab. 28).

***Tab. 28**: Häufigkeit der unter der Messgrenze von <0,3 mg/l liegenden Werte von hsCRP in beiden Behandlungsgruppen zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

| *Zeitpunkt* | *Placebo [n]* | *Traumeel [n]* |
|---|---|---|
| *prä* | *14* | *16* |
| *post* | *13* | *14* |
| *1h* | *11* | *17* |
| *3h* | *14* | *13* |
| *24h* | *5* | *6* |
| ***MW*** | ***11,4*** | ***13,2*** |

Da hsCRP nicht normalverteilt war, wurde eine Logarithmierung vorgenommen. Hierdurch konnte eine Normalverteilung erzielt werden. Das geometrische Mittel von hsCRP lag vor Belastung bei 0,52 mg/l (Placebo) und 0,41 mg/l (Traumeel) und stieg nach Belastung auf 0,57 mg/l (+10%) und 0,42 mg/l (+3%) respektive an. Die höchsten hsCRP-Werte beider Gruppen, angegeben als geometrisches Mittel, wurden mit 0,99 mg/l (Placebo, +92% vs prä) und 0,80 mg/l (Traumeel, +98% vs prä) zum ZP 24h beobachtet (Abb. 23). Die höchsten hsCRP Konzentrationen erreichten zwei

Probanden der Placebo-Gruppe mit 6,62 mg/l (post), 5,87 mg/l (1h) bzw. 6,19 mg/l (3h) und 21,2 mg/l (24h) respektive (Tab. 29). Der Median der $AUC_I$ von hsCRP lag bei 1,18 ± 3,34 $x10^4$ (Placebo) bzw. 1,40 ± 2,61 $x10^4$ (Traumeel, Abb. 24). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (p=0,4193). Ebenso lag kein Hinweis auf einen Interaktionseffekt (Zeitpunkt*Gruppe) vor (p>0,05).

***Tab. 29**: deskriptive Auswertung der hsCRP Konzentration im Serum getrennt nach Behandlungsgruppen Placebo (P) und Traumeel (T) sowie p-Wert der ANCOVA (Zeipunkt*Gruppe). Logarithmierte und zurücktransformierte Werte sind als geometrisches Mittel (MWgeo) angegeben*

| ***hsCRP [mg/l]*** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***ZP*** | ***N*** | ***Min*** | ***Q1*** | ***Med*** | ***Q2*** | ***Max*** | ***MW ± STABW*** | ***MWgeo*** | ***[%] vs prä*** | ***p*** |
| | *prä* | *40* | *0,15* | *0,23* | *0,50* | *0,75* | *6,13* | *0,96 ± 1,41* | *0,52* | *100%* | |
| | *post* | *40* | *0,15* | *0,30* | *0,60* | *0,78* | *6,62* | *1,02 ± 1,43* | *0,57* | *+10%* | |
| *P* | *1h* | *39* | *0,15* | *0,30* | *0,50* | *0,70* | *5,87* | *0,93 ± 1,34* | *0,52* | *+1%* | |
| | *3h* | *39* | *0,15* | *0,15* | *0,50* | *0,80* | *6,19* | *0,92 ± 1,30* | *0,51* | *-1%* | |
| | *24h* | *40* | *0,15* | *0,50* | *1,05* | *1,60* | *21,20* | *1,87 ± 3,44* | *0,99* | *+92%* | |
| | | | | | | | | | | | ***0,8602*** |
| | *prä* | *39* | *0,15* | *0,15* | *0,40* | *0,70* | *2,90* | *0,58 ± 0,59* | *0,41* | *100%* | |
| | *post* | *39* | *0,15* | *0,15* | *0,40* | *0,75* | *3,20* | *0,61 ± 0,62* | *0,42* | *+3%* | |
| *T* | *1h* | *39* | *0,15* | *0,15* | *0,40* | *0,70* | *3,30* | *0,56 ± 0,62* | *0,38* | *-6%* | |
| | *3h* | *39* | *0,15* | *0,15* | *0,34* | *0,73* | *3,40* | *0,57 ± 0,62* | *0,40* | *-1%* | |
| | *24h* | *39* | *0,15* | *0,50* | *0,87* | *1,20* | *6,10* | *1,19 ± 1,28* | *0,80* | *+98%* | |

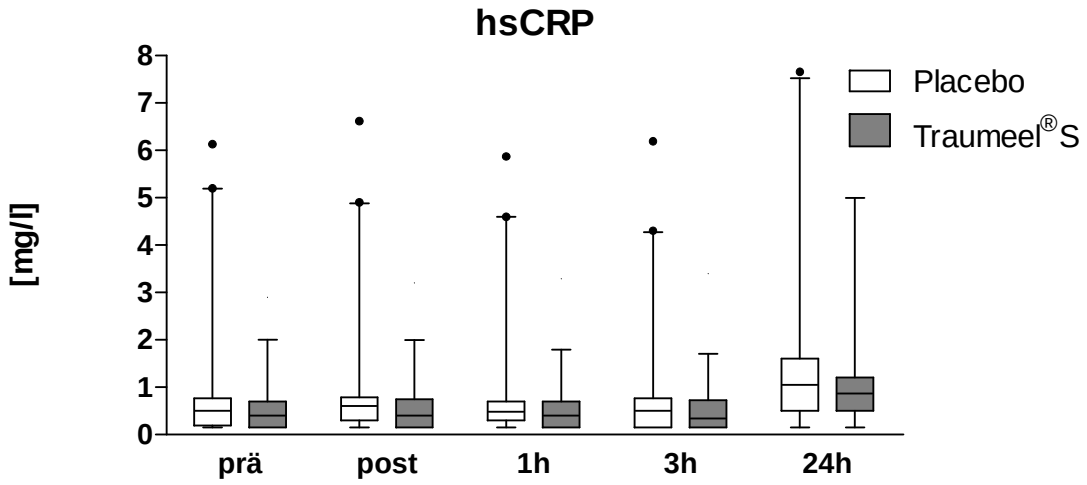



***Abb. 23**: Verlauf der Konzentration von hsCRP (Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. ein Ausreißer der Placebo-Gruppe zum Zeitpunkt 24h von 21,2 mg/l ist nicht dargestellt.*

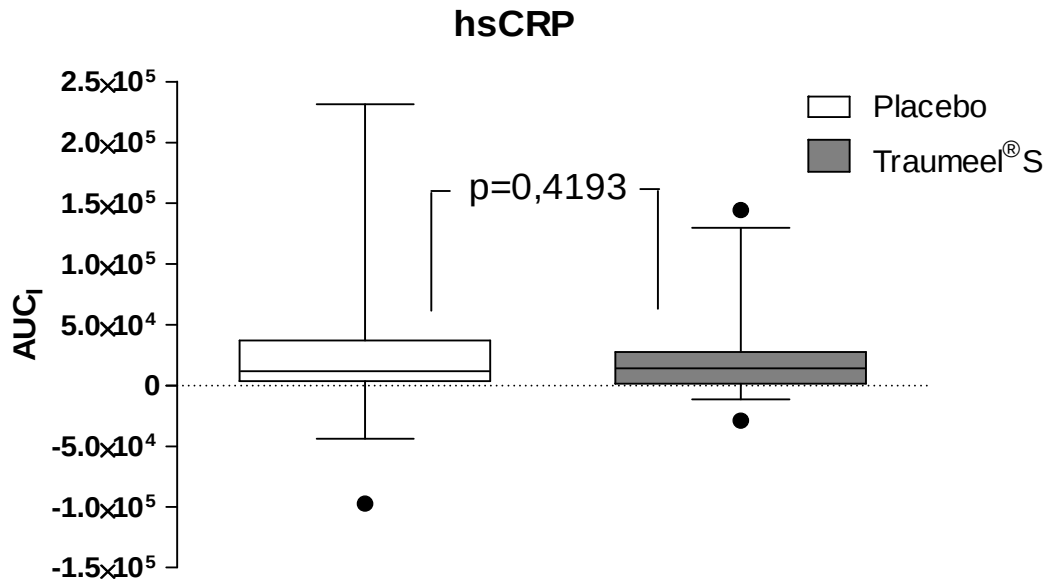



***Abb. 24**: Verteilung der $AUC_I$ von hsCRP getrennt nach Behandlungsgruppe (Whisker: 5. und 95. Perzentil, ein Ausreißer der Placebo-Gruppe von 5,6 $x10^5$ ist nicht dargestellt)*

## 6.4.5 Nebenzielgrößen

### *6.4.5.1 Muskelschaden*

Beide Behandlungsgruppen wiesen nach Belastung einen fortschreitenden Anstieg der CK-Aktivität im peripheren Blut von anfänglich 114 ± 87 U/l (Placebo) bzw. 136 ± 89 U/l

(Traumeel) bis zum jeweiligen Peak zum ZP 24h von 385 ± 783 U/l (Placebo) bzw. 379 ± 629 U/l (Traumeel, Abb. 25a) auf. Die CK-Aktivität wies in beiden Behandlungsgruppen zum ZP prä eine Spannweite von 7 326 U/l (Placebo) und 3 682 U/l (Traumeel) auf. Der Vergleich der $AUC_I$ ergab p=0,2266.

Die Aktivität von LDH stieg initital nach Belastung von eingangs 171 ± 29 U/l (Placebo) bzw. 173 ± 35 U/l (Traumeel) auf 190 ± 42 U/l bzw. 190 ± 50 U/l an und erreichte zum ZP 3h mit 197 ± 49 U/l (Placebo) und 195 ± 48 U/l (Traumeel) den jeweiligen Höchstwert. 24h nach Belastung wurde in beiden Gruppen mit 181 ± 48 U/l (Placebo) und 181 ± 47 U/l (Traumeel) eine vergleichbare LDH Aktivität detektiert (Abb. 25b). Ein Vergleich der $AUC_I$ ergab p=0,0953.

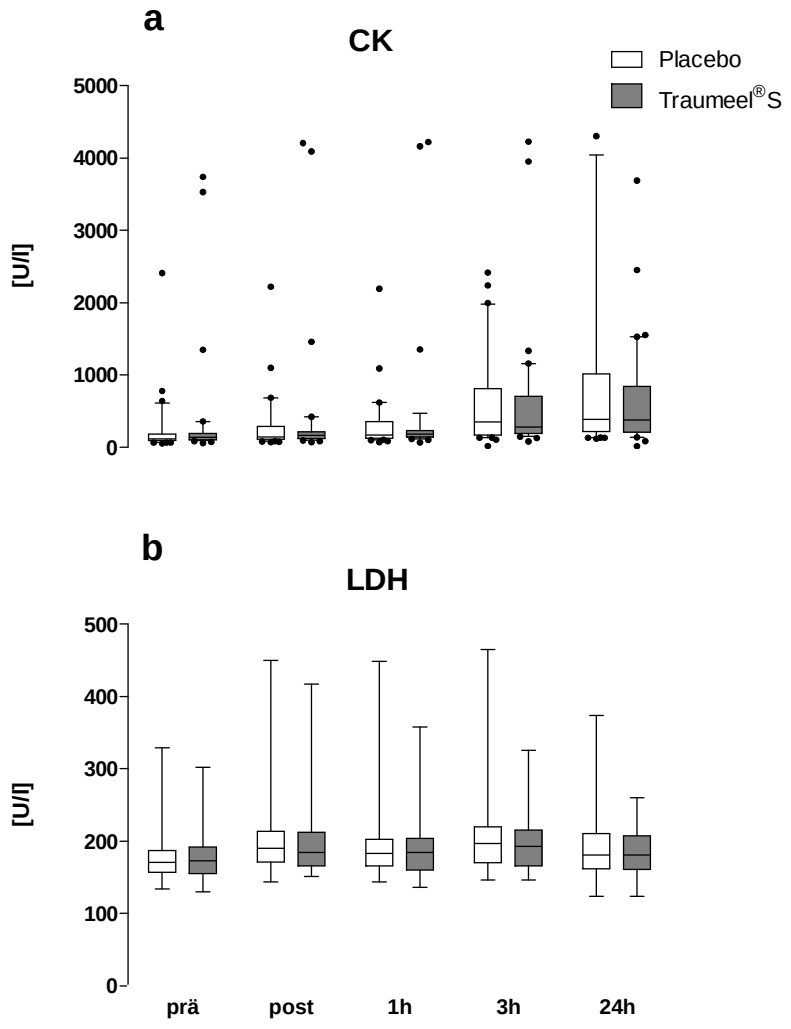



***Abb. 25**: Verlauf der Muskelschadenmarker CK (a: Whisker: 10. und 90. Perzentil) und LDH (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Die CK-Werte eines Probanden der Placebo-Gruppe (prä: 7 376, post: 9 759, 1h: 9 917, 3h: 9 287, 24h: 8 184 U/l) sind nicht dargestellt.*

***Tab. 30**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die beiden Nebenzielgrößen CK und LDH. k.NV: keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *CK* | *0,2266* | *k.NV* |
| *LDH* | *0,0953* | *k.NV* |

Beide Behandlungsgruppen unterlagen einer Abnahme der Maxkraft beider getesteter Muskelgruppen infolge der Belastung. Die $Maxkraft_{Ext}$ fiel von anfänglich 423,53 ± 107,10 Nm (Placebo) bzw. 417,97 ± 80,76 Nm (Traumeel) zum ZP post jeweils auf ein Minimum von 371,19 ± 111,64 Nm bzw. 356, 52 ± 74,67 Nm ab. Mit 394,12 ± 102,16 Nm (Placebo) bzw. 396,54 ± 80,94 Nm (Traumeel) wurde von beiden Gruppen zum ZP 24h noch nicht wieder das Ausgangsniveau erreicht (Abb. 26a). Auch die $Maxkraft_{Flex}$ unterlag in beiden Gruppen infolge der Belastung einem Kraftverlust, der zum ZP 1h in der Placebo-Gruppe und zum ZP post in der Traumeel-Gruppe am stärksten ausgeprägt war. Von anfänglich 204,40 ± 50,74 Nm (Placebo) bzw. 196,12 ± 39,27 Nm (Traumeel) erreichten die Probanden der Placebo-Gruppe zum ZP 1h eine $Maxkraft_{Flex}$ von 187,89 ± 51,24 Nm und die Probanden der Traumeel-Gruppe zum ZP post von 184,62 ± 36,48 Nm (Abb. 26b). Es konnten beim Vergleich beider Behandlungsgruppen keine auffälligen p-Werte für $Maxkraft_{Ext}$ und $Maxkraft_{Flex}$ ermittelt werden (Tab. 31).

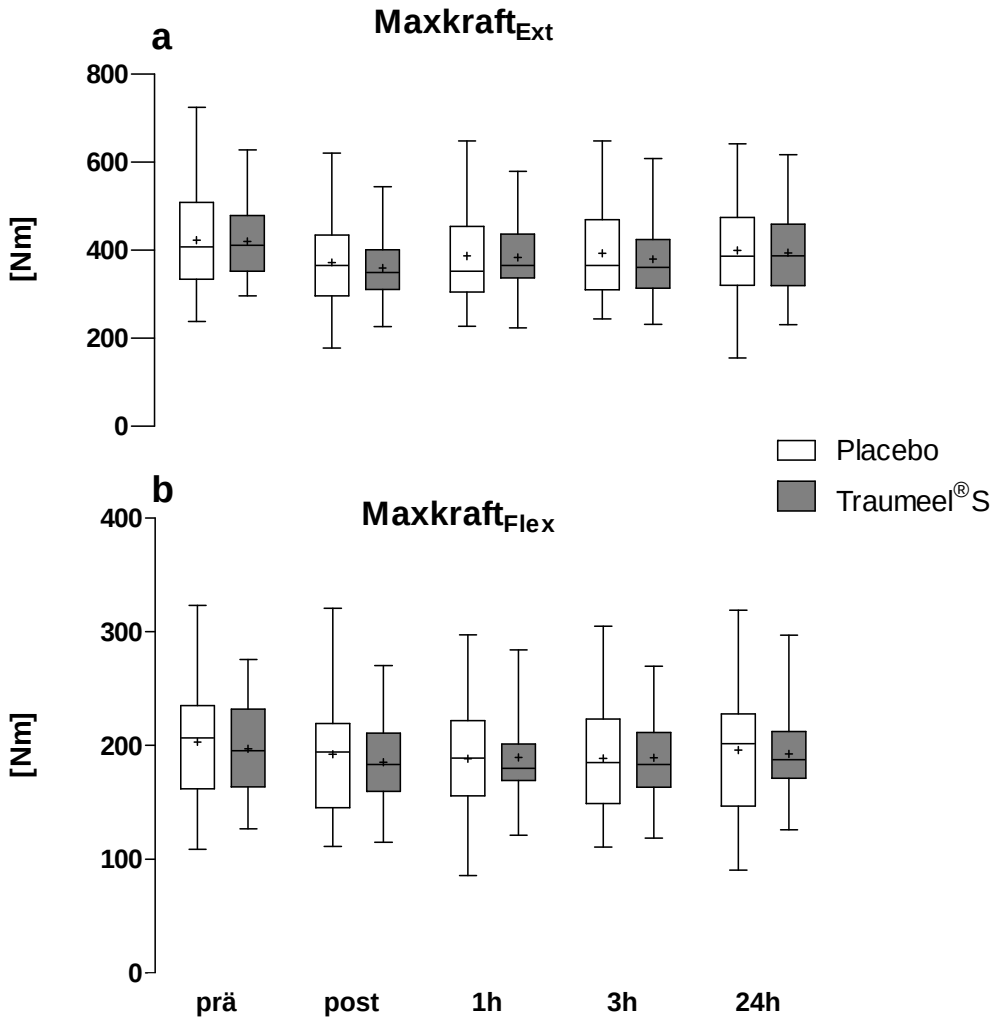



***Abb. 26**: Verlauf der Maxkraft (a: Extension, b:Flexion) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

***Tab. 31**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die beiden Nebenzielgrößen $Maxkraft_{Ext}$ und $Maxkraft_{Flex}$.*

| ***Zielgrößen*** | ***p-Wert Vergleich der $AUC_I$*** | ***p-Wert Zeitpunkt*Gruppe*** |
|---|---|---|
| *$Maxkraft_{Ext}$* | *0,3935* | *0,8232* |
| *$Maxkraft_{Flex}$* | *0,1273* | *0,4459* |

Beide Behandlungsgruppen berichteten infolge der Belastung von einem erhöhten subjektiven Schmerzempfinden. Von anfänglich (prä) 1 ± 3 (Placebo) bzw. 0 ± 2 (Traumeel) stieg der Schmerz (gesamt) zum ZP post auf 36 ± 29 bzw. 27 ± 28 in beiden Gruppen auf das jeweilige Maximum an. Infolgedessen kam es zu einem stetigen Abfall des Schmerz (gesamt), welcher zum ZP 24h mit 4 ± 7 (Placebo) bzw. 3 ± 11 (Traumeel) nur noch gering ausfiel (Abb. 27a). Einem ähnlichen Verlauf folgte Schmerz (VAS). Zunächst kam es zu einem Anstieg von eingangs 0 ± 1 (Placebo) bzw. 0 ± 2 (Traumeel) auf 24 ± 24 bzw. 18 ± 23 zum ZP post. Zum ZP 24h betrug der Schmerz (VAS) noch 2 ± 4 (Placebo) bzw. 1 ± 5 (Traumeel, Abb. 27b). Für keinen der beiden Schmerzindizes konnte ein Hinweis auf Gruppenunterschiede ermittelt werden (Tab. 32).

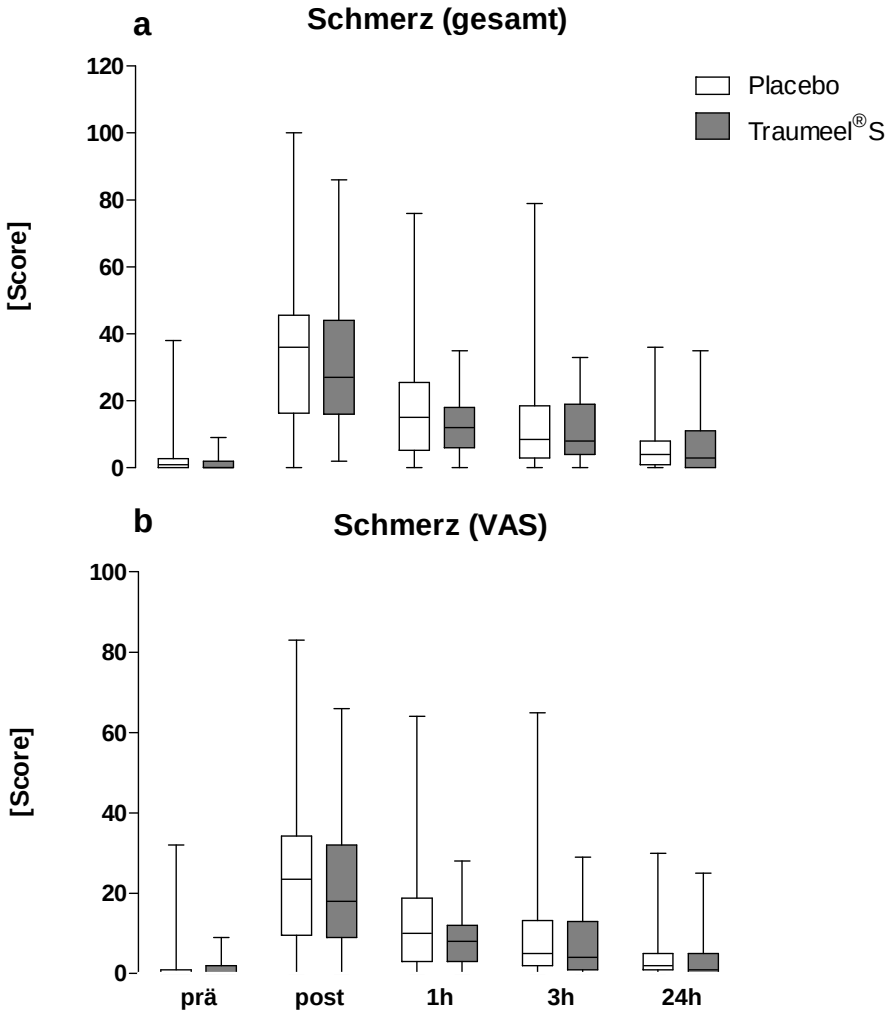



***Abb. 27**: Verlauf des Schmerzempfindens (a: gesamt, b:VAS) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: Min und Max) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

***Tab. 32**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) und für die beiden Nebenzielgrößen Schmerz (Gesamtscore) und Schmerz (VAS). k.NV keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *Schmerz (gesamt)* | *0,4785* | *k.NV* |
| *Schmerz (VAS)* | *0,4941* | *k.NV* |

### *6.4.5.2 Leukozyten*

Die Gesamtleukozytenzahl betrug vor Belastung 4,95 ± 1,10 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 5,30 ± 1,90 (x$10^6$/ml, Traumeel) und stieg in beiden Gruppen nach Belastung auf 6,53 ± 1,85 (x$10^6$/ml, +32%) bzw. 6,35 ± 2,10 (x$10^6$/ml, +20%) an (Abb. 28a). Die höchsten Gesamtleukozytenzahlen erreichten beide Behandlungsgruppen zum ZP 3h mit 8,52 ± 1,80 (x$10^6$/ml, Placebo, +72% vs prä) bzw. 8,24 ± 2,84 (x$10^6$/ml, Traumeel, +56%). Die höchsten Werte zu den ZP 3h und 24h erreichten im Einzelnen mit 15,2 (x$10^6$/ml) und 10,3 (x$10^6$/ml) zwei Probanden der Placebo-Gruppe. Die höchsten Werte zu den ZP post und 1h hingegen wiesen zwei Probanden der Traumeel-Gruppe mit 12,3 (x$10^6$/ml) und 14,1 (x$10^6$/ml) auf. Ein Vergleich der $AUC_I$ der Gesamtleukozytenzahl beider Behandlungsgruppen ergab einen statistisch auffälligen p-Wert von 0,0023 (Tab. 30).

Die Lymphozytenzahl stieg in beiden Behandlungsgruppen von ursprünglich 1,73 ± 0,59 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 1,75 ± 0,77 (x$10^6$/ml, Traumeel) auf 2,06 ± 1,01 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 1,87 ± 0,79 (x$10^6$/ml, Traumeel) an und erreichte damit jeweils zum ZP post ihren Höchstwert. Zum ZP 1h fiel die Lymphozytenzahl jedoch mit 1,42 ± 0,60 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 1,44 ± 0,43 (x$10^6$/ml, Traumeel) unter Ausgangsniveau ab (Abb. 28b). Es konnte kein Hinweis auf einen möglichen Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden (Tab. 33).

Während der Höchtswert der Monozytenzahl in der Placebogruppe mit 0,56 ± 0,22 (x$10^6$/ml) erst eine Stunde nach Belastung erreicht wurde, lag dieser mit 0,59 ± 0,27 (x$10^6$/ml) in der Traumeel-Gruppe bereits zum ZP post vor. Zum ZP 24h hatten sich beiden Gruppen mit 0,46 ± 0,21 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 0,48 ± 0,19 (x$10^6$/ml, Traumeel) wieder ihren Ausgangswerten von 0,45 ± 0,17 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 0,41 ± 0,27 (x$10^6$/ml, Traumeel) angenähert (Abb. 28c). Ein Vergleich der $AUC_I$ der Monozytenzahl beider Behandlungsgruppen ergab einen p-Wert von 0,1181 (Tab. 30).

Die Zahl der zirkulierenden Neutrophile stieg in beiden Gruppen von 2,52 ± 0,72 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 2,69 ± 1,14 (x$10^6$/ml, Traumeel) zum ZP post auf 3,49 ± 1,33 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 3,47 ± 1,38 (x$10^6$/ml, Traumeel) an. Die höchsten Werte wurden mit 6,34 ± 1,57 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 5,89 ± 3,09 (x$10^6$/ml, Traumeel) zum ZP 3h erreicht. Beim letzten Nachbeobachtungszeitpunkt (24h) waren die Neutrophile

wieder auf einem mit Ausgangsniveau vergleichbaren Niveau (2,6 ± 1,04 x$10^6$/ml, Placebo; 2,7 ± 1,45 x$10^6$/ml, Traumeel, Abb. 28d). Ein Vergleich der $AUC_I$ der Neutrophilen beider Behandlungsgruppen ergab einen statistisch auffälligen p-Wert von 0,0039 (Tab. 33).

In beiden Behandlungsgruppen war zum ZP post von eingangs 0,15 ± 0,10 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 0,16 ± 0,10 (x$10^6$/ml, Traumeel) ein Abfall der Eosinophilen zu verzeichnen, welcher zum ZP 3h am stärksten ausgeprägt war (0,07 ± 0,06 x$10^6$/ml, Placebo; 0,08 ± 0,07 x$10^6$/ml, Traumeel, Abb. 28e).

Die Anzahl der zirkulierenden Basophilen stieg in beiden Gruppen nach Belastung von 0,03 ± 0,02 (x$10^6$/ml, Placebo) bzw. 0,02 ± 0,03 (x$10^6$/ml, Traumeel) geringfügig auf 0,03 ± 0,02 (x$10^6$/ml) bzw. 0,03 ± 0,03 (x$10^6$/ml) an und war bereits eine Stunde nach Belastung in der Traumeel-Gruppe mit 0,03 ± 0,02 (x$10^6$/ml) wieder in etwa auf Ausgangsniveau bzw. in der Placebo-Gruppe mit 0,02 ± 0,01 (x$10^6$/ml) etwas unter Ausgangsniveau abgesunken (Abb. 28f). Es konnte kein statistisch auffälliger p-Wert ermittelt werden (p=0,1066, Tab. 33).

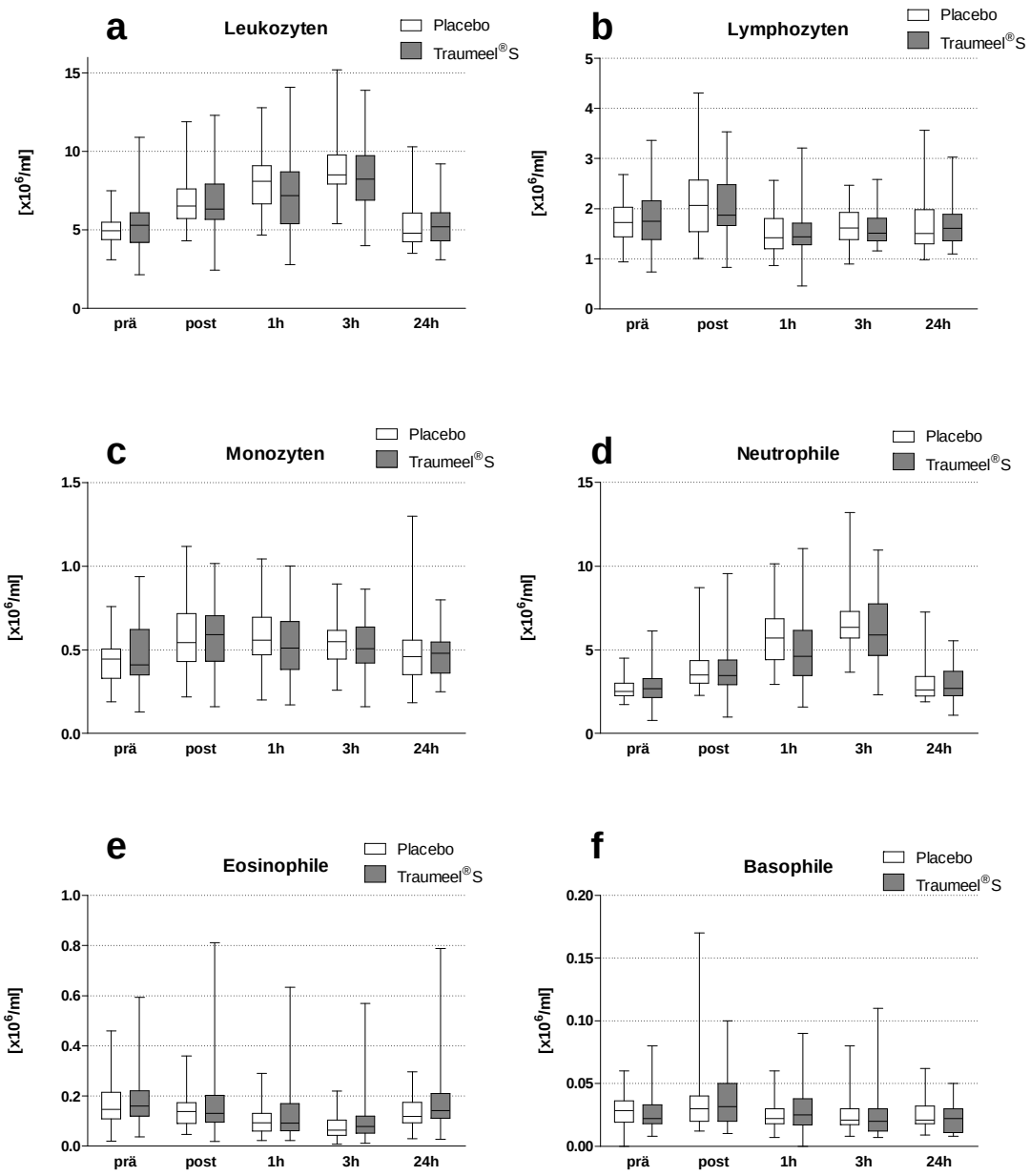



***Abb. 28**: Verlauf der Leukozyten (a: Gesamtleukozyten, b: Lymphozyten, c: Monozyten, d: Neutrophile, e: Eosinophile, f: Basophile), getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

***Tab. 33**: p-Werte der ANCOVA (Interaktionseffekt) und des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ für die Nebenzielgrößen Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Basophile und Eosinophile. k.NV: keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *Leukozyten* | ***0,0023 T<P*** | *k.NV* |
| *Lymphozyten* | *0.1181* | *k.NV* |
| *Monozyten* | *0.1181* | *k.NV* |
| *Neutrophile* | ***0.0039 T<P*** | *k.NV* |
| *Basophile* | *0.1066* | *k.NV* |
| *Eosinophile* | *0.0846* | *k.NV* |

#### *6.4.5.3 Apoptose und Aktivierung von Lymphozyten*

Während der prozentuale Anteil Annexin V positiver Lymphozyten in der Placebogruppe nach Belastung von eingangs 8,6 ± 4,6 % (0,15 ± 0,07 $x10^6$/ml) auf 9,2 ± 5,5 % (0,16 ± 0,10 $x10^6$/ml) anstieg, war in der Traumeelgruppe ein Rückgang von eingangs 9,0 ± 5,3 % (0,14 ± 0,12 $x10^6$/ml) auf 8,0 ± 5,4 % (0,17 ± 0,13 $x10^6$/ml) zu beobachten (Abb. 29a). Dennoch, die absolute Zahl Annexin V positiver Zellen stieg in beiden Gruppen zum ZP post an. Im Anschluss war in beiden Gruppen zum ZP 1h mit 0,09 ± 0,11 $x10^6$/ml (6,3 ± 6,5 %, Placebo) bzw. 0,09 ± 0,09 $x10^6$/ml (6,7 ± 6,0 %, Traumeel) ein Rückgang der absoluten Zahl Annexin V positiver Lymphozyten zu verzeichnen (Abb. 29b). Während dies in der Traumeel-Gruppe bereits das Minimum darstellte, fiel der prozentuale Anteil Annexin V positiver Lymphozyten in der Placebo-Gruppe zum ZP 3h noch weiter ab (5,6 ± 6,8 %). Ein Vergleich der Annexin V positiven Lymphozyten beider Gruppen ergab weder relativ noch absolut betrachtet eine statistische Auffälligkeit (Tab. 31).

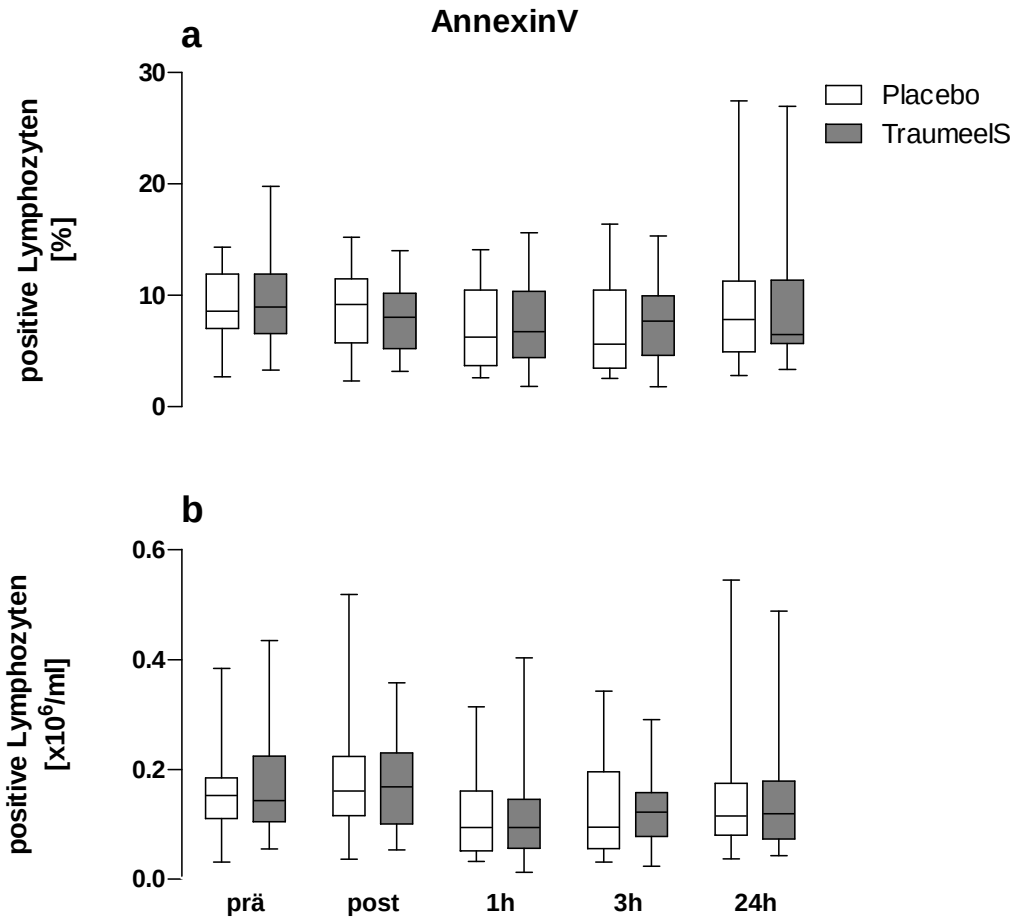



***Abb. 29**: Annexin V positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

Während in beiden Behandlungsgruppen die absolute Zahl CD62 positiver Lymphozyten von eingangs 1,09 ± 0,36 ($x10^6$/ml, Placebo) bzw. 1,09 ± 0,48 ($x10^6$/ml, Traumeel) zum ZP post auf 1,14 ± 0,46 ($x10^6$/ml) bzw. 1,13 ± 0,49 ($x10^6$/ml) anstieg (Abb.30b), kam es prozentual betrachtet in beiden Gruppen zu einem Rückgang von 61,6 ± 13,5 % auf 53,2 ± 14,5 % (Placebo) und 59,0 ± 13,8 % auf 52,4 ± 13,2 % (Traumeel). Nachfolgend stieg der prozentuale Anteil CD62 positiver Lymphozyten in beiden Gruppen wieder an, blieb jedoch in der Placebo-Gruppe bis zuletzt unter Ausgangsniveau während in der Traumeel-Gruppe zum ZP 1h ein über das Ausgangsniveau erhöhter Wert von 59,7 ± 15,3 % zu beobachten war (Abb.30a). Ein Vergleich der CD62 positiven Lymphozyten beider Gruppen ergab weder relativ noch absolut betrachtet eine statistische Auffälligkeit (Tab. 34).

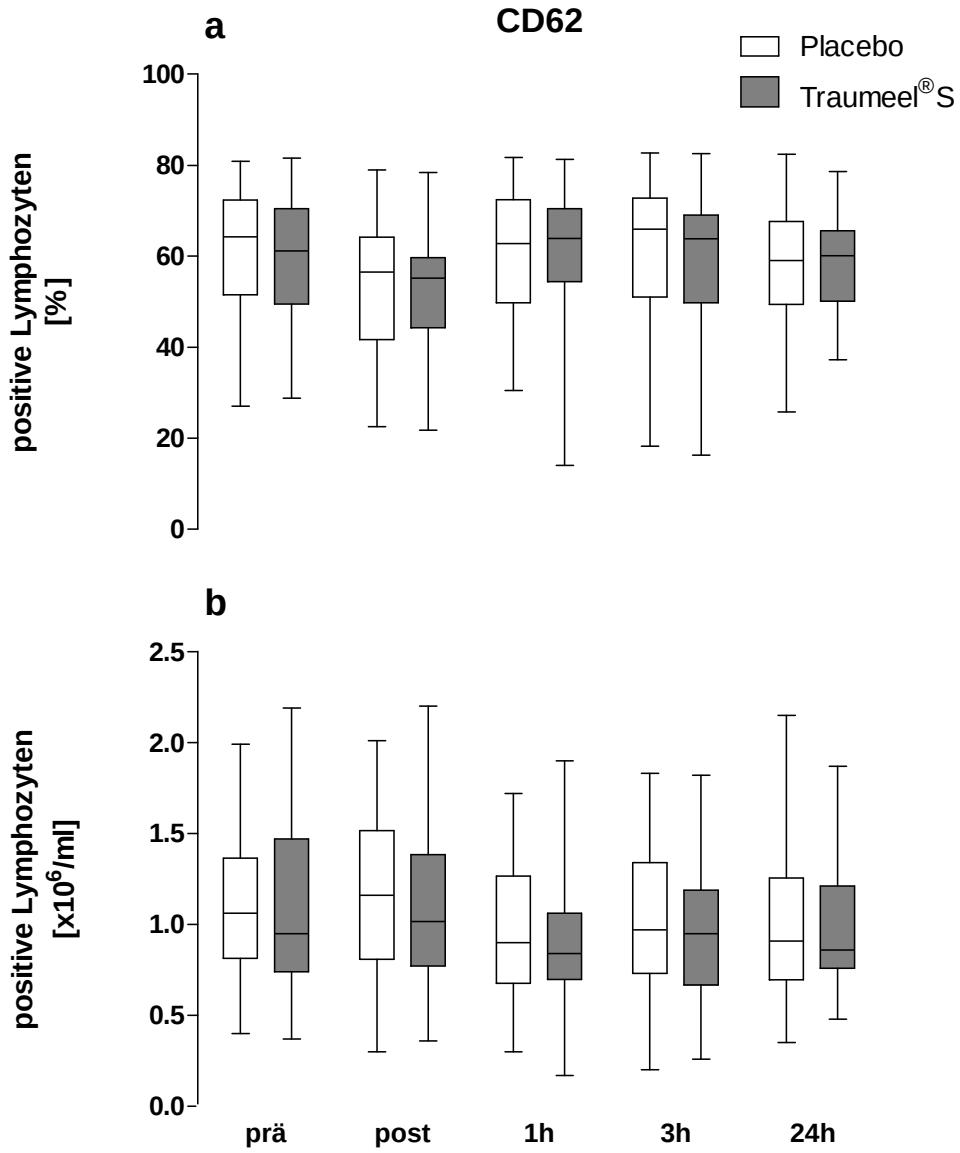



***Abb. 30**: CD62 positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

Der prozentuale Anteil CD69 positiver Lymphozyten stieg in der Placebo-Gruppe direkt nach Belastung von 0,7 ± 0,7 % zunächst auf 0,9 ± 0,7 % an und lag zu allen folgenden ZP bei 0,6 % oder darunter. In der Traumeel-Gruppe fiel der prozentuale Anteil CD69 positiver Lymphozyten mit 1,0 ± 0,7 % vor Belastung etwas höher aus und fiel stattdessen zum ZP post auf 0,8 ± 0,9 % ab. Auch hier waren die folgenden ZP von einem im Vergleich zu prä geringeren prozentualen Anteil CD69 positiver Lymphozyten (0,8% oder weniger) geprägt (Abb. 31a). Die Kinetik der absoluten Zahl CD69 positiver Lymphozyten folgte in beiden Behandlungsgruppen einem ähnlichen Verlauf. Nach

einem initialen Anstieg kam es zu einem Abfall unter Ausgangsniveau zu den ZP 1h, 3h und 24h (Abb. 31b). Der Vergleich beider Gruppen erzielte keinen statistisch auffälligen p-Wert (Tab. 34).

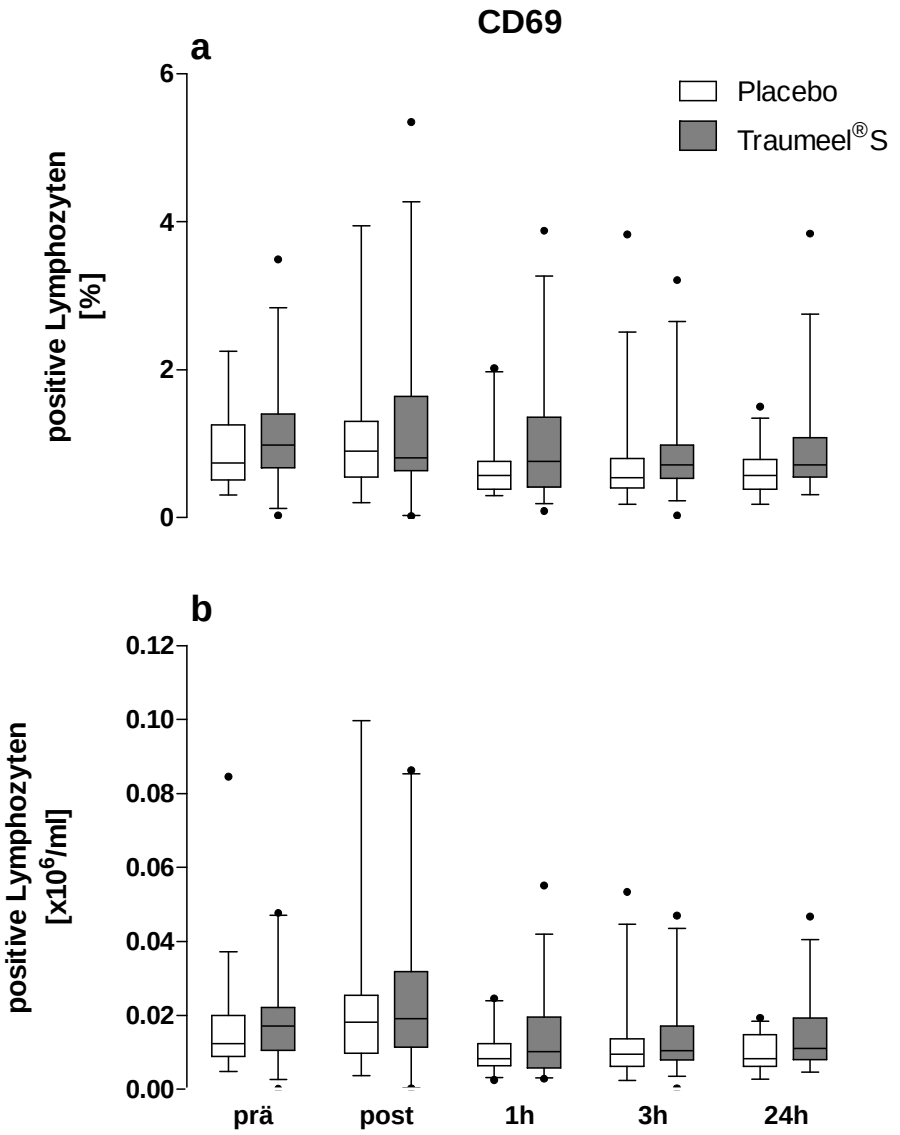



***Abb. 31**: CD69 positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Placebo-Gruppe zum ZP post mit 0,12 (x10$^6$/ml) bzw. 9,1 % ist nicht dargestellt.*

Nach Belastung stieg in beiden Gruppen der prozentuale Anteil CD95R positiver Lymphozyten kontinuierlich an und lag mit 18,1 ± 7,1 % (Placebo) bzw. 18,9 ± 6,6 %

(Traumeel) zum ZP 3h am höchsten (Abb.32a). Im Gegensatz dazu kam es bezüglich der absoluten Zahl CD95R positiver Lymphozyten von prä 0,29 ± 0,22 (x$10^6$/ml) auf post 0,36 ± 0,22 (x$10^6$/ml, Placebo) und von prä 0,32 ± 0,21 (x$10^6$/ml) auf post 0,33 ± 0,14 (x$10^6$/ml, Traumeel) in beiden Behandlungsgruppen initial nach Belastung zum höchsten Anstieg (Abb. 32b). Der Vergleich beider Gruppen erzielte keinen statistisch auffälligen p-Wert (Tab. 34).

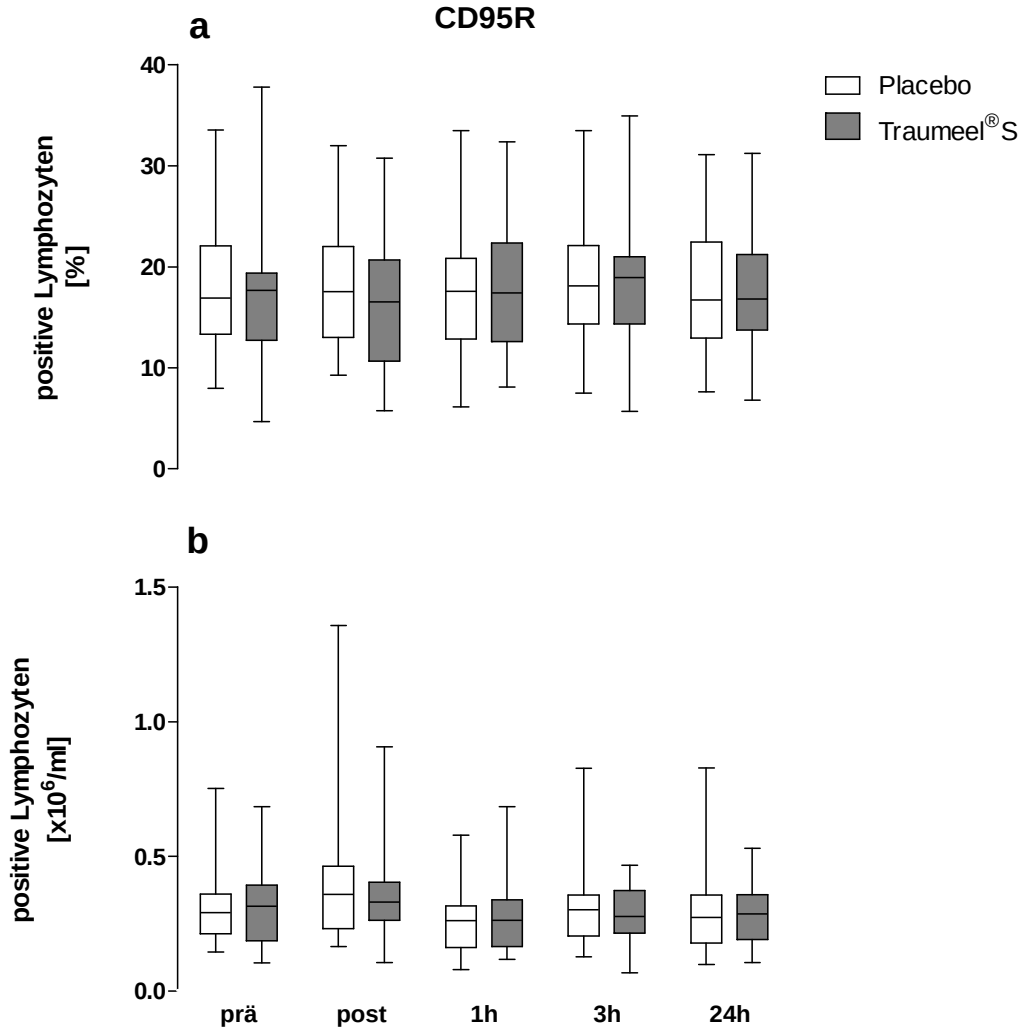



***Abb. 32**: CD95R positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

Der prozentuale Anteil CD95L positiver Lymphozyten fiel infolge der Belastung in beiden Behandlungsgruppen von prä 9,9 ± 10,4 % (Placebo) bzw. 7,2 ± 10,5 % (Traumeel) auf 6,8 ± 8,8 % bzw. 6,1 ± 8,4 % ab und war auch nachfolgend weiter

verringert. Die Placebo-Gruppe erreichte zum ZP 3h mit 4,9 ± 7,3 % und die Traumeel-Gruppe zum ZP 1h mit 4,0 ± 12,2 % ihre jeweilige niedrigste Ausprägung CD95L positiver Lymphozyten (Abb. 33a). Die absolute Zahl CD95L positiver Lymphozyten folgte einer vergleichbaren Kinetik. Auch hier war mit 0,07 ± 0,12 ($x10^6$/ml) zum ZP 3h (prä: 0,16 ± 0,17 $x10^6$/ml) in der Placebo-Gruppe und mit 0,05 ± 0,18 ($x10^6$/ml) zum ZP 1h (prä: 0,15 ± 0,16 $x10^6$/ml) in der Traumeel-Gruppe jeweils der Abfall am ausgeprägtesten (Abb.33b). Der durch einen Vergleich der $AUC_I$ ermittelte p-Wert war statistisch nicht auffällig (Tab. 34).

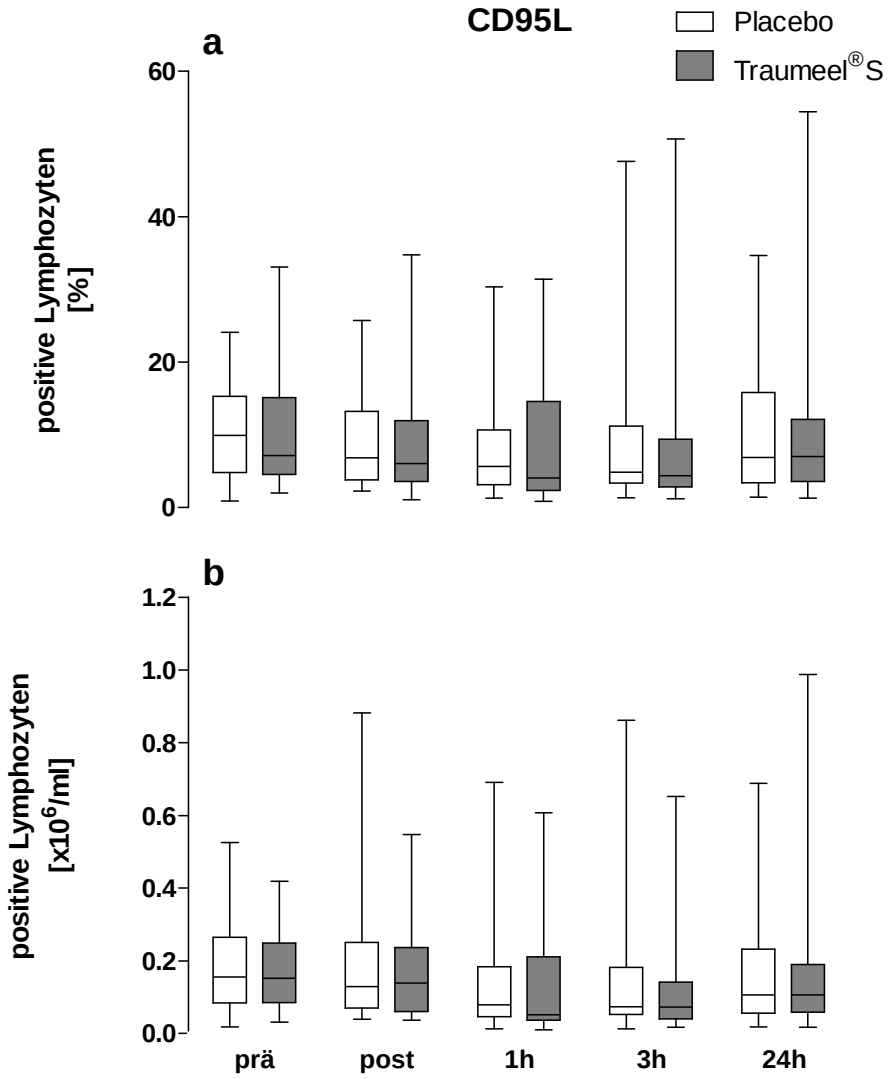



***Abb. 33**: CD95L positive Lymphozyten in Prozent aller Lymphozyten (a) sowie absolut (b) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

***Tab. 34**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen Annexin V, CD62, CD69, CD95R, und CD95L (jeweils prozentual und absolut). k.NV: keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *Annexin V [%]* | *0.3841* | *0,7161* |
| *Annexin V [Z/ml]* | *0,2263* | *0,8601* |
| *CD62 [%]* | *0.4070* | *0,6680* |
| *CD62 [Z/ml]* | *0,1981* | *0,7671* |
| *CD69 [%]* | *0.1638* | *k.NV* |
| *CD69 [Z/ml]* | *0,3539* | *k.NV* |
| *CD95R [%]* | *0.3935* | *k.NV* |
| *CD95R [Z/ml]* | *0.1012* | *k.NV* |
| *CD95L [%]* | *0.2300* | *k.NV* |
| *CD95L [Z/ml]* | *0.2831* | *k.NV* |

#### *6.4.5.4 Proinflammatorische Zytokine*

Die IL-1β Konzentration (sVBK) lag vor Belastung bei 7 685 ± 4 745 pg/ml (Placebo) bzw. 7 390 ± 5 040 pg/ml (Traumeel) und nach Belastung (post) bei 7 540 ± 6 300 pg/ml (-2%) bzw. 9 210 ± 5 530 pg/ml (+25%). Die Placebo-Gruppe erreichte mit 9 070 ± 7 110 pg/ml (+18% vs prä) zum ZP 3h und die Traumeel-Gruppe mit 9 670 ± 7 140 pg/ml (+31% vs prä) zum ZP 24h ihr jeweiliges Maximum. Zum ZP 24h lag dieser Wert in der Placebo-Gruppe bei 7 720 ± 5 270 pg/ml (± 0% vs prä, Abb. 34a). Die auf die Monozytenzahl bezogene IL-1β Konzentration (sVBK) lag eingangs bei 18,80 ± 12,30 pg/1000Mon (Placebo) bzw. 18,64 ± 13,32 pg/1000Mon (Traumeel) und fiel in der Placebo-Gruppe zum ZP 1h mit 13,12 ± 13,51 pg/1000Mon (-30%) und in der Traumeel-Gruppe zum ZP post mit 15,55 ± 8,70 pg/1000Mon (-17%) auf ein Minimum ab. Zum ZP 24h lag dieser Wert bei 17,85 ± 13,92 pg/1000Mon (Placebo, -5% vs prä) und 21,15 ± 8,94 pg/1000Mon (Traumeel, +13%, Abb. 34b). Zwischen der $AUC_I$ von IL-1β (sVBK) wurde mit 9,91 ± 2,38 $x10^7$ (Placebo) und 1,72 ± 2,64 $x10^8$ (Traumeel, Abb. 35) ein statistisch auffälliger Unterschied ermittelt (p=0,0405, Tab. 32). Auch zwischen der auf die Monozytenzahl normierten $AUC_I$ (Placebo: -1,11 ± 7,01 $x10^8$, Traumneel: 2,68 ± 5,92 $x10^8$) lag ein statistisch auffälliger Unterschied vor (p=0,0121, Abb. 36). Die Konzentration von IL-1β (Serum) lag vor Belastung bei 0,04 ± 0,13 pg/ml (Placebo) bzw. 0,04 ± 0,11 pg/ml (Traumeel) war zum ZP post mit 0,04 ± 0,13 pg/ml (Placebo) unverändert bzw. mit 0,05 ± 0,08 pg/ml (Traumeel) erhöht. In beiden Gruppen wurde mit 0,03 ± 0,13 pg/ml (Placebo, -25% vs 1h) bzw. 0,04 ± 0,10 pg/ml (Traumeel, -20% vs 1h) zum ZP 3h ein Abfall gegenüber 1h beobachtet. 24 Stunden nach Belastung lag die IL-1β (Serum) Konzentration bei 0,04 ± 0,13 pg/ml (Placebo, ±

0% vs prä) bzw. 0,03 ± 0,10 pg/ml (Traumeel, -25% vs prä, Abb. 34c). Die $AUC_I$ von IL-1β (Serum) lag bei 2,83 ± 2 533 (Placebo) bzw. 0,00 ± 2 329 (Traumeel). Es wurde eine Tendenz zu einem Gruppenunterschied ermittelt (p=0,0564, Tab. 35).

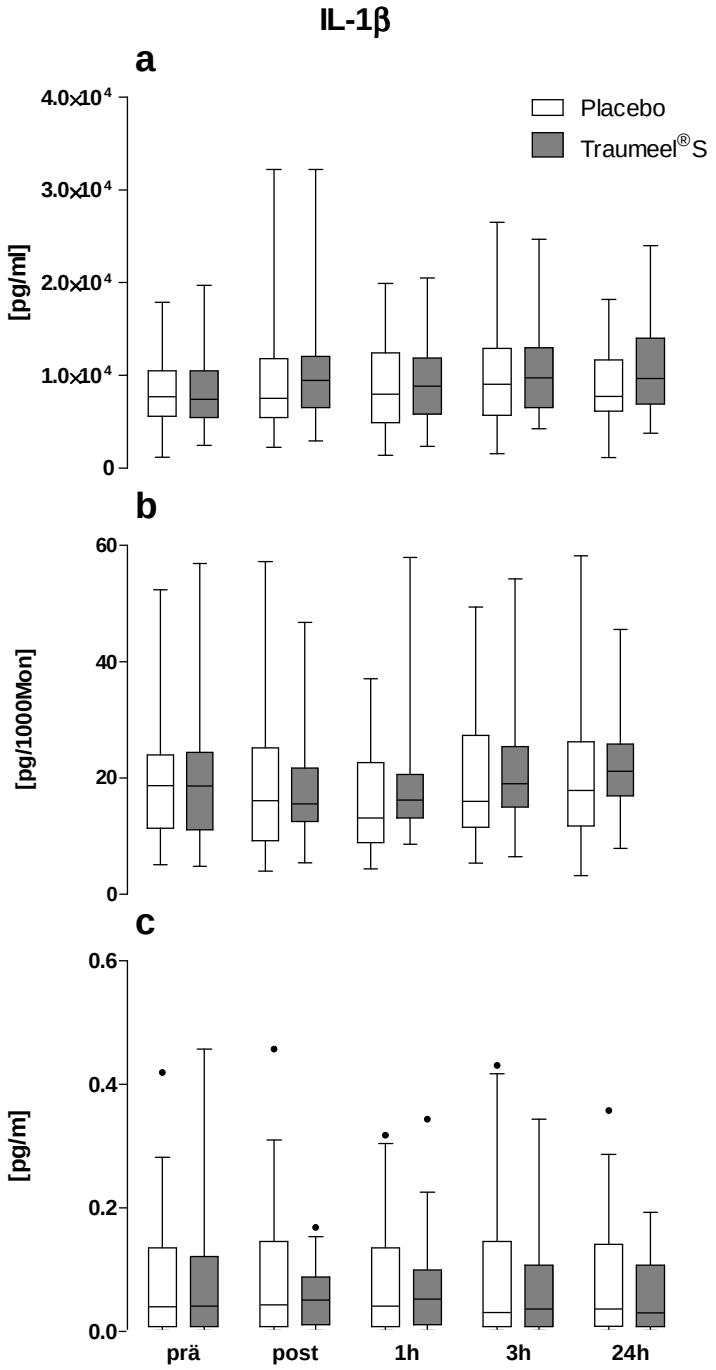



***Abb. 34**: Verlauf der Konzentration von IL-1β in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten) und im Serum (c: Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP prä von 1,27 pg/ml (Serum) nicht dargestellt*

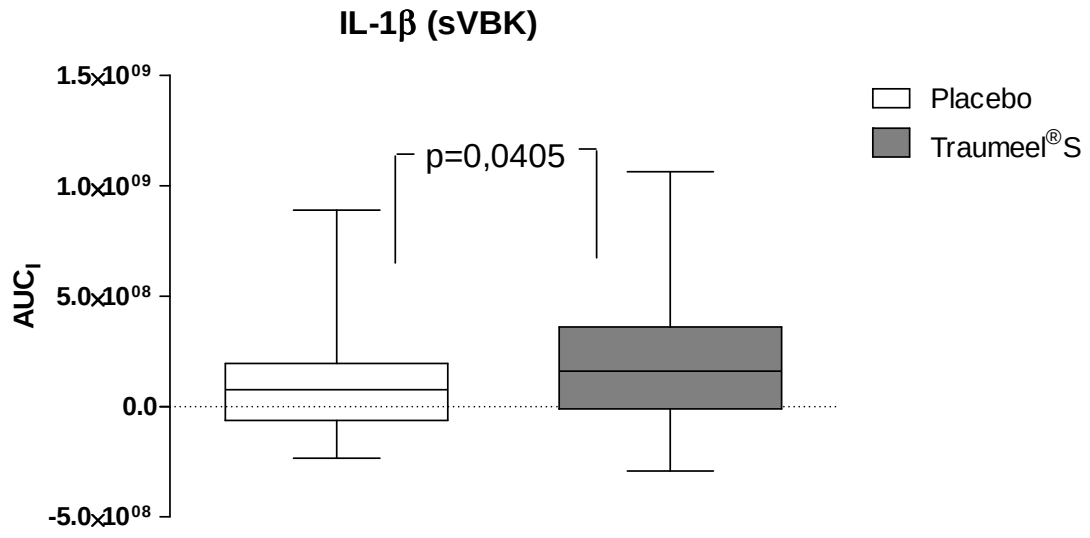



***Abb. 35**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-1β (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe*

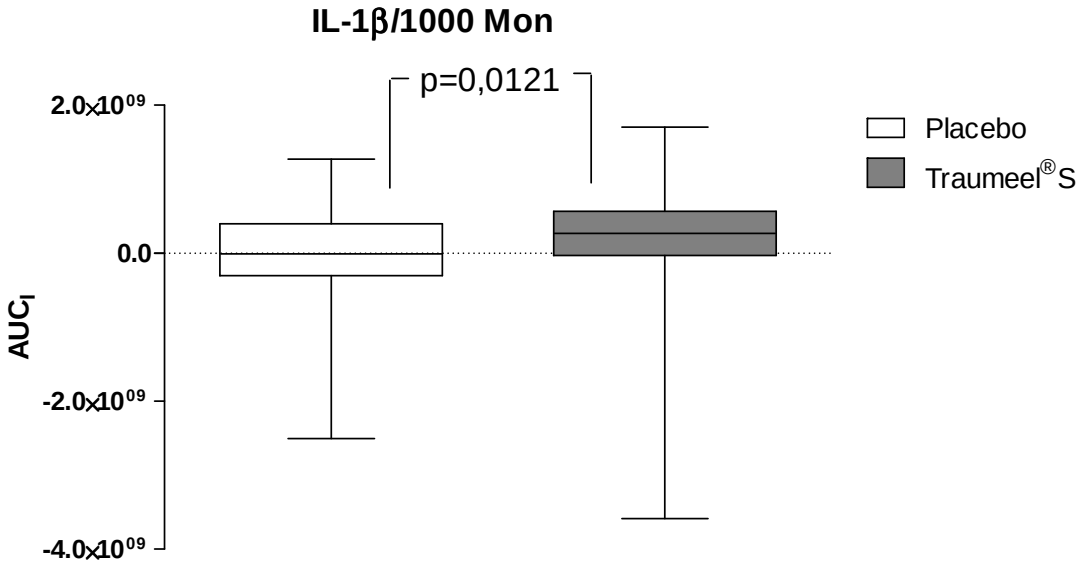



***Abb. 36**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-1β pro 1000 Monozyten getrennt nach Behandlungsgruppe*

Die mittlere Konzentration von TNF-α (sVBK) stieg in beiden Behandlungsgruppen nach Belastung an und erreichte zum Zeitpunkt 3h mit 9 453,75 ± 4 325,94 pg/ml (+19% vs prä) in der Placebo-Gruppe und mit 9 279,74 ± 4 361,12 pg/ml (+22% vs prä) in der Traumeel-Gruppe das jeweilige Maximum (Abb. 37a). Die auf die Monozytenzahl bezogene mittlere TNF-α (sVBK) Konzentration lag eingangs bei 17,11 ± 12,20 pg/1000Mon (Placebo) bzw. 16,29 ± 12,92 pg/1000Mon (Traumeel) und fiel mit 16,20 ± 9,13 pg/Mon (Placebo) bzw. 15,65 ± 6,10 pg/1000Mon (Traumeel) jeweils direkt nach Belastung am Niedrigsten aus. Zum ZP 24h lag dieser Wert bei 18,23 ± 10,95 pg/1000Mon (Placebo) bzw. 17,56 ± 12,93 pg/1000Mon (Traumeel, Abb. 37b). Die Konzentration von TNF-α (Serum) lag prä bei 2,92 ± 2,15 pg/ml (Placebo) bzw. 2,66 ± 3,22 pg/ml (Traumeel) und erreichte in der Placebo-Gruppe mit 3,27 ± 4,73 pg/ml und in der Traumeel-Gruppe zum ZP 1h mit 3,30 ± 3,61 pg/ml jeweils die höchsten Werte (Abb. 37c). Es wurde im Fall von TNF-α weder ein statistisch auffälliger p-Wert beim Vergleich der jeweiligen $AUC_I$ noch ein Hinweis auf eine Interaktion Zeipunkt*Gruppe ermittelt (Tab. 35).

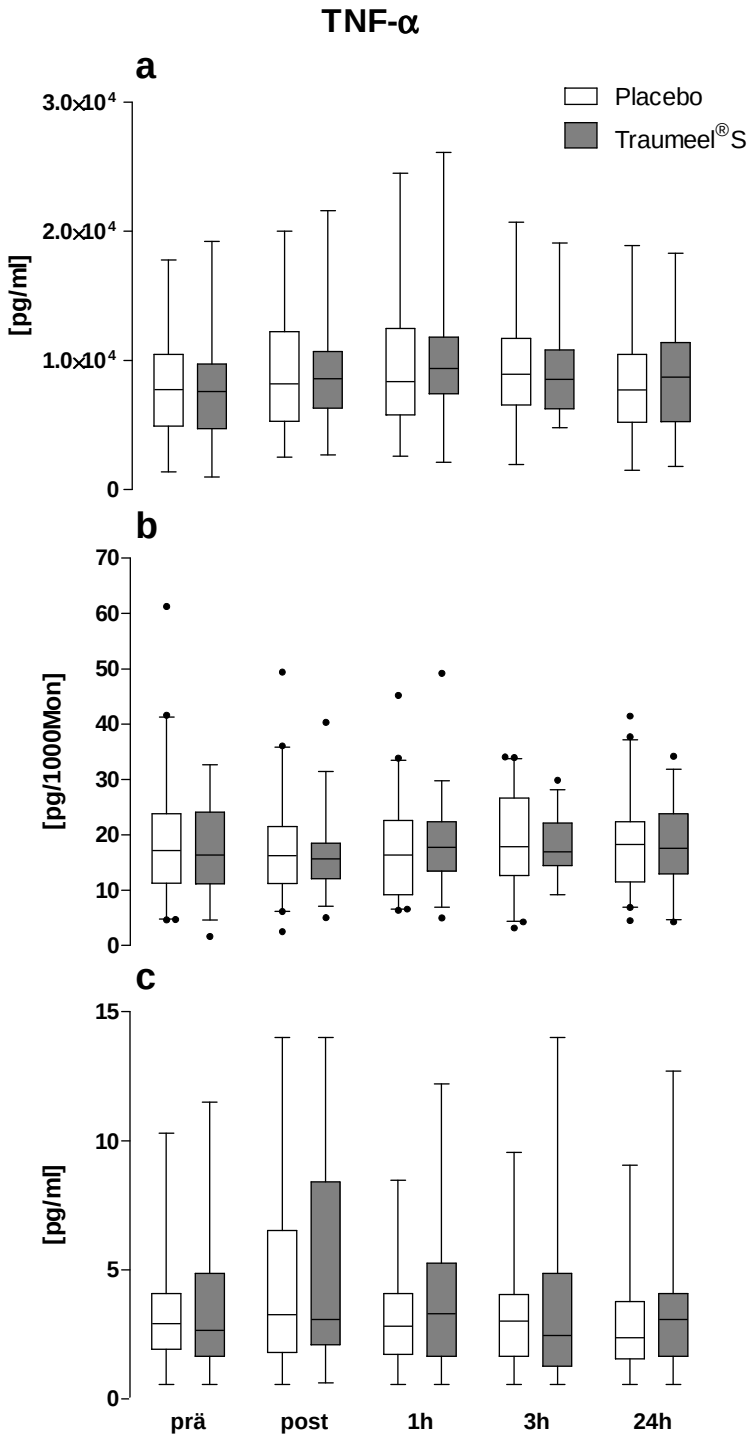



***Abb. 37**: Verlauf der Konzentration von TNF-α in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten, Whisker: 5.und 95. Perzentil) und im Serum (c) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP post von 93,85 pg/1000Mon ist nicht dargestellt.*

Die Konzentration von TNF-β (sVBK) lag vor Belastung bei 447 ± 169 pg/ml (Placebo) bzw. 446 ± 151 pg/ml (Traumeel) und post bei 467 ± 179 pg/ml (+4% vs prä) bzw. 473 ± 185 pg/ml (+6% vs prä). Während in der Traumeel-Gruppe nachfolgend im Mittel nur noch geringere Konzentrationen zu beobachten waren, lag TNF-β in der Placebo-Gruppe mit 482 ± 178 pg/ml (+8% vs prä) im Mittel zum ZP 3h am höchsten vor (Abb. 38). Es konnten keine statistisch auffälligen p-Werte für TNF-β ermittelt werden (Tab. 35).

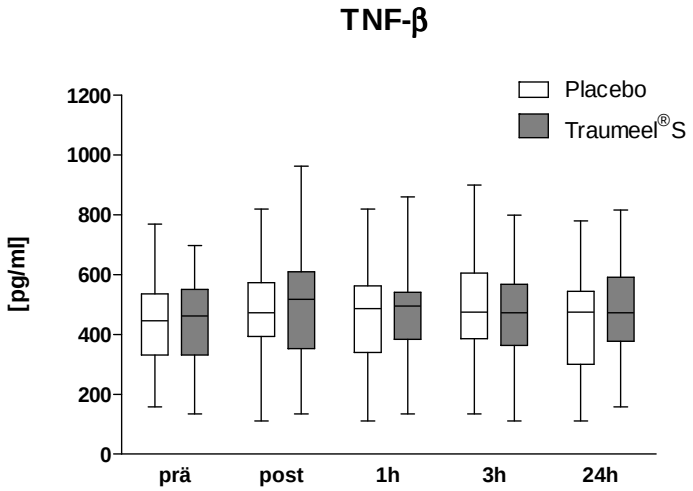



***Abb. 38**: Verlauf der Konzentration von TNF-β (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung*

Die mittlere Konzentration von IL-1α (sVBK) lag prä bei 0,74 ± 0,53 pg/ml (Placebo) bzw. 0,72 ± 0,71 pg/ml (Traumeel) und mit 0,90 ± 0,71 pg/ml in der Placebo-Gruppe zum ZP 3h (+22% vs prä) und mit 1,00 ± 1,42 pg/ml (+39% vs prä) in der Traumeel-Gruppe zum ZP post am höchsten vor (Abb. 39). Der Wilcoxon-Test der $AUC_I$ ergab p=0,0523 (Tab. 35).

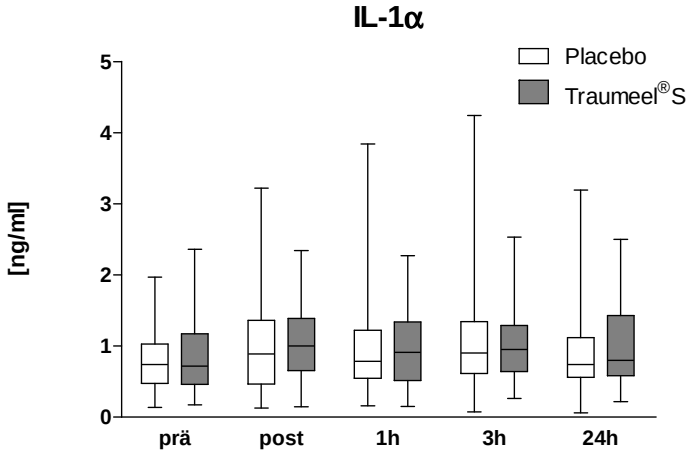



***Abb. 39**: Verlauf der Konzentration von IL-1α (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung*

***Tab. 35**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-1α, IL-1β, TNF- α und TNF- β (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: keine Normalverteilung*

| ***Zielgrößen*** | ***p-Wert Vergleich der $AUC_I$*** | ***p-Wert Zeitpunkt*Gruppe*** |
|---|---|---|
| *IL-1α* | *0,0523* | *k.NV* |
| *IL-1β (sVBK)* | ***0,0405 T>P*** | *k.NV* |
| *IL-1β (pro Mon)* | ***0.0121 T>P*** | *k.NV* |
| *IL-1β (Serum)* | *0,0564* | *k.NV* |
| *TNF- α (sVBK)* | *0,1848* | *0.6894* |
| *TNF- α (pro Mon)* | *0.0943* | *k.NV* |
| *TNF- α (Serum)* | *0,2765* | *k.NV* |
| *TNF- β* | *0,4396* | *0.1884* |

#### *6.4.5.5 Inflammationsregulierende und antiinflammatorische Zytokine*

Die um die Monozytenzahl korrigierte Konzentration von IL-6 stieg in beiden Gruppen infolge der Belastung zum ZP post von prä 175 ± 79 pg/1000Mon auf 187 ± 91 pg/ml (Placebo) bzw. prä 146 ± 116 pg/1000Mon auf 180 ± 105 pg/1000Mon (Traumeel) an. Während die Placebo-Gruppe nachfolgend geringere auf Monozytenzahl bezogene IL-6 Konzentrationen aufwies stieg dieser Wert in der Traumeel-Gruppe weiter bis zum ZP 3h (185 ± 65 pg/1000Mon) an (Abb. 40a). Die Konzentration von IL-6 (Serum) erfuhr in beiden Behandlungsgruppen durch Belastung mehr als eine Verdreifachung und fiel von ZP post bis ZP 24h stetig in beiden Gruppen wieder ab. Die Veränderung von IL-6 (Serum) zwischen post und 24h war insbesondere in der Traumeel-Gruppe

von einer enormen Spannweite der oberen 50% der Werte gekennzeichnet (Abb. 40b). Weder für IL-6 (sVBK) pro Monozyt noch für IL-5 (Serum) konnte ein statistisch auffälliger p-Wert beim Vergleich der jeweiligen $AUC_I$ oder eine Interaktion Zeipunkt*Gruppe ermittelt werden (Tab. 36).

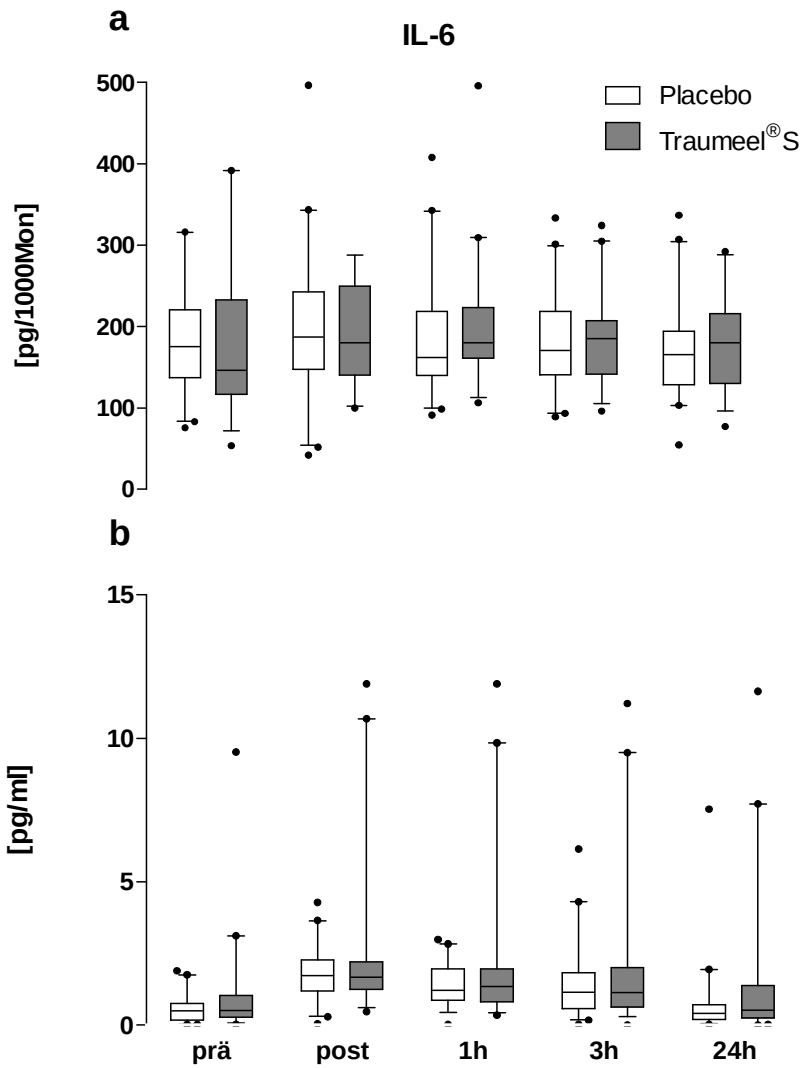



***Abb. 40**: Verlauf der Konzentration von IL-6 (sVBK) (a: normiert auf die Zahl der Monozyten ) und im Serum (b) (Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Nicht dargestellt sind folgende Ausreißer: Traumeel zum ZP prä von 712 pg/1000Mon und post 568 pg/1000Mon, Placebo zum ZP prä 599 pg/1000Mon*

Die Konzentration von IL-1ra (sVBK) lag vor Belastung bei 8 860 ± 5 685 pg/ml (Placebo) bzw. 7 800 ± 8 180 pg/ml (Traumeel), stieg post auf 13 450 ± 9 325 pg/ml (+52% vs prä) bzw. 12 600 ± 9 690 pg/ml (+62% vs prä) an und hatte sich bereits zum

ZP 1h in beiden Gruppen mit 17 300 ±14 350 pg/ml (+95% vs prä) bzw. 15 000 ± 9 400 pg/ml (+92% vs prä) im Vergleich zu prä fast verdoppelt. Die höchsten Werte wiesen beide Gruppen zum ZP 3h auf. Mit 8 320 ± 7 550 pg/ml (Placebo) und 8 920 ± 5 940 pg/ml waren die IL-1ra Konzentrationen nahezu wieder auf Ausgangsniveau (Abb. 41a). Einer ähnlichen Kinetik wie in sVBK folgte IL-1ra (Serum). Auch hier lagen in beiden Gruppen zum ZP 3h mit 70 ± 59 pg/ml vs prä 55 ± 37 pg/ml (Placebo) und mit 64 ± 65 pg/ml vs prä 48 ± 45 pg/ml (Traumeel) die höchsten gemessenen Konzentrationen vor (Abb. 41b). Weder für IL-1ra (sVBK) noch für IL-1ra (Serum) konnte ein statistisch auffälliger p-Wert beim Vergleich der jeweiligen $AUC_I$ oder eine Interaktion Zeipunkt*Gruppe ermittelt werden (Tab. 36).

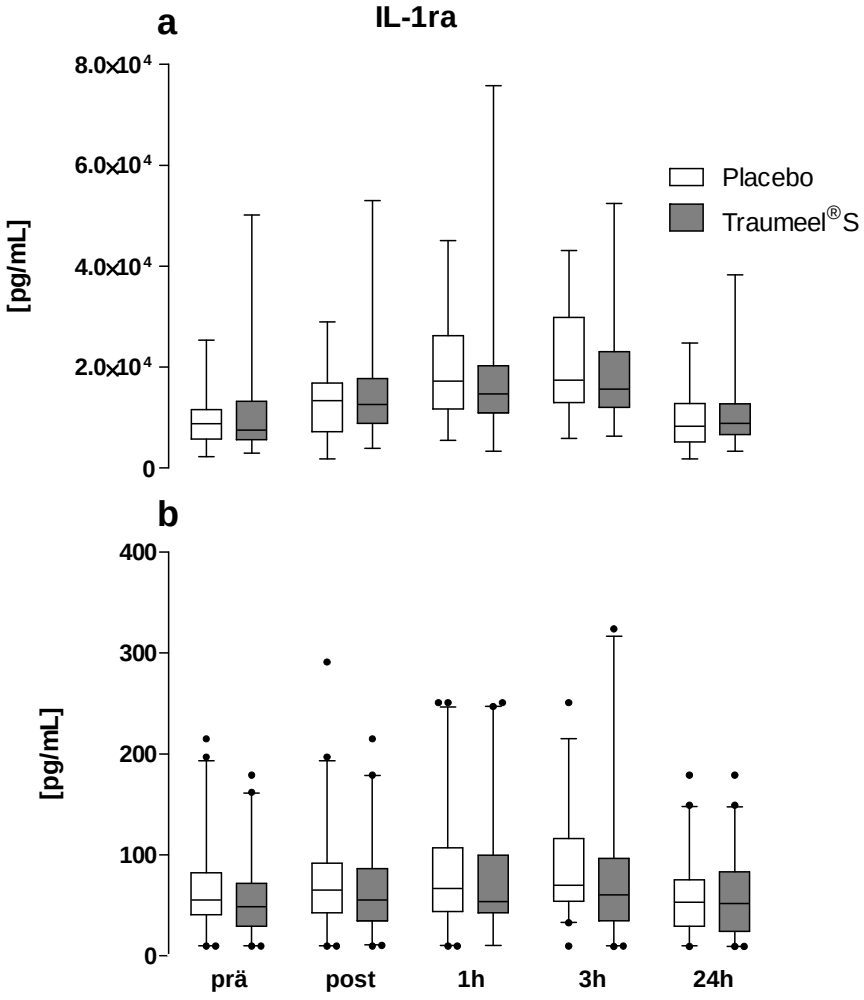



***Abb. 41**: Verlauf der Konzentration von IL-1ra in sVBK (a) und im Serum (b: Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP 3h von 552 pg/ml im Serum nicht dargestellt*

Die Konzentration von IL-10 (sVBK) stieg in beiden Gruppen nach Belastung an und erreichte mit 1 225 ± 645 pg/ml vs prä 857 ± 807 pg/ml (Placebo) und mit 1 180 ± 963 pg/ml vs prä 913 ± 1005 pg/ml (Traumeel) zum ZP 1h den jeweiligen höchsten Wert (Abb. 42). Der Vergleich der $AUC_I$ ergab p=0,0865 (Tab. 33).

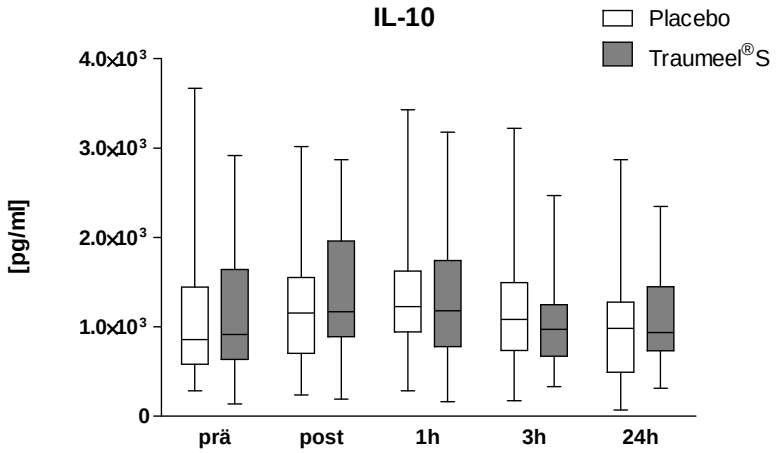



***Abb. 42**: Verlauf der Konzentration von IL-10 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

***Tab. 36**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-1ra, IL-6 und IL-10 (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: keine Normalverteilung*

| ***Zielgrößen*** | ***p-Wert Vergleich der $AUC_I$*** | ***p-Wert Zeitpunkt*Gruppe*** |
|---|---|---|
| *IL-1ra (sVBK)* | *0,1448* | *k.NV* |
| *IL-1ra (Serum)* | *0,3403* | *k.NV* |
| *IL-6 (Serum)* | *0,4074* | *k.NV* |
| *IL-6 (pro 1000Mon)* | *0,0600* | *k.NV* |
| *IL-10* | *0,0865* | *k.NV* |

#### *6.4.5.6 Chemokine*

Während die mittlere Konzentration von CCL2 (sVBK) vor Belastung bei 9 680 ± 8 015 pg/ml (Placebo) bzw. 7 980 ± 9 160 pg/ml (Traumeel) lag, wurde zum ZP post eine mittlere Konzentration von 15 900 ± 14 480 pg/ml (+64% vs prä) bzw. 14 700 ± 10 840 pg/ml (+84% vs prä) beobachtet. Zum ZP 3h wies die Placebo-Gruppe eine Konzentration von 14 450 ± 10 870 pg/ml (+49% vs prä) und die Traumeel-Gruppe eine Konzentration von 10 500 ± 12 100 pg/ml (+32% vs prä) auf (Abb. 43a).

Die auf die Anzahl der Monozyten normierte Konzentration von CCL2 lag vor Belastung bei 24,17 ± 18,90 pg/1000 Mon (Placebo) und 19,08 ± 24,01 pg/1000 Mon (Traumeel) und erreichte zum ZP 3h mit 28,29 ± 20,44 pg/1000 Mon in der Placebo- und zum ZP post mit 28,19 ± 22,88 pg/1000 Mon in der Traumeel Gruppe den Höchstwert (Abb. 43b). Die mittlere Konzentration von CCL2 (Serum) wies in beiden Behandlungsgruppen zum ZP post ein Maximum auf. 24 Stunden nach Belastung lagen beide Gruppen mit 179 ± 265 pg/ml (Placebo) und 231 ± 127 pg/ml unter ihrem jeweiligen Ausgangsniveau (P : 218 ± 284 pg/ml und T :276 ± 192 pg/ml, Abb. 43c). Weder für CCL2 (sVBK) noch für CCL2 (Serum) wurde ein statistisch auffälliger Unterschied der $AUC_I$ noch ein Hinweis auf einen Interaktionseffekt (Zeitpunkt*Gruppe) gefunden (Tab. 37).

Die Konzentration von CCL3 (sVBK) stieg in beiden Gruppen nach Belastung an und erreichte zum ZP 1h mit 64 750 ± 26 250 pg/ml (Placebo) und 60 000 ± 31 700 pg/ml (Traumeel) jeweils ein Peak. Zum ZP 24h lag in beiden Gruppen wieder eine mit dem Ausgangsniveau vergleichbare Konzentration vor (Abb. 44a). Während der Anstieg von CCL4 (sVBK) in der Placebo-Gruppe direkt nach Belastung mit 634 500 ± 273 500 pg/ml gegenüber 451 500 ± 221 000 pg/ml (prä) am ausgeprägtesten war, erreichte die Traumeel Gruppe mit 552 000 ± 313 000 pg/ml gegenüber 410 000 ± 217 000 pg/ml (prä) zum ZP 1h ihr Maximum (Abb. 44b). Auch CXCL8 (sVBK) stieg in beiden Behandlungsgruppen nach Belastung an und lag zum ZP 3h mit 82 900 ± 42 950 pg/ml (Placebo) und 73 500 ± 60 300 pg/ml (Traumeel) jeweils am höchsten vor (Abb. 44c). Für keins der drei zuletzt genannten Chemokine konnten Hinweise auf Gruppenunterschiede gefunden werden.

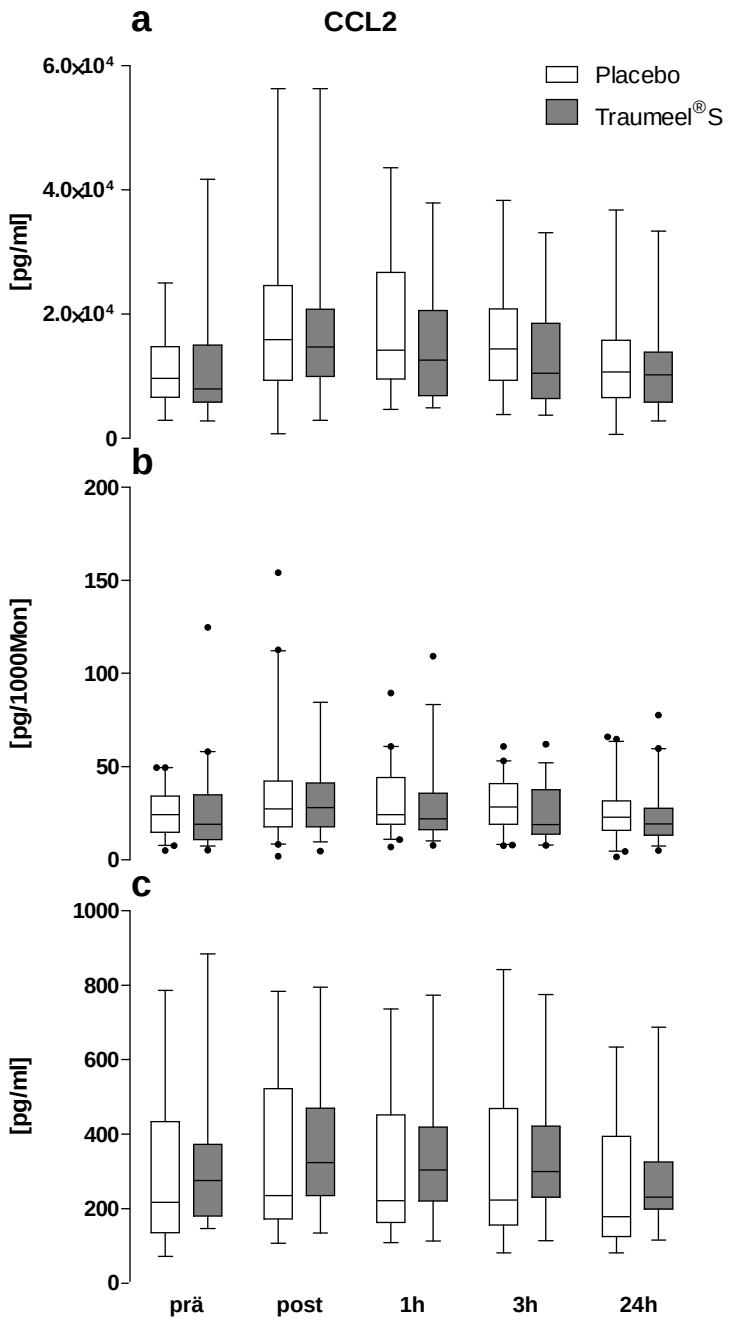



***Abb. 43**: Verlauf der Konzentration von CCL2 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Monozyten, Whisker: 5.und 95. Perzentil) und im Serum (c) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Ein Ausreißer der Gruppe Traumeel zum ZP post von 35,19 pg/1000Mon ist nicht dargestellt*

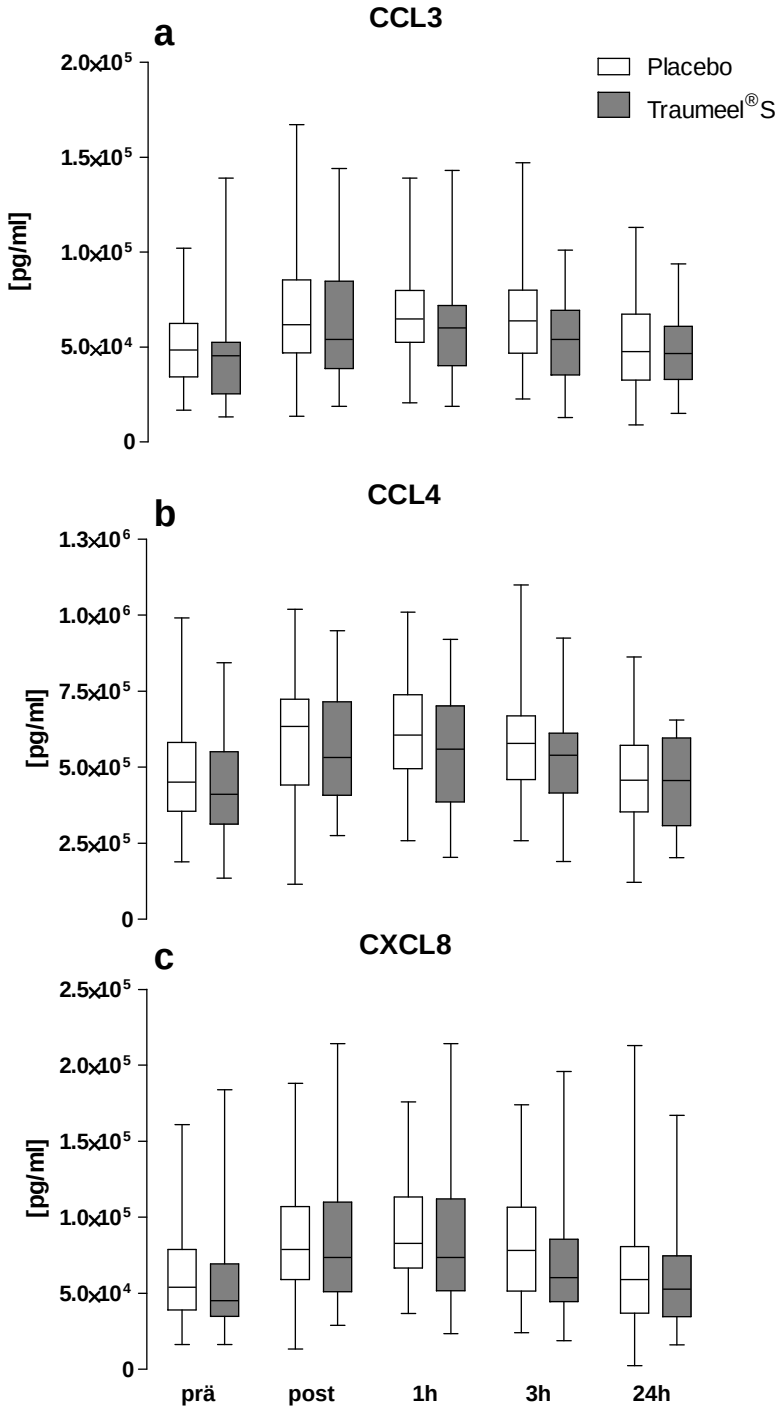



***Abb. 44**: Verlauf der Konzentration von CCL3 (a), CCL4 (b)und CXCL8 (c) in sVBK getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

Die mittlere Konzentration von CXCL8 (Serum) stieg mit 9,11 ± 5,26 pg/ml gegenüber 7,32 ± 4,14 pg/ml (Placebo, +24%) bzw. 10,38 ± 5,20 pg/ml gegenüber 9,26 ± 5,45 pg/ml (Traumeel, +12%) in beiden Behandlungsgruppen direkt nach Belastung jeweils auf ein Peak an und fiel nachfolgend stetig ab. Bereits zum ZP 3h wiesen beide Gruppen mit 7,52 ± 3,96 pg/ml (Placebo, +2,7% vs prä) bzw. 9,45 ± 5,57 pg/ml (Traumeel, +2,1% vs prä) ein mit der Vorbelastungskonzentration vergleichbares Niveau auf (Abb. 45). Es lagen keine Hinweise auf Gruppenunterschiede vor (Tab. 37).

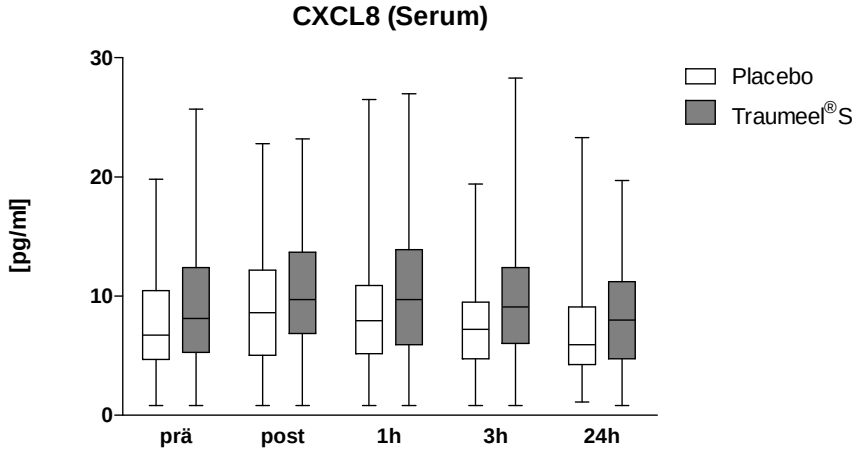



***Abb. 45**: Verlauf der Konzentration von CXCL8 (Serum) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

***Tab. 37**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL8 (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch im Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: Keine Normalverteilung*

| Zielgrößen | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *CCL2 (sVBK)* | *0,0707* | *k.NV* |
| *CCL2 (pro Mon)* | *0,2192* | *k.NV* |
| *CCL2 (Serum)* | *0,4185* | *k.NV* |
| *CCL3* | *0,3190* | *0,2906* |
| *CCL4* | *0,4261* | *0,5761* |
| *CXCL8 (sVBK)* | *0,3919* | *k.NV* |
| *CXCL8 (Serum)* | *0,1784* | *0,4361* |

### *6.4.5.7 Kolonie-stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren*

Die Konzentration von GM-CSF (sVBK) nahm in beiden Behandlungsgruppen nach Belastung ab. In der Placebo-Gruppe kam es zu einem Abfall um ca. 30% von ursprünglich 71,65 ± 185,10 pg/ml auf 50,30 ± 167,70 pg/ml zum ZP 1h. In der Traumeel-Gruppe war die Konzentration von GM-CSF zum gleichen ZP um ca. 13% reduziert (119,00 ± 138,10 pg/ml vs prä : 137,00 154,80 pg/ml). Zum ZP 24h war die Konzentration von GM-CSF wiederum um etwa 10% vs prä (Placebo) erhöht bzw. auf Ausgangsniveau (+1%, Traumeel, Abb. 46). Es wurden keine statistisch auffälligen Unterschiede ermittelt (Tab. 38).

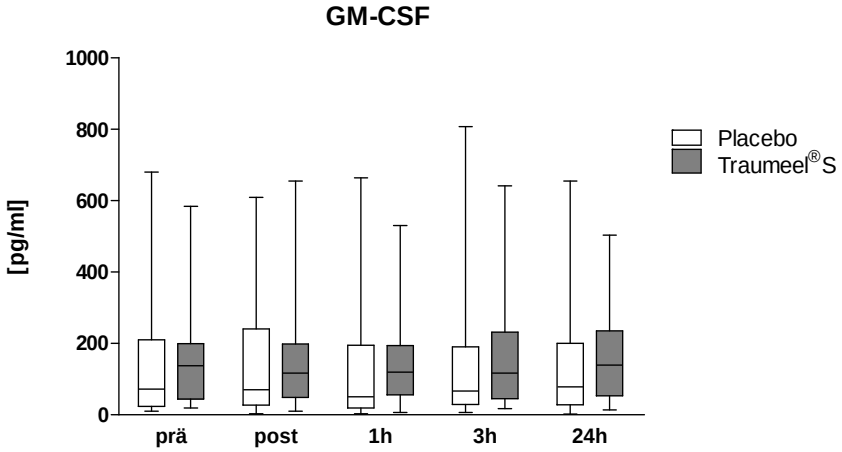



***Abb. 46**: Verlauf der Konzentration von GM-CSF (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

Nach Belastung kam es zu einem verzögerten Anstieg der mittleren Konzentration von SCF (sVBK). Beide Gruppen wiesen zum ZP 3h mit 314,00 ± 192,00 pg/ml (+25%, Placebo) und 280,00 ± 160 pg/ml (+20%, Traumeel) die höchsten Werte auf. Während zum ZP 24h in der Placebo-Gruppe mit 228,00 ± 163,50 pg/ml eine geringere Konzentration als zum ZP prä (-9%) beobachtet wurde, war SCF (sVBK) in der Traumeel-Gruppe mit 255,00 ± 193 pg/ml (+9%) nach wie vor erhöht (Abb. 47). Es lag kein Hinweis auf Gruppenunterschiede vor (Tab. 38).

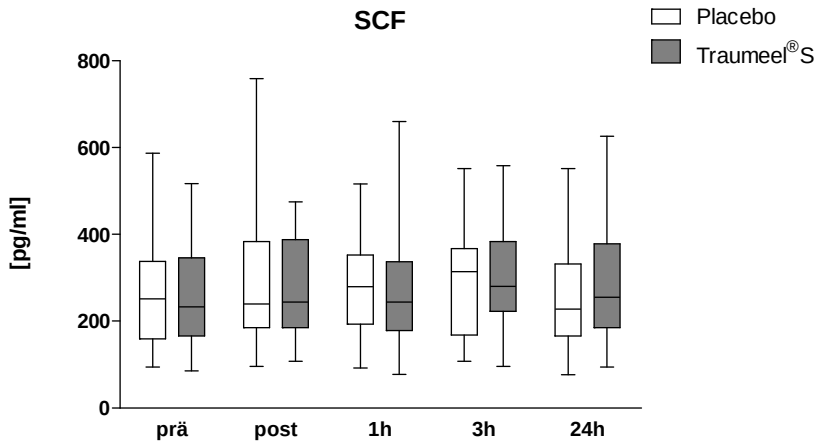



***Abb. 47**: Verlauf der Konzentration von SCF (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

***Tab. 38**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen BDNF, GM-CSF, SCF und VEGF. k.NV: keine Normalverteilung*

| Zielgrößen | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *GM-CSF* | *0,0776* | *k.NV* |
| *SCF* | *0,2107* | *k.NV* |

### *6.4.5.8 $T_H$1-Zytokine*

Die mittlere Konzentration von IFN-γ (sVBK) war in beiden Behandlungsgruppen zum ZP post um 3% (Placebo) bzw. 30% (Traumeel) erhöht und erreichte damit in der Traumeel-Gruppe zugleich das Maximum. Dieses lag in der Placebo-Gruppe zum ZP 24h vor (+12% vs prä). In beiden Gruppen wurde zum ZP 1h mit 2 130 ± 7 482 pg/ml (Placebo) bzw. 4 500 ± 5 910 pg/ml (Traumeel) gegenüber prä 4 415 ± 12 095 pg/ml (Placebo) bzw. 5 760 ± 10 640 pg/ml (Traumeel) ein Abfall von IFN-γ um -52% (Placebo) und -22% (Traumeel) beobachtet. Zu den ZP 3h und 24h stieg IFN-γ wieder in beiden Gruppen an (Abb. 48a). Die Konzentration von IFN-γ pro Lymphozyt folgte in der Placebo-Gruppe einem U-förmigen Verlauf. Hier war der Abfall zum ZP 1h am deutlichsten ausgeprägt (-29% vs prä). In der Traumeel-Gruppe wiederum wurde zunächst ein Anstieg zum ZP post beobachtet (+19%). Zum ZP 1h wurde auch in der Traumeel-Gruppe ein geringfügiger Abfall von -2% vs prä beobachtet, welcher sich bis zum ZP 3h fortsetzte (-16% vs prä, Abb. 48b).

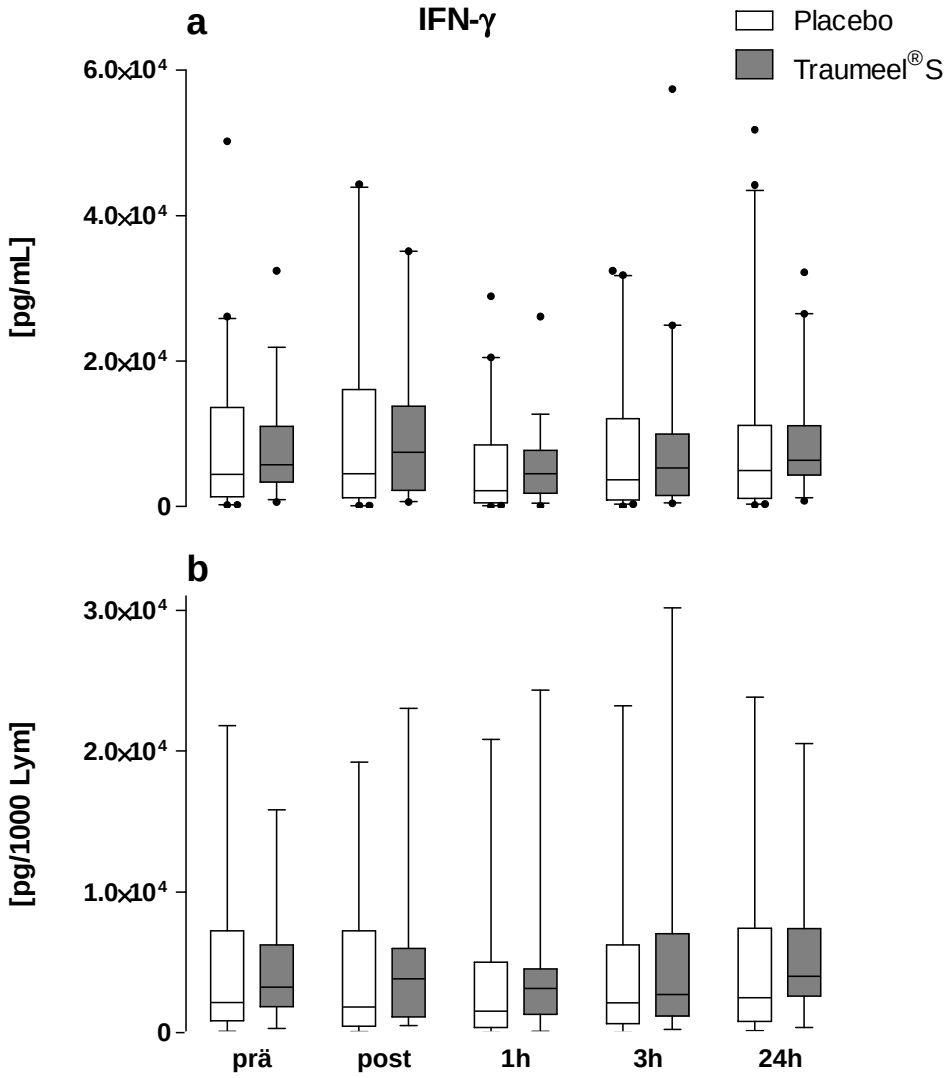



***Abb. 48**: Verlauf der Konzentration von IFN-γ in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten) (a: Box: Median, unteres und oberes Quartil, Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Zwei Ausreißer zum ZP prä von 6,87 x10$^4$ pg/ml (Placebo) und 7,81 x10$^4$ pg/ml (traumeel) nicht dargestellt.*

Zum ZP post wurde in beiden Gruppen ein Abfall der IL-2 Konzentration (sVBK) beobachtet (P: -34% und T: -51%). Infolgedessen stieg IL-2 in beiden Gruppen wieder an und lag zum ZP 3h mit 807 ± 1 792 pg/ml über (114%, Placebo) bzw. mit 1 220 ± 1 902 pg/ml unter (89%, Traumeel) dem jeweiligen Vorbelastungswert (Abb. 49a). Die $AUC_I$ von IL-2 (sVBK) lag in der Placebo-Gruppe bei -2,04 ± 5,25 x10$^5$ während die Traumeel-Gruppe eine $AUC_I$ von -1,24 ± 4,34 x10$^7$ aufwies (p=0,0498, Abb. 50).

Bei Betrachtung der pro 1000 Lymphozyten berechneten IL-2 (sVBK) Konzentration war festzustellen, dass in beiden Gruppen direkt nach Belastung ein Abfall vorlag, dieser allerdings in der Traumeel-Gruppe stärker ausgeprägt (-58% vs -38% in der Placebo-Gruppe) und länger andauernd (-15% zum ZP 24h) ausfiel. In der Placebo-Gruppe wurde hingegen bereits zum ZP 1h eine Erhöhung von IL-2/1000Lym um +16% beobachtet (Abb. 49b). Es konnte jedoch kein Hinweis auf einen möglichen Gruppenunterschied ermittelt werden (p=0,1262, Tab. 39).

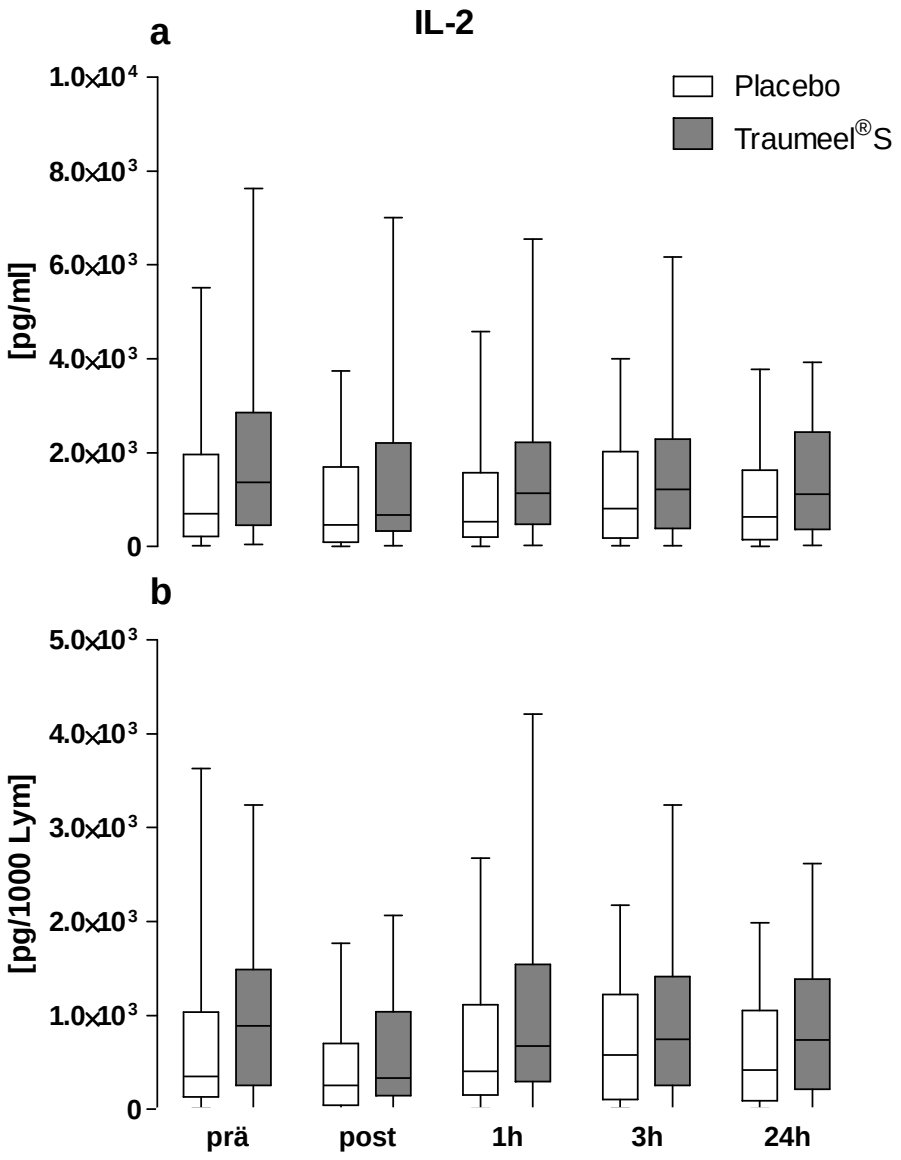



***Abb. 49**: Verlauf der Konzentration von IL-2 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung*

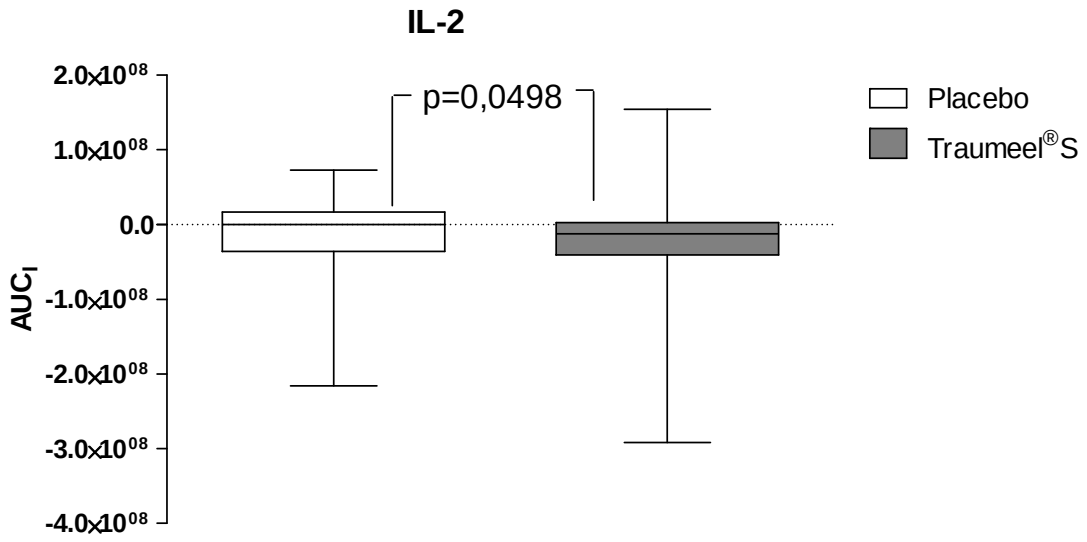



***Abb. 50**: Verteilung der $AUC_I$ von IL-2 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe*

In beiden Behandlungsgruppen stieg die Konzentration von IL-12p40 (sVBK) nach Belastung an und erreichte mit 24,5 ± 11,7 ng/ml (Placebo) bzw. 24,3 ± 8,8 ng/ml (Traumeel) zum ZP 3h ein Peak (P: +19% und T: +23% vs prä). Während IL-12p40 in der Placebo-Gruppe zum ZP 24h leicht unter Ausgangsniveau lag (-5%), war in der Traumeel-Gruppe ein nach wie vor erhöhter Wert zu beobachten (+13% vs prä, Abb. 51a). Die Konzentration von IL-12p70 war in beiden Gruppen zum ZP post verringert (P: -41% und T: -47%) und stieg ab ZP 1h wieder an. Während in der Placebo-Gruppe zum ZP 3h mit 105,3 ± 162,9 pg/ml (+1% vs prä) der höchste Wert von IL-12p70 zu beobachten war, lag mit 92,4 ± 102,5 pg/ml (84% von prä) in Traumeel-Gruppe erst zum ZP 24h der höchste Nachbelastungswert vor (Abb. 51b). Für keine der beiden Untereinheiten von IL-12 konnte ein Hinweis auf Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden (Tab. 39).

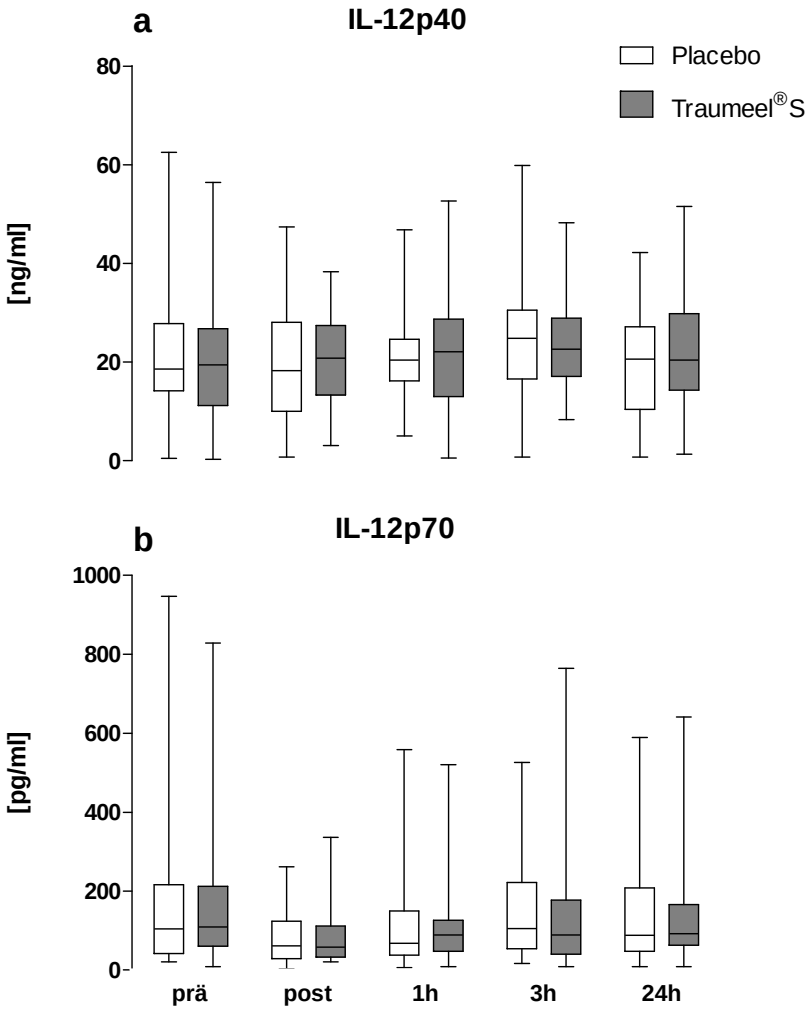



***Abb. 51**: Verlauf der Konzentration von IL-12p40 (a) und IL-12p70 (b) in sVBK getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung*

***Tab. 39**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IFN-γ, IL-2, IL-12p40 und IL-12p70. k.NV: Keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *IFN-γ* | *0,4377* | *k.NV* |
| *IFN-γ (pro 1000 Lym)* | *0,4940* | *k.NV* |
| *IL-2* | ***0,0498 T<P*** | *k.NV* |
| *IL-2 (pro 1000 Lym)* | *0,1262* | *k.NV* |
| *IL-12p40* | *0,1683* | *0,5742* |
| *IL-12p70* | *0,3956* | *k.NV* |

### *6.4.5.9 $T_H$2-Zytokine*

In beiden Behandlungsgruppen war ein gegensätzlicher Verlauf von IL-3 (sVBK) zu beobachten. Während es in der Placebo-Gruppe nach Belastung zu einer stetigen Zunahme von IL-3 bis zum ZP 3h (+49% vs prä) kam, wurde in der Traumeel-Gruppe eine stetige Abnahme bis zum ZP 3h (-19% vs prä) beobachtet. Zum ZP 24h hatte sich IL-3 in beiden Gruppen jeweils wieder dem Ausgangsniveau angenähert (P : +9% vs prä, T : +4%, Abb. 52). Es lag jedoch kein Hinweis eines Gruppenunterschieds vor (Tab. 40).

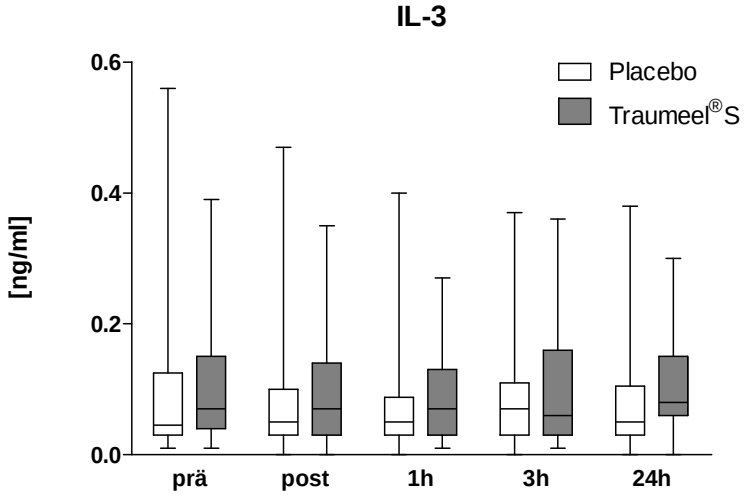



***Abb. 52**: Verlauf der Konzentration von IL-3 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung*

In beiden Gruppen wurde zum ZP post eine Abnahme von IL-4 (sVBK) vs prä festgestellt (P: -24%, T: -23%). Zu den beiden folgenden Zeitpunkten 1h und 3h stieg die Konzentration von IL-4 in beiden Gruppen an und erreichte mit 186 ± 213 pg/ml (Placebo) bzw. 223 ± 159 pg/ml 116% (Placebo) bzw. 107% (Traumeel) des Ausgangswertes. Während in der Placebo-Gruppe zum ZP 24h eine mit dem Ausgangsniveau vergleichbare Konzentration von IL-4 (sVBK) vorlag, wies die Traumeel-Gruppe mit 230 ± 159 pg/ml (+11% vs prä) die höchste IL-4 Konzentration im gesamten Verlauf auf (Abb. 53a).

Auch die auf die Anzahl der Lymphozyten berechnete Konzentration von IL-4 (sVBK) fiel zunächst initial nach Belastung ab. Mit 114,36 ±100,10 pg/1000Lym (Placebo) bzw. 129,73 ± 136,00 pg/1000Lym (Traumeel) erreichten beide Gruppen zum ZP 1h die höchsten Werte, wobei der relative Anstieg in der Placebo-Gruppe stärker ausgeprägt war (P: +29%, T: +3%). Während die Placebo-Gruppe zum ZP 24h nach wie vor eine

erhöhte Konzentration von IL-4 pro Lymphozyt aufwies (+11% vs prä), lag in der Traumeel-Gruppe wieder ungefähr das Ausgangsnivau vor (-2%, Abb. 53b). Weder absolut betrachtet noch auf die Zahl der Lymphozyten bezogen wurden auffällige p-Werte ermittelt.

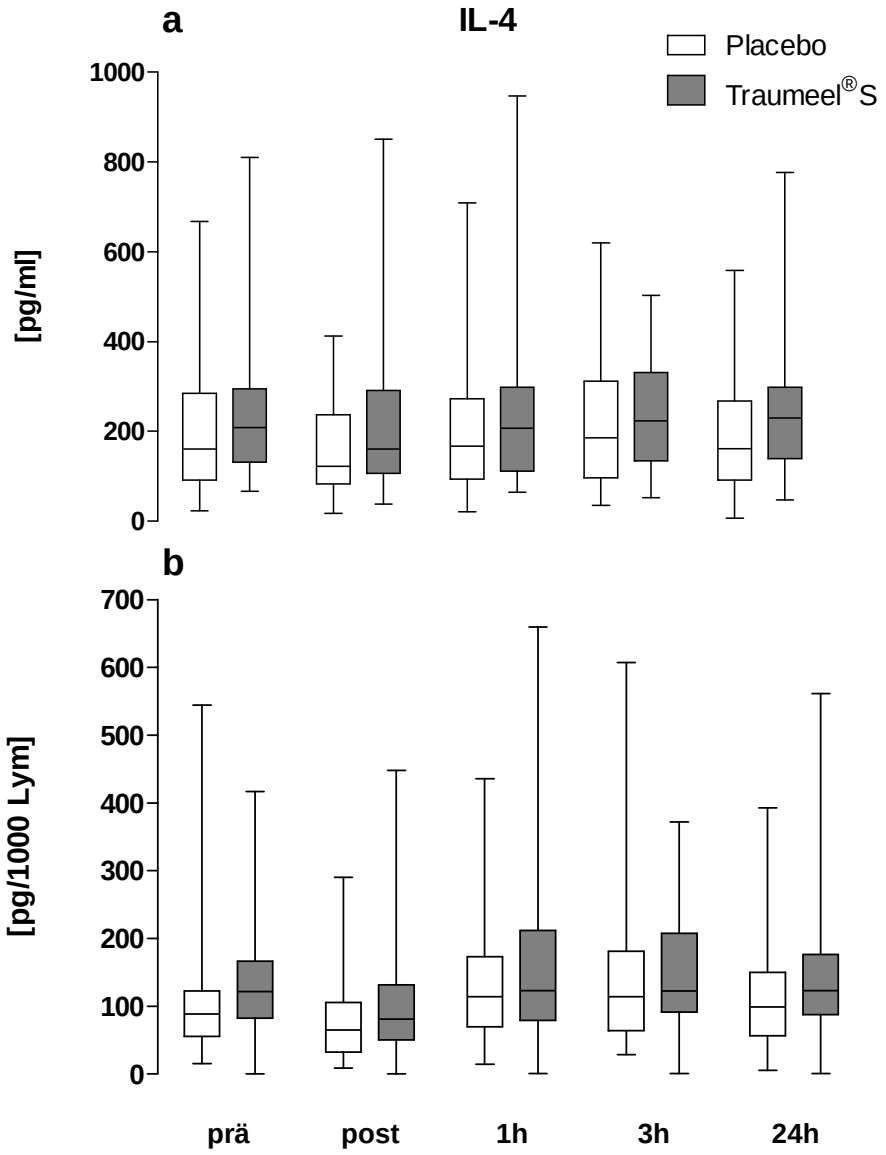



***Abb. 53**: Verlauf der Konzentration von IL-4 in sVBK (a: absolut), (b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden (24h) nach Belastung.*

In beiden Behandlungsgruppen fiel die Konzentration von IL-5 (sVBK) direkt nach Belastung zunächst ab (P : -30%, T : -32%). Während anschließend ein verzögerter Anstieg von IL-5 (sVBK) in der Placebo-Gruppe mit einem Maximum von 57,4 ± 125,7 pg/ml (+10% vs prä) zum ZP 3h zu beobachten war, lag in der Traumeel-Gruppe mit 70,6 ± 57,3 pg/ml (+21%) bereits zum ZP 1h die höchste IL-5 (sVBK) Konzentration vor. Zum ZP 24h war IL-5 (sVBK) in der Placebo-Gruppe weit unter das Ausgangsniveau gesunken (-30%). In der Traumeel-Gruppe war eine mit dem Ausgangsniveau vergleichbare mittlere IL-5 (sVBK) Konzentration zu beobachten (Abb. 54a).

Auch die mittlere auf die Zahl der Lymphozyten normierte IL-5 (sVBK) Konzentration fiel zunächst direkt nach Belastung ab (P: -15%, T: -30%). Zwischen den ZP 1h und 3h wies die auf die Lymphozyten normierte IL-5 (sVBK) Konzentration in beiden Gruppen ein Plateau auf (P: +37% bzw. T: +32% vs prä). Zum ZP 24h wurden wieder etwas geringere Werte, die dennoch nach wie vor über Ausgangsniveau lagen (P: +5%, T: +14%), beobachtet (Abb. 54b). Es wurde weder für die absolute noch für die auf die Lymphozytenzahl normierte IL-5 (sVBK) Konzentration ein statistisch auffälliger p-Wert ermittelt (Tab. 40).

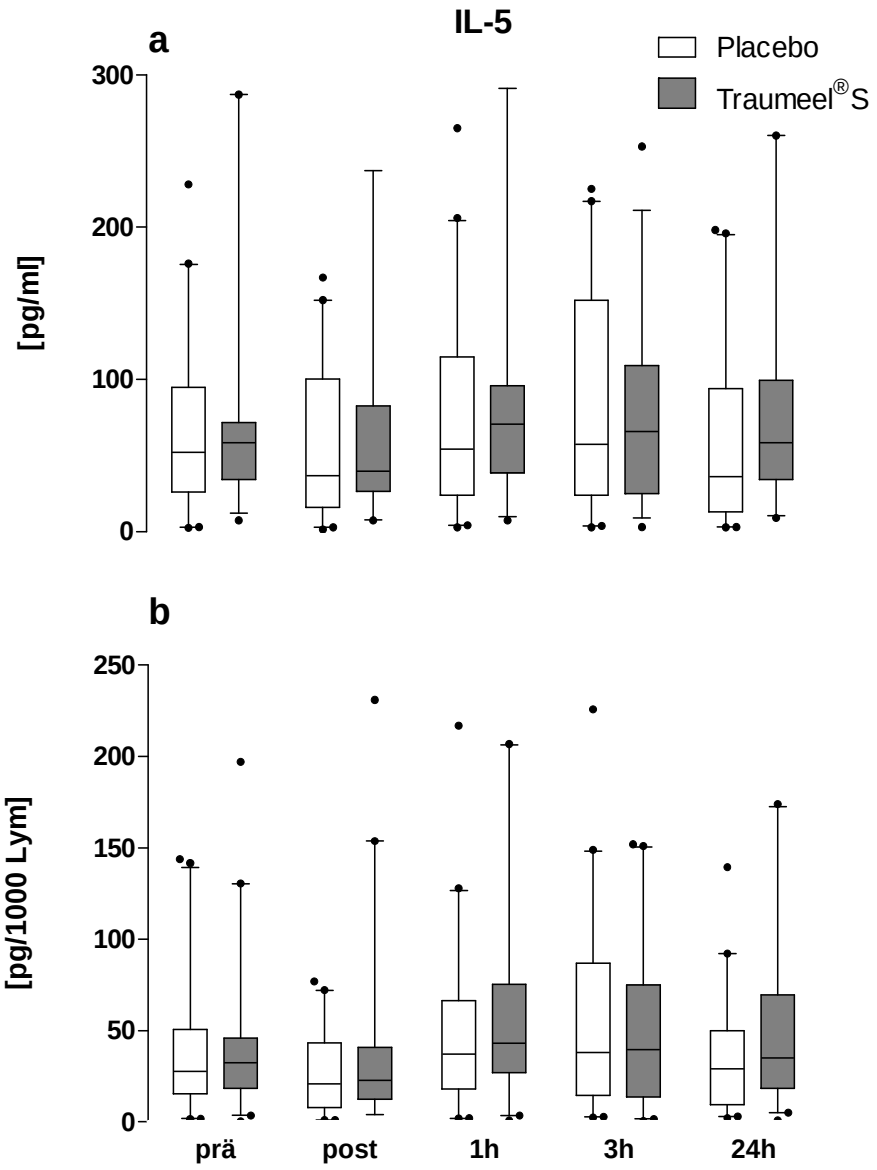



***Abb. 54**: Verlauf der Konzentration von IL-5 in sVBK (a: absolut, b: normiert auf die Zahl der Lymphozyten, beide: Whisker: 5.und 95. Perzentil) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung. Vier Ausreißer eines Probanden der Traumeel-Gruppe zu den ZP prä, post, 1h und 24h von 383,00 pg/ml, 439 pg/ml, 471 pg/ml und 425 pg/ml sind nicht dargestellt. Ebenso nicht dargestellt: zwei Ausreißer der auf die Lymphozyten bezogenen Konzentration desselben Probanden von 328,18 pg/1000 Lym (1h) und 306,95 pg/1000 Lym (24h).*

***Tab. 40**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-3, IL-4, IL-5, und IL-25 (bei Bestimmung sowohl in sVBK als auch in Serum ist dies entsprechend gekennzeichnet). k.NV: Keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *IL-3* | *0,2371* | *k.NV* |
| *IL-4* | *0,0880* | *k.NV* |
| *IL-4 (pro 1000 Lym)* | *0,1699* | *k.NV* |
| *IL-5* | *0,4922* | *k.NV* |
| *IL-5 (pro 2000 Lym)* | *0,3282* | *k.NV* |

### *6.4.5.10 $T_H$17-Zytokine*

Nach einem initialen Abfall zum ZP post (P : -29%, T : -23%), lag die mittlere IL-17 (sVBK) Konzentration zum ZP 1h in beiden Gruppen mit 115,00 ± 158,30 pg/ml (Placebo) bzw. 172,00 ± 217,60 pg/ml (Traumeel) wieder auf vergleichbaren Niveau wie zum ZP prä (P : ±0%, T : -1%). Während IL-17 (sVBK) in der Placebo-Gruppe nachfolgend zum ZP 3h erhöht war (+5% vs prä), wurde in der Traumeel-Gruppe ein erneuter Abfall beobachtet (-18% vs prä). 24 Stunden nach Belastung lag die mittlere IL-17 Konzentration bei 88% (Placebo) bzw. 101% (Traumeel) des Vorbelastungswertes (Abb. 55). Für den Vergleich der $AUC_I$ von IL-17 (sVBK) wurde kein auffälliger p-Wert ermittelt (Tab. 41).

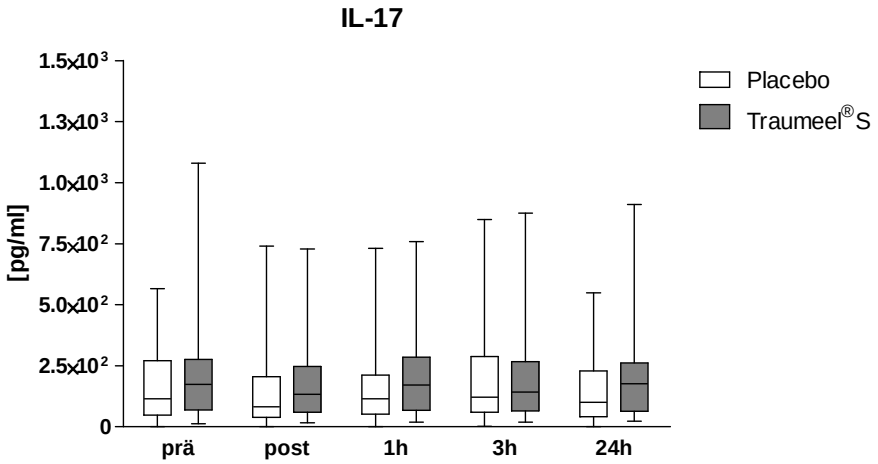



***Abb. 55**: Verlauf der Konzentration von IL-17 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

***Tab. 41**: p-Wert des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für den Nebenzielgrößen IL-17. k.NV: Keine Normalverteilung*

| *Zielgrößen* | *p-Wert Vergleich der $AUC_I$* | *p-Wert Zeitpunkt*Gruppe* |
|---|---|---|
| *IL-17* | *0,2684* | *k.NV* |

### *6.4.5.11 Weitere Interleukine*

Die mittlere IL-7 (sVBK) Konzentration lag vor Belastung in beiden Gruppen bei 5,9 pg/ml (P : ± 7,1 pg/ml, T : ± 6,9 pg/ml). Direkt nach Belastung wurde eine Abnahme der IL-7 (sVBK) Konzentration beobachtet (P : -4%, T : -15%). Während in der Placebo-Gruppe zum ZP 24h mit 3,1 ± 3,8 pg/ml (-48% vs prä) die deutlichste Abnahme zu verzeichnen war, lag diese in der Traumeel-Gruppe mit 4,2 ± 7,2 pg/ml (-29% vs prä) zum ZP 1h vor. Mit 5,8 ± 5,7 pg/ml (-1% vs prä) wies die Traumeel-Gruppe nach 24 Stunden ein mit dem Ausgangslevel vergleichbares Niveau auf (Abb. 56). Es wurde kein auffälliger p-Wert ermittelt (Tab. 42).

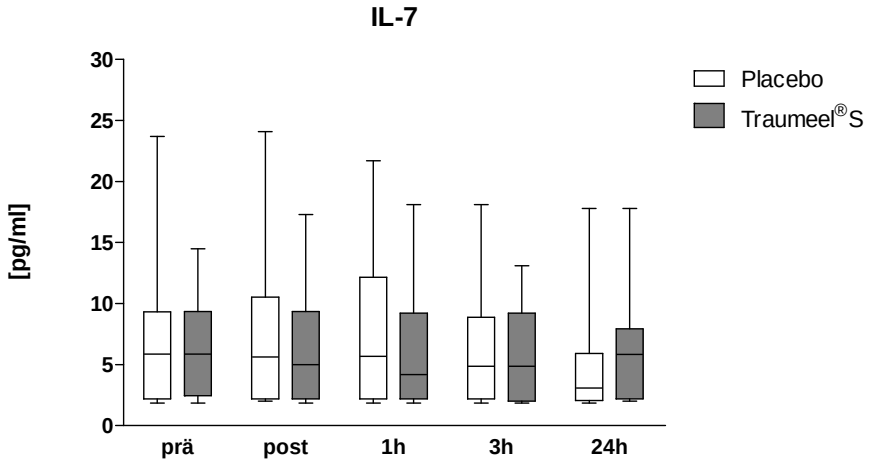



***Abb. 56**: Verlauf der Konzentration von IL-7 in getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

Die Konzentration von IL-15 (sVBK) stieg direkt nach Belastung in der Placebo-Gruppe nur geringfügig (+3%), in der Traumeel-Gruppe deutlich an (+74%). Die Placebo-Gruppe erreichte zum ZP 3h (+46% vs prä), die Traumeel-Gruppe bereits zum ZP 1h (+97% vs prä) ihr jeweiliges Maximum. Während IL-15 nach 24 Stunden in der Placebo-Gruppe wieder das Ausgangsniveau aufwies, war es in der Traumeel-Gruppe

nahezu um das Doppelte des Vorbelastungswertes erhöht (+91%, Abb. 57). Es wurde kein auffälliger p-Wert für IL-15 ermittelt (Tab. 42).

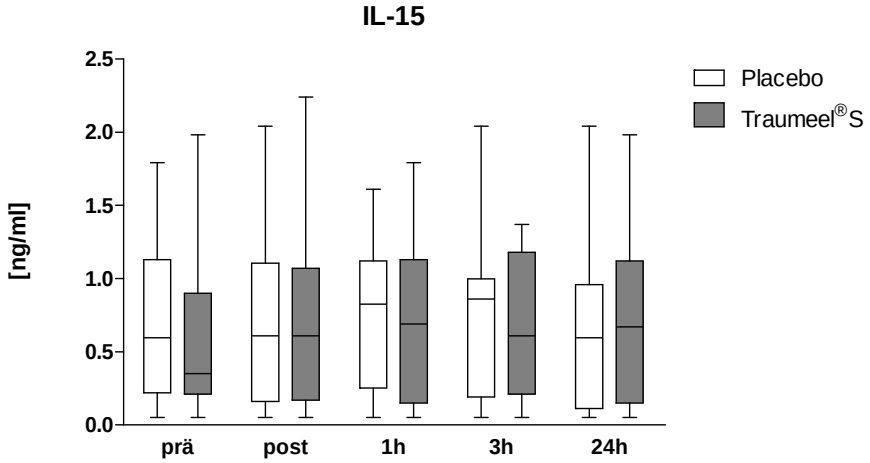



***Abb. 57**: Verlauf der Konzentration von IL-15 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

In beiden Behandlungsgruppen kam es nach Belastung zu einem verzögerten Anstieg von IL-18 (sVBK), der zum ZP 1h einsetzte (P:+8% bzw. T: +6% vs prä) und in beiden Gruppen zum ZP 3h am stärksten ausgeprägt war (P: +19% bzw. T: +14% vs prä, Abb. 58). Es wurde weder ein Hinweis auf einen Unterschied der $AUC_I$ noch auf einen Interaktionseffekt Zeitpunkt*Gruppe von IL-18 (sVBK) ermittelt (Tab. 42)

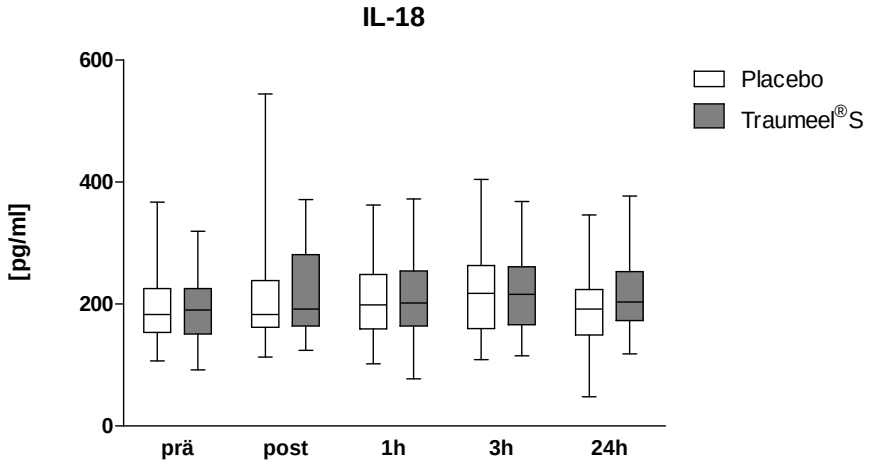



***Abb. 58**: Verlauf der Konzentration von IL-18 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

In beiden Gruppen wurde direkt nach Belastung ein Anstieg von IL-23 (sVBK) beobachtet. Dieser war in der Traumeel-Gruppe stärker ausgeprägt (P: +19% bzw. T: +31% vs prä). Während in der Placebo-Gruppe ein weiterer Anstieg bis zum ZP 3h erfolgte (+43% vs prä), blieb die IL-23 Konzentration (sVBK) in der Traumeel-Gruppe bis zu diesem ZP auf einem Plateau. Beide Gruppen wiesen nach 24 Stunden in etwa ihr jeweiliges Ausgangsniveau auf (Abb. 59). Es wurde kein auffälliger p-Wert für IL-23 (sVBK) ermittelt (Tab. 42).

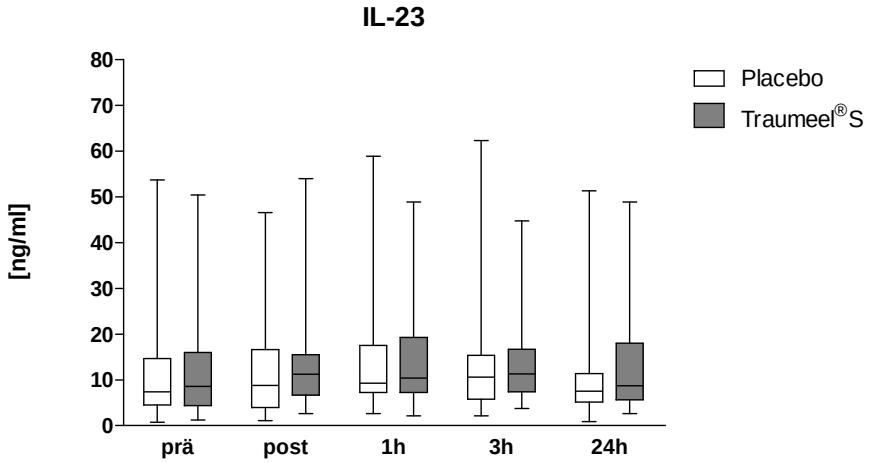



***Abb. 59**: Verlauf der Konzentration von IL-23 (sVBK) getrennt nach Behandlungsgruppe zu den Zeitpunkten vor (prä), nach (post), eine Stunde (1h), 3 Stunden (3h) und 24 Stunden(24h) nach Belastung.*

***Tab. 42**: p-Werte des Wilcoxon-Tests der $AUC_I$ und der ANCOVA (Interaktionseffekt) für die Nebenzielgrößen IL-7, IL-15, IL-18, und IL-23. k.NV: Keine Normalverteilung*

| ***Zielgrößen*** | ***p-Wert Vergleich der $AUC_I$*** | ***p-Wert Zeitpunkt*Gruppe*** |
|---|---|---|
| *IL-7* | *0,4146* | *k.NV* |
| *IL-15* | *0,1941* | *k.NV* |
| *IL-18* | *0,3843* | *0,2968* |
| *IL-23* | *0,1758* | *k.NV* |

# 7 Diskussion

## 7.1 Ergebnisdiskussion

### 7.1.1 Studienabschnitt A

#### *7.1.1.1 Proinflammatorische Zytokine*

In der vorliegenden Untersuchung wurde lediglich für IL-1β (sVBK) 3 Stunden nach Belastung ein Anstieg ($p<0,0028$) ermittelt. Die Kinetiken der absoluten als auch relativen Veränderungen von IL-1β wiesen zudem Parallelen zwischen sVBK und Serum auf, wenngleich für IL-1β (Serum) keine statistisch auffälligen Veränderungen vorlagen. Hinsichtlich der Konzentration von TNF-α (sVBK und Serum) wurde keine Veränderung nach Belastung beobachtet.

Diese Befunde stimmen nur teilweise mit Untersuchungsergebnissen anderer Autoren überein. Drenth et al. untersuchten LPS-induzierte Zytokinprofile bei Freizeitsportlern nach einem 5km-Lauf und stellten ebenso stimulierende Effekte auf IL-1β 3 Stunden nach Belastung fest (Drenth et al., 1998). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Phillips et al. bei einer weiblichen post-menopausalen Kohorte nach Durchführung eines akuten intensiven Krafttrainings, auch hier wurde eine erhöhte Konzentration von IL-1β jedoch nicht von TNF-α beobachtet (Phillips et al., 2008). In einer älteren Studie von Lewicki et al. wurde ein mit der vorliegenden Studie vergleichbares Probandenkollektiv sowie eine vergleichbare Belastungsform gewählt. Die Autoren fanden zum ZP 2h nach Belastung signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1β, jedoch nicht von TNF-α (Lewicki et al., 1988). Der überwiegende Teil der Studien beschreibt jedoch einen hemmenden Einfluss einer akuten Belastung auf die LPS-stimulierte TNF-α Produktion in Vollblutkulturen (Northoff et al., 1994; Kvernmo et al., 1992; Rivier et al., 1994). Auch für die LPS-stimulierte Konzentration von IL-1β wurden hemmende Effekte eines 6 stündigen Laufwettkampfes unter trainierten Athleten beschrieben (Drenth et al., 1995). Weinstock et al. fanden bei ausdauertrainierten Athleten 1 Stunde nach einem Triathlon-Wettkampf eine verringerte Konzentration von IL-1β und TNF-α in LPS-stimulierten VBK (Weinstock et al., 1997). Andere Autoren konnten wiederum keine Veränderungen von LPS-stimuliertem IL-1β und TNF-α sowohl nach moderater als auch intensiver Fahrradbelastung nachweisen (Baum et al., 1997). Diese z.T. heterogenen Studienergebnisse dürften insbesondere auf ein hinsichtlich des Trainingszustands unterschiedliches Probandenkollektiv zurückzuführen sein. Für den Trainingszustand wurde bereits ein Einfluss auf die belastungsinduzierte

Zytokinantwort gezeigt (Gokhale et al., 2007; Pedersen, 2006). Darüber hinaus scheint die Ausübung regelmäßigen Ausdauertrainings die *in vitro* Zytokinproduktion von Monozyten zu modulieren (Baum et al., 1999). In den Studien, welche hemmende Effekte nachweisen konnten, wurde weiterhin eine auf Zellebene verminderte Syntheserate aufgezeigt. Weinstock et al. konnten zeigen, dass die Konzentration von IL-1β und TNF-α pro Monozyt eine Stunde nach Belastung signifikant reduziert war (Weinstock et al., 1997). Der Befund eines hemmenden Belastungseffektes auf die monozytäre Syntheserate von LPS-induziertem IL-1β und TNF-α wird weiterhin dadurch erhärtet, dass diese bei postmenopausalen Frauen gegenüber einer Kontrollgruppe (ohne Belastung) nach intensivem Krafttraining signifikant geringer ausfiel (Phillips et al., 2008). Dies kann anhand der vorliegenden Daten zumindest für IL-1β bestätigt werden, für TNF-α war hingegen keine Veränderung der auf die Monozytenzahl bezogenen Konzentration zu beobachten. Daher dürfte hauptsächlich ein Anstieg der Monozytenzahl und weniger eine erhöhte Syntheserate (eine Hemmung lag hingegen vor) für den späten Anstieg von IL-1β (sVBK) verantwortlich gewesen sein.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Resultaten in sVBK, wurde in der Mehrheit der Studien keine systemische Veränderung von IL-1β oder TNF-α nach einer akuten Belastung festgestellt (Smith et al., 1992; Rivier et al., 1994; Ullum et al., 1994; Drenth et al., 1995; Drenth et al., 1998; Starkie et al., 2005; Phillips et al., 2008), was sich mit den vorliegenden Ergebnissen deckt. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von TNF-α nach einer akuten Belastung im Urin erhöht war (Suzuki et al., 2002). Da TNF-α eine kurze Halbwertszeit aufweist (Davies und Hagen, 1997b) und die Nieren das Hauptorgan der TNF-α-Ausscheidung darstellen (Bemelmans et al., 1996), könnte das geringe systemische Level von TNF-α auf die renale Filtration zurückgeführt werden. Nicht zuletzt ist IL-6 für seinen hemmenden Einfluss auf die TNF-α und IL-1β Produktion bekannt (Pedersen et al., 2001). Da IL-6 (Serum) in der vorliegenden Studie direkt nach Belastung enorm erhöht war, könnten seine hemmenden Effekte die unveränderten Konzentrationen von TNF-α und den nur geringen Anstieg von IL-1β (Serum) nach Belastung bedingt haben. Abschließend muss hinsichtlich des Vergleichs zwischen Serum und sVBK einschränkend angemerkt werden, dass die Detektionsrate insbesondere von IL-1β (Serum) auch nach Anwendung eines hsELISA um mehr als die Hälfte geringer ausfiel als die Detektionsrate von IL-1β (sVBK).

#### *7.1.1.2 Inflammationsregulierende und antiinflammatorische Zytokine*

In der vorliegenden Untersuchung wurden deutlich ausgeprägte Anstiege von IL-6, die bis zu 3h nach Belastung andauerten, in sVBK und im Serum beobachtet. IL-6 gilt als das Zytokin, welches systemisch gemessen am sensitivsten auf Belastung reagiert (Sprenger et al., 1992; Suzuki et al., 2002; Pedersen und Febbraio, 2008). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies, da für IL-6 (Serum) im Vergleich zu allen anderen Zytokinen die größten relativen Veränderungen beobachtet wurden. Dieses Alleinstellungsmerkmal war außerdem durch einen gegenüber der sVBK stärkeren relativen Anstieg von IL-6 (Serum) gekennzeichnet.

Die vorliegenden erhöhten Nachbelastungswerte von IL-6 (sVBK) entsprechen nur teilweise anderen Studienergebnissen. Es wurde berichtet, dass Kraftbelastungen LPS-stimuliertes IL-6 erhöhen, dieser Effekt allerdings 2 Stunden nach Belastung bereits nicht mehr vorhanden war (Phillips et al., 2008). Auch Schmolz et al. fanden keine Beeinflussung der IL-6-Konzentration in sVBK, allerdings nach einer weniger intensiven Belastung entsprechend ungefähr 70% $VO_2$max (Schmolz et al., 2004). Die zuletzt genannten Autoren schlussfolgerten, dass die Verwendung von LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml zu erhöhten Baseline-Werten von IL-6 führte, wodurch der Belastungseffekt eventuell überlagert wurde. Diese Annahme kann nicht bestätigt werden, da die in der vorliegenden Studie verwendete Konzentration von LPS mit 0,1 µg/ml sogar höher lag und trotzdem deutliche Anstiege von IL-6 (sVBK) gemessen wurden. Daher kann die Vermutung angestellt werden, dass die Belastungsintensität in der Studie von Schmolz et al. eventuell zu gering gewählt wurde.

Starkie et al. konnten zeigen, dass nach einer akuten Belastung eine erhöhte Zahl IL-6 produzierender Monozyten im peripheren Blut nachweisbar ist, die um die Zellzahl korrigierte IL-6 Konzentration allerdings verringert ist (Starkie et al., 2005). Die Autoren schlussfolgerten, dass hierfür hemmende Einflüsse von Noradrenalin auf die LPS-stimulierte IL-6 Produktion von Monozyten verantwortlich sein könnten. Auch Weinstock et al. fanden in stimulierten Vollblutkulturen nach Korrektur der IL-6 Konzentration um die Monozytenzahl eine Reduktion von IL-6 eine Stunde nach Belastung (Weinstock et al., 1997). Dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden, da die Konzentration von IL-6 pro Monozyt nicht verringert war.

Berichte einiger Studien offenbaren weiterhin Schwierigkeiten bei der Detektion von IL-6, insbesondere vor Belastung oder in der späten Nachbelastungsphase. Pool et al. (Pool et al., 2002) gelang es beispielsweise nicht, IL-6 in unstimulierten Kulturüberständen einer unbelasteten Kontrollgruppe nachzuweisen. Drenth et al. wiederum konnten basales IL-6 im Plasma von gerade 2 von 10 Freizeitsportlern detektieren (Drenth et al., 1998). Weinstock et al. fanden vor bzw. 20 Stunden nach

einem Wettkampf in gerade 5 bzw. 2 Serum-Proben von 15 trainierten Probanden IL-6 (Weinstock et al., 1997). Timmons et al. (2009) konnten in gerade mal 63% der Vorbelastungs-Plasma-Proben per Bead-basierten Multiplex-Verfahren IL-6 auffinden (Timmons et al., 2009). In der vorliegenden Untersuchung wurde hingegen eine perfekte (100% in sVBK) bis sehr gute (Serum) Detektionsrate von IL-6, auch vor Belastung, erzielt.

Im Gegensatz zu allen anderen gemessenen Zytokinen war der relative Anstieg von IL-6 (Serum) deutlich stärker ausgeprägt als in sVBK. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die IL-6 Konzentrationsanstiege in sVBK maßgeblich auf die Synthese von Leukozyten zurückzuführen waren, während die Konzentrationsanstiege im Serum auf weitere Zellen bzw. Organe potentiell zurückgeführt werden können. Jiang et al. vermuteten, dass die Leber für erhöhte IL-6 Konzentrationen bei Mäusen nach Belastung verantwortlich ist (Jiang et al., 1999). Dies wurde jedoch beim Menschen durch Febbraio et al. widerlegt, sie fanden vielmehr eine Elimination von IL-6 aus dem Kreislauf durch die Leber (Febbraio et al., 2003). Der arbeitende Skelettmuskel dürfte hingegen entscheidend zur erhöhten systemische IL-6 Konzentration beigetragen haben. Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass der arbeitende Skelettmuskel IL-6 sezerniert (Toft et al., 2011) und dadurch signifikant zur systemischen Erhöhung von IL-6 beiträgt (Hiscock et al., 2004). Folglich dürften die Konzentrationsverschiebungen von IL-6 (sVBK), zu einem geringeren Maß als im Serum, durch den Einfluss von Leber und Muskel (Hirata et al., 2003) sondern vielmehr durch die Synthese von Leukozyten determiniert worden sein.

Es muss abschließend allerdings zusätzlich angemerkt werden, dass die vorliegenden Werte von IL-6 (Serum) auf einer Bestimmung durch ein hsELISA beruhten. In einer Studie von Timmons et al. (2009) wurde IL-6 im Plasma vor und nach einer Belastung sowohl durch ein Bead-basiertes Multiplex-Verfahren als auch durch ein hoch-sensitives ELISA bestimmt und miteinander verglichen. Während die Vorbelastungswerte einer sehr gute Übereinstimmung erzielten, zeigte sich, dass die Nachbelastungswerte von IL-6 durch ein Multiplex-Verfahren gegenüber dem hsELISA unterschätzt werden (Timmons et al., 2009). Daher ist nicht auszuschließen, dass der relativ betrachtet ausgeprägte Anstieg von IL-6 (Serum) gegenüber IL-6 (sVBK) teilweise auf die Verwendung unterschiedlicher Analysemethoden zurückzuführen sein könnte. In der beschriebenen Studie kamen allerdings Test-Kits anderer Hersteller als in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung („Human Inflammation Kit der Firma BD Biosciences und „high-sensitivity“ ELISA kit der Firma R&D Systems).

Die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-1ra erfuhr in sVBK einen bis zu 3 Stunden nach Belastung andauernden Anstieg. Auch im Serum war IL-1ra zum

ZP 3h erhöht, vorher jedoch nicht. Als Hauptstimulus für die Produktion von IL-1ra wird wiederum IL-6 verantwortlich gemacht (Pedersen et al., 2001). Obwohl jedoch in der Frühphase, relativ betrachtet, ein größerer Anstieg von IL-6 (Serum) als von IL-6 (sVBK) zu verzeichnen war, wies IL-1ra (Serum) erst 3 Stunden nach Belastung einen statistisch auffälligen Anstieg auf, während IL-1ra (sVBK) bereits post und 1h statistisch auffällig erhöht war. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass nicht ausschließlich IL-6 für die ausgeprägteren Konzentrationsanstiege von IL-1ra (sVBK) verantwortlich gemacht werden kann. Eine Erklärungsmöglichkeit ließe sich wiederum auf die quantitativen Veränderungen von Monozyten zurückführen, da eine intensive Belastung schließlich eine Monozytose induziert (Walsh et al., 2011). Es ist bekannt, dass IL-1ra infolge derselben Stimuli wie IL-1β, z.B. durch Endotoxine (Eisenberg et al., 1990), insbesondere von Monozyten (Haskill et al., 1991). durch Bindung des LBP-LPS (LBP: Lipopolysaccharid-bindendes Protein) Komplexes an TLR4 und Costimulation durch CD14 sezerniert wird (Muzio und Mantovani, 2001; Sabroe et al., 2002). Des Weiteren ist der Rezeptor TLR2 neben polymorphkernigen Leukozyten und dendritischen Zellen vornehmlich auf Monozyten zu finden und dieser Rezeptor wird für die zelluläre Antwort auf grampositive Bakterien wie *Staphylococcus areus* verantwortlich gemacht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das systemische Level von IL-1ra infolge einer Endotoxin-Injektion *in vivo* bis zu 100fach höher liegt als von IL-1β (Granowitz et al., 1991), was erklären würde warum die LPS-Stimulation zwar zu einem frühzeitigen Anstieg von IL-1ra (sVBK) allerdings nicht von IL-1β (sVBK) führte. Als zweite Möglichkeit kommen neben quantitativen Veränderungen ebenso qualitative bzw. funktionale Modulationen von Monozyten in Frage. In der vorliegenden Studie wurde eine Stimulation der IL-ra-Konzentration pro Monozyt festgestellt. Dies ließe sich z.B. dadurch erklären, dass der Belastungsreiz zu einer Mobilisation von Monozyten mit erhöhtem Aktivierungszustand geführt hat. Denkbar wäre, dass z.B. eine verstärkte Expression von Rezeptoren, z.B. von TLR oder CD14, schließlich zu einer erhöhten Zytokinexpression pro Zelle beigetragen haben könnte. Einerseits existieren Hinweise darauf, dass eine akute Belastung eher zu einer Reduzierung der TLR-Expression auf CD14+ Monozyten führt (Lancaster et al., 2005). Andererseits konnte bereits gezeigt werden, dass nach erschöpfender Belastung peripher eher Monozyten mit geringerer Expressionsdichte von CD14 (CD14low+) durch Monozyten mit hoher Expressionsdichte von CD14 (CD14bright+) ersetzt werden (Gabriel et al., 1994b). Hierdurch wird die Beurteilung der Rolle von CD14 erschwert.

Ebenso könnte eine erhöhte Expression von IL-6R (Interleukin-6-Rezeptor) eine Rolle gespielt haben. Für Skelettmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass sie nach Belastung eine erhöhte Dichte von IL-6R aufweisen (Keller et al., 2005). Ob dies auch

auf Monozyten zutrifft bleibt spekulativ. Es konnten jedenfalls im Rahmen der Literaturrecherche keine entsprechenden Hinweise gefunden werden. Zusammengenommen könnten sowohl quantitative als auch funktionale Veränderungen von Monozyten durch Belastung die erhöhte IL-1ra (sVBK) -Synthese bedingt haben.

#### *7.1.1.3 Chemokine*

Sowohl für CCL2 als auch für CXCL8 wurden statistisch auffällige Anstiege im Serum und in sVBK beobachtet. Während jedoch in sVBK über einen längeren Zeitraum anhaltende und, gegenüber dem Vorbelastungsniveau, erhöhte Konzentrationen beobachtet wurden (bis zu 3h), lagen diese im Serum über einen kürzeren Zeitraum vor (CXCL8: 1h, CCL2: post).

Für CCL2 konnte bereits gezeigt werden, dass es sowohl nach Langzeit- (Suzuki et al., 2003b) als auch nach intensiven Kurzzeitausdauerbelastungen (Suzuki et al., 2002) erhöht im Plasma vorliegt. Die Expression von CC Chemokinen wird als charakteristisch für Muskelschäden beschrieben (Hirata et al., 2003; Matsukawa et al., 2000), da hierdurch Monozyten und Makrophagen aktiviert und zum Ort der Schädigung rekrutiert werden, wo sie am Heilungsprozess beteiligt sind (Huard et al., 2002). Es gilt als generell akzeptiert, dass ungewohnte Belastungen, insbesondere mit exzentrischer Komponente, zu Muskelschäden führen (Lieber und Friden, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse von CK und LDH untrainierter Probanden (s. 6.4.5.1 Ergebnisse Studienabschnitt B) deuten ebenfalls auf einen gewissen Schädigungsgrad hin. Daher kann spekuliert werden, dass in die geschädigte Muskulatur eingewanderte Phagozyten für die CCL2 Produktion, dessen Übertritt in die Zirkulation und somit erhöhten Serum-Werten, verantwortlich waren. Der in sVBK stärkere Anstieg von CCL2 nach Belastung lässt sich wiederum mit der vorliegenden Monozytose erklären, da diese Zellen CCL2 produzieren und sezernieren. Möglicherweise spielte nach Belastung auch eine gesteigerte CCL2 (sVBK) Produktion pro Zelle eine Rolle, wenngleich hier nur eine Tendenz gefunden wurde. Für eine gesteigerte Synthese von CCL2 durch Monozyten kommen verschiedene für die Signaltransduktion von LPS/SEB bedeutsame Faktoren auf extra- sowie intrazellulärer Ebene, wie bereits für IL-1ra diskutiert, in Betracht.

CXCL8, ursprünglich als IL-8 bezeichnet, gilt hauptsächlich als Chemoattraktor und Aktivator von Neutrophilen mit zusätzlichen chemotaktischen Eigenschaften für Basophile, Eosinophile und T-Zellen (Filep et al., 1998; Fujishima und Aikawa, 1995). Die vorliegenden Anstiege von CXCL8, sowohl im Serum als auch in sVBK, gehen konform mit zurückliegenden Studienergebnissen. CXCL8 war sowohl nach

Langzeitbelastungen im Plasma (Nieman et al., 2001; Ostrowski et al., 2001; Suzuki et al., 2003b), als auch nach intensiver Kurzzeitbelastung erhöht (Mucci et al., 2000). Relativ betrachtet kam es zu höheren Anstiegen von CXCL8 (sVBK), was auf die Wirkung von IL-1β zurückgeführt werden könnte. Schließlich ist bekannt, dass IL-1β in der Lage ist, die Produktion von CXCL8 zu induzieren (Coelho et al., 2005) und hier wurde ein, relativ gesehen, höherer Anstieg von IL-1β in sVBK beobachtet. Auch für den ausgeprägteren Anstieg von CXCL8 (sVBK) kommen quantitative Veränderungen der Monozyten als Erklärung in Frage. Monozyten gehören zu den Hauptproduzenten von CXCL8 infolge einer LPS-Stimulation (Bazzoni et al., 1991). Da keine Veränderung der CXCL8 Produktion weder pro Monozyt noch pro Neutrophilen (letzteres nicht dargestellt) ermittelt wurde, scheinen Modulationen der Zellfunktion hierfür keine Rolle gespielt zu haben.

#### *7.1.1.4 Zusammenfassung*

Zusammenfassend führte eine 60-minütige intensive Fahrradbelastung zu ausgeprägten Anstiegen von immunregulierenden, antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Serum und in sVBK. Die Kinetiken waren zwar zwischen sVBK und Serum vergleichbar, Hinweise auf lineare Zusammenhänge konnten jedoch anhand einer Korrelationsanalyse nicht aufgezeigt werden. Statistisch auffällige Anstiege lagen in sVBK entweder schon früher vor (IL-1ra) oder hielten im Verlauf länger an (IL-6, CCL2 und CXCL8). Auch relativ betrachtet kam es zu stärkeren Anstiegen der Zytokine in sVBK. Für die beschriebene Verstärkung der Zytokinreaktion in sVBK kann in den meisten Fällen (IL-1β, CCL2 und CXCL8) die Antigen-Stimulation einer gesteigerten Zahl von Monozyten und teilweise eine funktionale belastungsinduzierte Modulation auf Zellebene (IL-1ra/Monozyt) verantwortlich gemacht werden. Die einzige Ausnahme stellte IL-6 dar, dessen relativer Anstieg im Serum stärker ausgeprägt war. Dieser Umstand dürfte auf einen unterschiedlichen Einfluss von Arbeitsmuskulatur und Leukozyten auf die belastungsinduzierte Konzentration in sVBK und im Serum zurückzuführen sein. Eine proinflammatorische Zytokinreaktion war dagegen im Serum nicht vorhanden (TNF-α und IL-1β) und in sVBK nur teilweise zu späteren Nachbelastungszeitpunkten (3h, IL-1β) zu beobachten. Die Detektionsrate aller Zytokine lag bei Verwendung einer sVBK bei 100% und damit etwas (IL-1ra, IL-6, TNF-α, CXCL8) bzw. deutlich höher (IL-1β) als bei Serum-Proben.

## 7.1.2 Studienabschnitt B

### *7.1.2.1 Hauptzielgrößen*

Für keinen der beiden Hauptzielgrößen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen aufgedeckt. Infolge einer erschöpfenden Belastung führte die Einnahme von Traumeel®S Tabletten weder zu einer Modulation von IL-6 (sVBK), noch der Konzentration von hsCRP im Serum. Folglich konnte $H_0$ nicht abgelehnt und die beschriebenen immunregulierenden und antiinflammatorischen Eigenschaften von Traumeel®S (Conforti et al., 1997; Heine, 1998; Lussignoli et al., 1999; Porozov et al., 2004) anhand der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

*IL-6 (sVBK)*

Lussignoli et al. fanden 5 Stunden nach künstlicher Ödeminduktion bei mit Traumeel®S behandelten Nagern eine signifikant geringere IL-6 Konzentration gegenüber Kontrolltieren im Serum (Lussignoli et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Dies könnte u.a. auf die geringe methodische Vergleichbarkeit zurückzuführen sein. Bei Lussignoli et al. wurde per Injektion von Eigenblut in die Pfote, ein Hämatom und damit verbunden, leichter Entzündungsprozess, induziert. Die Behandlung mit Traumeel®S wurde ebenfalls lokal, subkutan appliziert. Ob die geringere Serum-Konzentration von IL-6 durch eine prophylaktische Gabe von Traumeel®S (1 Stunde vor Ödeminduktion) oder nachträgliche Injektion (30 min nach Ödeminduktion) erzielt wurde, lassen die Autoren allerdings offen. Die Generalisierung der Resultate von Lussignoli et al. dürfte jedoch einer gewissen Einschränkung unterliegen, da die Fallzahl der Tiere, bei denen IL-6 gemessen wurde bzw. gemessen werden konnte (zu fehlenden Messwerten werden von den Autoren ebenfalls keine Angaben gemacht) mit n=4 (von insgesamt n=14 in der Traumeel-Gruppe) sehr gering war.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Arbeit kamen hingegen Oberbaum et al. Sie konnten ebenfalls 6 Stunden nach einer *in vivo* Sepsisinduktion bei Ratten keinen Einfluss von Traumeel®S auf die systemische IL-6 Konzentration nachweisen (Oberbaum et al., 2011b). Die Sepsis wurde hierbei durch Ligation und Punktion des Caecums induziert, was laut den Autoren im Allgemeinen als Modell der Pathophysiologie einer humanen Sepsis akzeptiert wird (Oberbaum et al., 2011b). Hinweise auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von Traumeel®S hinsichtlich weiterer Zytokine stammen von Porozov et al. (Porozov et al., 2004). Hier erfolgte die Messung der Zytokine allerdings in Kulturüberständen von Jurkat- und THP-1-Zelllinien. Diese wurden entweder über einen Zeitraum von 24 Stunden mit

Traumeel®S inkubiert, bevor sie 48 Stunden lang mit PHA, PMA oder TNF-α stimuliert wurden, oder die Reihenfolge von Stimulation und Inkubation mit Traumeel®S geschah umgekehrt. Insofern könnten die unterschiedlichen Ergebnisse von Porozov et al. und dem vorliegenden Fall auf starke methodische Diskrepanzen zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu belastungsinduzierten Veränderungen der systemischen IL-6 Konzentration, welche hauptsächlich auf Stressreaktionen metabolischer und struktureller Natur im Skelettmuskel zurückgeführt werden (Pedersen et al., 2001; Toft et al., 2011), wird die IL-6 Konzentration in sVBK hauptsächlich durch die Syntheserate der Antigen-stimulierten Leukozyten, in erster Linie Monozyten, determiniert. Insofern ließe sich eine Modulation der belastungsinduzierten Konzentration von IL-6 (sVBK) hauptsächlich durch eine veränderte Zahl zirkulierender Monozyten oder aber einer Modulation der Syntheserate auf Zellebene beeinflussen. Es lagen jedoch keine Hinweise auf Unterschiede der Monozytenzahl oder der IL-6 Konzentration (sVBK) pro Monozyt zwischen den Behandlungsgruppen vor.

Abschließend sollte darauf hingewiesen werden, dass die vorliegende belastungsinduzierte IL-6 (sVBK) Antwort eine große Standardabweichung aufwies, was auf ein hohes Maß an interindividuell variablen IL-6-Mustern schließen lässt. Diese Beobachtung wird durch eine Untersuchung von Balistreri et al. bekräftigt. Sie konnten zeigen, dass die Variabilität der Zytokinproduktion von IL-6, TNF-α und IL-10 in sVBK (mit LPS stimuliert) mit Polymorphismen im TLR4-Gen assoziiert ist (Balistreri et al., 2011). Für eine Reihe von weiteren Zytokinen ist ebenso ein Einfluss von Gen-Polymorphismen auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion bekannt (Jacob et al., 1990; Louis et al., 1998; Wouters et al., 2002). Die hohe Variabilität könnte sich im vorliegenden Fall auf die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit eines β-Fehlers ausgewirkt haben.

*hsCRP*

CRP gilt als unspezifischer Marker eines allgemeinen, akuten Entzündungsgeschehens, und wird zur Überprüfung der Wirksamkeit einer pharmakologischen Intervention in einer klinischen Studie empfohlen (Ablij und Meinders, 2002). Bislang existieren jedoch keine weiteren Studien, in denen der Einfluss von Traumeel®S auf die CRP-Synthese, weder im sportimmunologischen Kontext noch in einem Sepsismodell, untersucht wurde. Das Hauptorgan der CRP-Synthese ist die Leber. Als Hauptstimulus zur hepatischen CRP-Produktion werden wiederum die Zytokine IL-6 und IL-1 verantwortlich gemacht (Ablij und Meinders, 2002; Kasapis und Thompson, 2005). Für IL-6 (Serum) wurde in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf einen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen gefunden. Für

IL-1β (Serum) war zumindest eine Tendenz zu einem geringeren Anstieg in der Traumeel-Gruppe erkennbar (p=0,0564). Es muss kritisch angemerkt werden, dass Anstiege von hsCRP überhaupt erst zum ZP 24h beobachtet wurden und keine späteren Messzeitpunkte vorgenommen wurden. Andere Autoren berichten ebenso von signifikanten CRP-Anstiegen nach akuter Belastung zu diesem Zeitpunkt (Smith et al., 1992; Drenth et al., 1998; Meyer et al., 2001). Auch nach anderen akuten inflammatorischen Stimuli scheint ein CRP-Anstieg erst nach 24-48 Stunden das stärkste Ausmaß anzunehmen (Kushner und Rzewnicki, 1994; Pepys und Hirschfield, 2003). Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich diese Anstiege weiter fortsetzten. Aufgrund der letzten Nachbeobachtung zum ZP 24h konnte dies jedoch nicht erfasst werden und damit verbunden auch keine Überprüfung von möglichen Gruppenunterschieden in der Spätphase erfolgen.

#### *7.1.2.2 Nebenzielgrößen*

Im Rahmen der explorativen Datenanalyse lagen hinsichtlich der Nebenzielgrößen Gesamtleukozytenzahl, Neutrophilenzahl, IL-1β (sVBK: absolut und pro Monozyt) und IL-2 (sVBK) Hinweise auf mögliche Gruppenunterschiede vor.

*Leukozyten*

Der Vergleich der $AUC_I$ der Gesamtleukozytenzahl sowie der Neutrophilen deutet darauf hin, dass die belastungsinduzierte Leukozytose in der Traumeel-Gruppe geringer ausgefallen ist als dies in der Placebo-Gruppe der Fall war. Da für keine der weiteren Leukozyten-Subpopulationen ein Hinweis auf Gruppenunterschiede existierte, dürfte sich der Unterschied in der Gesamtleukozytenzahl hauptsächlich auf den Unterschied der Neutrophilen zurückführen lassen. Es ist schließlich bekannt, dass die Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten nach erschöpfender Belastung durch Neutrophile repräsentiert werden (Suzuki et al., 1996; Tvede et al., 1993; Moldoveanu et al., 2000; Nieman et al., 2000). Die Zahl der nach Belastung zirkulierenden Neutrophilen dürfte hauptsächlich durch deren Mobilisation in das Blut (aus dem Knochenmark oder dem marginalen Pool), die Apoptoserate und deren Rekrutierung in andere Gewebe bestimmt werden.

Für den belastungsinduzierten Anstieg neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut werden hauptsächlich neuroendokrine Veränderungen verantwortlich gemacht. Während als Auslöser des frühen Anstiegs von Neutrophilen eine durch Katecholamine vermittelte Demargination von der Gefäßwand identifiziert wurde, ist der verzögerte Anstieg Neutrophiler wiederum auf eine Kortisol-induzierte Rekrutierung aus dem Knochenmark zurückzuführen (McCarthy et al., 1992). Katecholamine und Cortisol

wurden allerdings in der vorliegenden Studie nicht gemessen und es existieren keine Literaturhinweise auf eine Modulation der Synthese von Katecholaminen und Kortisol durch Traumeel®S. Der Einfluss von Katecholaminen und Cortisol auf den möglichen Gruppenunterschied der Zahl neutrophiler Granulozyten bleibt daher spekulativ. Ebenso wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF und GM-CSF) und Zytokine (z.B. IL-6) an der Rekrutierung von Neutrophilen in das periphere Blut beteiligt sind (Yamada et al., 2002). Da kein Hinweis für einen Gruppenunterschied von IL-6 vorlag, kann dieses Zytokin als Mediator ausgeschlossen werden. Für GM-CSF (sVBK) wurde tendenziell eine geringere Konzentration in der Traumeel-Gruppe über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Belastung beobachtet ($p=0,0776$), was für eine geringere Mobilisation von Neutrophilen sprechen würde. Es muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass die systemische Konzentration von GM-CSF nicht bestimmt wurde.

Andererseits scheint eine intensive Belastung einen verzögernden Effekt auf die Apoptose von Neutrophilen auszuüben. Hierfür wird unter anderem G-CSF, welcher eine Reihe von Funktionen mit GM-CSF teilt, verantwortlich gemacht (Mooren et al., 2012). Auch für GM-CSF selbst liegen Hinweise vor, dass es bei Hepatitis C Patienten mit einer Neutropenie in der Lage ist, die Apoptoserate von Neutrophilen zu reduzieren (Aref et al., 2011). Insofern könnte eine geringere Produktion von GM-CSF in der Traumeel-Gruppe ebenso eine erhöhte Apoptoserate von Neutrophilen begünstigt haben.

Ein weiterer Mechanismus könnte auf die Rolle von IL-1β zurückzuführen sein, da hier eine Tendenz zu einer geringeren 24-Stunden-Konzentration in der Traumeel-Gruppe beobachtet wurde. IL-1β scheint das Ausmaß einer Leukozytose zu begrenzen. Eine intravenöse Gabe von IL-1β bewirkt eine ausgeprägte Leukopenie, wobei besonders Granulozyten betroffen zu sein scheinen (van Damme et al., 1985; van Damme et al., 1986). Des Weiteren bewirkt IL-1β über die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen eine verstärkte Margination bzw. eine verstärkte Extravasation über das Endothel (Opdenakker et al., 1998). Neben den beschriebenen direkten Einflüssen auf die Zahl der zirkulierenden Zellen, übt IL-1β weiterhin über die Induktion von G-CSF einen indirekten Einfluss auf die periphere Neutrophilenzahl aus (van Damme et al., 1985). G-CSF wurde in der vorliegenden Studie allerdings nicht gemessen, daher kann nur spekuliert werden, dass eine geringere 24-Stunden-Konzentration von IL-1β auch zu einer geringeren Ausschüttung von G-CSF geführt hat.

Im Kontext sportlicher Belastung wurde gezeigt, dass Neutrophile dazu in der Lage sind, aus dem Blut in die geschädigte Muskulatur zu migrieren und dort

Umstrukturierungsvorgänge einzuleiten (Beaton et al., 2002a; Beaton et al., 2002b; Nguyen und Tidball, 2003a; Nguyen und Tidball, 2003b; Hamada et al., 2005). Die explorative Analyse der Muskelschadenmarker legt nahe, dass es auch in der vorliegenden Studie zu einem gewissen Grad zu Muskelschädigungen kam. Daher ließe sich ein geringerer peripherer Anstieg der Neutrophilen weiterhin durch eine gesteigerte Austrittsrate in die geschädigte Muskulatur erklären. Da jedoch kein Hinweis auf Gruppenunterschiede hinsichtlich des Muskelschadens vorlag, erscheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich. Zusammengenommen bleiben Rückschlüsse auf die Ursache der geringeren Neutrophilie in der Traumeel-Gruppe anhand der vorliegenden Daten spekulativ. Eine tendenziell geringere Konzentration der die Apoptose und Mobilisation von Neutrophilen ins periphere Blut mitbestimmenden Mediatoren GM-CSF (sVBK) und IL-1β (Serum) könnte teilweise für eine geringere Neutrophilie in der Traumeel-Gruppe ursächlich sein. Da jedoch keine Aussagen über die Apoptoserate oder aber Rekrutierung von Neutrophilen aus dem peripheren Blut in Gewebe getroffen werden können, bleibt ihr jeweiliger Einfluss spekulativ. Ebenso wurde kein Funktionszustand der zirkulierenden Neutrophilen bestimmt, wodurch eine Bewertung der klinischen Relevanz kaum möglich ist.

*IL-1β*

Es lagen Hinweise darauf vor, dass es nach Belastung zu einer stärkeren Stimulation von IL-1β (sVBK), absolut als auch pro Monozyt, in der Traumeel-Gruppe kam. Die Untersuchung von IL-1β (Serum) legte außerdem eine tendenziell geringere 24-Stunden-Konzentration in der Traumeel-Gruppe nahe. Darüber hinaus wurde kein Hinweis auf einen Gruppenunterschied des Antagonisten von IL-1β (IL-1ra) gefunden, was die Bedeutsamkeit der unterschiedlichen IL-1β-Ausprägung erhöht.

Da IL-1β nach LPS-Stimulation hauptsächlich von Monozyten synthetisiert wird, deutet dieser Befund auf eine Modulation der Zellfunktion von Monozyten durch Traumeel®S hin, was wiederum zurückliegende Studienergebnisse stützt. Porozov et al. konnten zeigen, dass Traumeel®S in der Lage ist, die IL-1β Synthese von stimulierten Leukozyten und Endothelzellen *in vitro* zu modulieren (Porozov et al., 2004). Während jedoch im vorliegenden Fall eine Stimulation vorlag fanden die Autoren allerdings eine deutliche Hemmung. Auf die methodischen Diskrepanzen zwischen Porozov et al. und der vorliegenden Studie wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen.

Gestützt werden die vorliegenden Ergebnisse hingegen durch Beobachtungen von Oberbaum et al. Die Autoren stellten im Serum von Ratten im Rahmen eines *in vivo* Sepsis-Modells eine gegenüber eine Kontrollgruppe signifikant erhöhte IL-1β Konzentration im Serum der Traumeel-Gruppe fest (Oberbaum et al., 2011a). Es

wurde geschlussfolgert, dass Traumeel®S die *in vivo* IL-1β Konzentration zu steigern vermag und dies im Rahmen eines Sepsis-Modells protektiven Charakter für den Wirtsorganismus besitzt (Oberbaum et al., 2011a). Auch andere Autoren argumentieren, dass eine eingeschränkte Synthese proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten nach Antigen-Exposition nachteilige Konsequenzen für den Wirtsorganismus haben kann (Drenth et al., 1995). So wird vermutet, dass eine eingeschränkte LPS-Reaktion zentraler inflammatorischer Zytokine eine mögliche Schwachstelle in der Abwehr von Pathogenen darstellt (Weinstock et al., 1997).

Eine Möglichkeit zur Modulation der LPS-stimulierten IL-1β-Synthese durch Monozyten besteht in der Beeinflussung der Expression entsprechender Rezeptoren TLR4 und CD14. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere TLR4 als Vermittler für die LPS-stimulierte IL-1β Produktion verantwortlich zu sein scheint (Muzio und Mantovani, 2001; Sabroe et al., 2002). Im sportimmunologischen Kontext wurde gezeigt, dass eine akute Belastung eine Reduzierung der TLR-Expression auf $CD14^+$ Monozyten zur Folge hat (Lancaster et al., 2005). Daher wäre denkbar, dass Bestandteile von Traumeel®S stimulierende Effekte auf die TLR-Expression ausüben. Dies wurde allerdings in der vorliegenden Studien nicht gemessen. Insofern könnte zusammengenommen eine durch Traumeel®S bedingte Stimulation aller an einer Verstärkung der LPS-TLR4-Signaltransduktion und nachfolgenden IL-1β-Genexpression beteiligten Faktoren potentiell in Frage kommen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit lässt sich aus Beobachtungen zur Endotoxin-Toleranz ableiten. Es konnte gezeigt werden, dass es nach einer niedrigdosierten Endotoxin-Exposition zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion nach erneuter Endotoxin-Stimulation kommt, was mit einer Toleranz gegenüber Endotoxinen erklärt wird (Draisma et al., 2009). Eine erschöpfende körperliche Belastung kann wiederum zu Störungen der Darmintegrität führen und dadurch einen Übertritt von LPS in den Kreislauf begünstigen (Bosenberg et al., 1988; Nieman et al., 2006; Lambert, 2009). Entsprechend führt eine vorangehende Endotoxinaemie zu einer Herabregulierung der LPS-stimulierten IL-1β-Konzentration (Granowitz et al., 1991). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Monozyten, welche in die sVBK überführt wurden, zuvor einer belastungsinduzierten Endotoxinaemie ausgesetzt waren, welche in der Traumeel-Gruppe möglicherweise geringer ausgefallen sein könnte. Dies würde auf protektive Eigenschaften von Traumeel®S auf das Darmepithel hindeuten. Es liegen jedoch weder für eine Modulation der TLR- bzw. CD14-Expression noch für Auswirkungen von Traumeel®S auf die Darmbarriere Hinweise vor.

*IL-2*

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die belastungsinduzierte Hemmung der IL-2 Produktion in sVBK durch die Einnahme von Traumeel®S Tabletten verstärkt wurde. IL-2 wird hauptsächlich von $T_H1$-Zellen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Immunität gegen intrazelluläre Krankheitserreger. Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass eine erschöpfende Belastung ein Ungleichgewicht der $T_H1$-$T_H2$-Immunität auf Kosten der Abwehr gegen intrazelluläre Erreger zu verursachen vermag (Steensberg et al., 2001b; Suzuki et al., 2003a; Walsh et al., 2011). Als Ausdruck für die transiente zelluläre Immunsuppression nach Belastung wird neben einem geringeren Anteil zirkulierender $T_H1$-Zellen ebenso eine geringere antigen-stimulierte Produktion von IL-2 und IFN-γ durch Leukozyten angesehen (Rhind et al., 1996; Northoff et al., 1998; Steensberg et al., 2001b). Dies wird dadurch bestätigt, dass im Rahmen einer Genanalyse unter Athleten, eine Tendenz zu einem Zusammenhang zwischen einem IL-2 Genotyp, der eine erhöhte IL-2 Produktion bedingt, und einer verringerten Infektinzidenz gefunden wurde (Cox et al., 2010). Zudem scheint eine verringerte T-Zell Produktion von IL-2 Ausdruck eines alternden Immunsystems, der Immunoseneszenz, zu sein (Douziech et al., 2002).

Die meisten Studien, die den Einfluss einer akuten Belastung auf die Zytokinproduktion in Überständen von Zellkulturen untersucht haben, berichten einheitlich über verminderte IL-2 Konzentration (Bassit et al., 2000; Espersen et al., 1990; Haahr et al., 1991; Moldoveanu et al., 2001). Für eine Hemmung der $T_H1$-Zytokin-Antwort werden u.a. Glucocorticoide (Chrousos, 1995), Katecholamine (Agarwal und Marshall, 2000; Elenkov und Chrousos, 1999; Romagnani, 1997), sowie die Zytokine IL-4, IL-6 und CCL2 (Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2003b) verantwortlich gemacht. Eine Studie von Tvede et al. konnte außerdem zeigen, dass die belastungsinduzierte Hemmung der IL-2 Produktion durch Gabe von Indomethazin, ein Analgetikum aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika*, in vitro* diese Hemmung aufheben konnte (Tvede et al., 1993). Die Autoren schlussfolgerten daher, dass Prostaglandine für die Hemmung der IL-2-Produktion mitverantwortlich sind. Es kommen daher sowohl eine Traumeel®S-bedingte erhöhte Ausschüttung der genannten Mediatoren oder aber eine erhöhte Sensitivität der $T_H1$Zellen gegenüber den selbigen für die Hemmung von IL-2 (sVBK) in Betracht. Die genannten Stresshormone sowie Prostaglandine wurden jedoch in der vorliegenden Studie nicht gemessen, für die restlichen Mediatoren wurden keine Hinweise auf Gruppenunterschiede ermittelt. Ebenso erscheint eine erhöhte Hemmung der IL-2-Synthese auf Zellebene zweifelhaft, da kein Hinweis auf einen Unterschied der IL-2-Konzentration pro Lymphozyt vorlag. Die vorliegenden Ergebnisse der Durchflusszytometrie deuten ebenfalls nicht auf einen Unterschied der

Aktivierung von Lymphozyten zwischen den Behandlungsgruppen hin. Letztere Untersuchung schloss allerdings die gesamte Population der Lymphozyten, wodurch keine differenzierte Beurteilung von $T_H1$-Zellen ermöglicht wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die IL-2-Synthese durch $T_H1$-Zellen möglicherweise doch beeinflusst wurde.

Es sollte abschließend angemerkt werden, dass durch den Test auf Strukturgleichheit beider Behandlungsgruppen zum ZP prä, für IL-2 (sVBK) ein Ungleichgewicht der Behandlungsgruppen angezeigt wurde. Durch die Bestimmung der $AUC_I$, welche die individuellen Baseline-Werte berücksichtigt, dürften die Werte allerdings um dieses Ungleichgewicht bereinigt worden sein.

#### *7.1.2.3 Zusammenfassung*

Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Hauptzielgrößen IL-6 (sVBK) und hsCRP ermittelt. Die belastungsinduzierte Reaktion von IL-6 (sVBK) zeichnete sich durch eine hohe Variabilität aus, was sich auf eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit eines β-Fehlers ausgewirkt haben dürfte. Ein Anstieg von hsCRP wurde in beiden Behandlungsgruppen überhaupt erst am letzten Nachbeobachtungszeitpunkt, 24 Stunden nach Belastung, beobachtet. Spätere Zeitpunkte wurden jedoch nicht in der vorliegenden Arbeit erfasst. Die bisherigen Berichte über die antiinflammatorischen und immunregulierenden Eigenschaften von Traumeel®S *in vitro*, konnten daher durch die vorliegende Untersuchung nicht bestätigt werden.

Die explorative Datenanalyse erbrachte jedoch Hinweise auf eine Stimulation des proinflammatorischen Zytokins IL-1β (sVBK), auf eine Hemmung der Neutrophilie und eine Hemmung des Zytokins IL-2 (sVBK) durch Traumeel®S. Die bereits beschriebenen Hinweise auf eine Traumeel®S vermittelte Modulation der IL-1β-Synthese werden daher erhärtet und könnten im vorliegenden LPS/SEB-Modell auf einen protektiven Charakter von Traumeel®S hindeuten. Eine geringere belastungsinduzierte Zahl von Neutrophilen im peripheren Blut könnte auf eine Hemmung der systemischen Ausschüttung von GM-SCF (Serum) und IL-1β (Serum) zurückzuführen sein, da diese Zielgrößen tendenziell in der Traumeel-Gruppe geringer ausfielen. Für mögliche Modulatoren der IL-2-Expression wurden entweder keine entsprechenden Hinweise auf Gruppenunterschiede gefunden oder sie wurden nicht bestimmt. Weitere Studien sind notwendig um die vorliegenden Hinweise zu überprüfen und eine Bewertung der klinischen Relevanz zu ermöglichen.

## 7.2 Methodendiskussion

### 7.2.1 Auswahl der Stichprobe und Kontrolle von möglichen Störvariablen

Der funktionelle Status der Immunabwehr unterliegt einer Reihe von subjektbezogenen Einflussfaktoren, die es in immunologischen Interventionsstudien zu kontrollieren gilt. Hierzu gehört z.B. das Lebensalter der Teilnehmer, da eine Reihe von Immunparametern altersbedingte Veränderungen zeigen und deren Funktion insbesondere bei Älteren reduziert ist (Lesourd, 2006). Daher wurde das Alter der Probanden auf 40 Jahre einschließlich limitiert. Weiterhin bestehen in einigen Aspekten der Immunabwehr geschlechtsspezifische Unterschiede (Gleeson et al., 2011b), die hauptsächlich auf die Wirkungen endogenen Östrogens zurückgeführt werden (Bouman et al., 2004). Auch die belastungsinduzierte Immunantwort scheint zwischen Frauen und Männern in einigen Aspekten unterschiedlich auszufallen (Gillum et al., 2011). Für die immunologische Forschung kommt erschwerend hinzu, dass eine exogene Hormongabe in Form von Kontrazeptiva ebenso Einfluss auf verschiedene Immunfunktionen nehmen kann. Dies macht in immunologischen Studien eine Unterteilung prämenopausaler und postmenopausaler Studienteilnehmerinnen mit bzw. ohne Einnahme von Kontrazeptiva notwendig ((Gleeson, 2005). Aus den aufgeführten Gründen wurde daher auf den Einschluss von Frauen gänzlich verzichtet.

Auch für den BMI wurde ein Zusammenhang mit Parametern der Immunfunktion nachgewiesen (Dandona et al., 2004). So konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass ein erhöhter BMI mit einem erhöhten systemischen Entzündungslevel assoziiert ist, welches durch eine erhöhte systemische Konzentration von IL-6 (Mohamed-Ali, 1997) und CRP (Yudkin et al., 1999) gekennzeichnet ist. Daher kann der Einschluss von Probanden mit einem erhöhten BMI oder gar bestehender Adipositas zu einer Verzerrung der belastungsinduzierten Immunveränderungen führen (Gleeson, 2005). Daher wurde in der vorliegenden Studie zunächst eine obere BMI-Grenze von 25,0 $kg/m^2$ festgelegt. Aus Rekrutierungsgründen wurde jedoch per nachträglicher Änderung diese Grenze auf 27,4 $kg/m^2$ angehoben und damit in Kauf genommen, dass Personen mit leichtem Übergewicht (laut WHO Definition) ebenso in die Studie aufgenommen wurden. Da jedoch in der vorliegenden Studie nicht der Belastungseffekt *per se* untersucht wurde, dürfte die Randomisierung der Probanden zu einer gleichmäßigen Verteilung von Personen mit einem BMI von >25 $kg/m^2$ geführt und somit keinen Einfluss auf den Vergleich der Zielgrößen ausgeübt haben. Noch aussagekräftiger als der BMI ist ohnehin die Körperfettverteilung anzusehen. Insbesondere die Akkumulation von Fettdepots im Abdomen, der Leber und dem Muskel ist mit einem erhöhten systemischen Entzündungsniveau assoziiert (Yudkin, 2007). Andere

Verfahren zur Analyse der Körperzusammensetzung, wie z.B. eine Bioimpedanzanalyse, kamen allerdings in der vorliegenden Studie nicht zum Einsatz.
Auch für erhöhten Alkoholkonsum und Tabakrauch sind Einflüsse auf verschiedene Immunfunktionen bekannt (Karavitis und Kovacs, 2011; Lee et al., 2012). Folglich wurden diese beiden Aspekte als Ausschlusskriterien berücksichtigt. Nicht zuletzt ist ebenso bekannt, dass die belastungsinduzierte Immunreaktion von dem individuellen Trainingszustand einer Person abhängt und Athleten z.B. eine geringere Zytokinreaktion als untrainierte Personen auf einen Belastungsreiz hin aufweisen (Gokhale et al., 2007). Insofern wurde mit einem oberen Limit der $VO_2$max von 52,9 ml/kg x min das Ziel verfolgt, lediglich untrainierte bis durchschnittlich trainierte Probanden zu rekrutieren, um dadurch eine möglichst ausgeprägte belastungsinduzierte Immunreaktion erzeugen zu können. Der physiologische Normwert für einen durchschnittlichen Leistungszustand von Männern wird von einigen Autoren mit 40 – 55 ml/kg x min beziffert (Hollmann et al., 2000). Alle weiteren Ein- und/oder Ausschlusskriterien wie z.B. der Ausschluss chronisch kranker Probanden oder aber Probanden mir bekannter Laktoseintoleranz dienten darüber hinaus der Sicherheit bzw. der Unbedenklichkeit der Ausübung einer intensiven körperlichen Belastung.
Des Weiteren sind saisonale Schwankungen einiger Immunfunktionen, bedingt durch Unterschiede der Tageslicht-Exposition, Klimabedingungen, Antigen-Exposition und des Nahrungsangebots bzw. der Ernährungsweise, bekannt (Nelson, 2004). In der vorliegenden Studie wurden alle Probanden im Zeitraum vom 05.11.09 - 31.03.11 den Behandlungsgruppen randomisiert zugewiesen. Die Rekrutierung wurde in dieser Zeit für keine längeren Phasen unterbrochen. Insofern wäre davon auszugehen, dass die Probanden in allen saisonalen Phasen beiden Behandlungsgruppen gleichermaßen zugewiesen wurden. Darüber hinaus fanden alle Maßnahmen und Messungen, einschließlich der Fahrradbelastung, unter standardisierten Laborbedingungen statt.
Das Vorliegen von Vor- bzw. Begleiterkrankungen wurde vor Studienteilnahme im Rahmen des Screenings per Befragung und Einsicht in den Anamnese-Bogen (sportmedizinische Untersuchung) überprüft. Bei Vorliegen einer Begleiterkrankung, hier traf dies auf insgesamt 2 Probanden zu (1x Traumeel, 1x Placebo), wurden die betreffenden Personen nur dann eingeschlossen, wenn hierdurch oder durch die entsprechenden Therapiemaßnahmen keine Beeinflussung der Zielgrößen vorlag.
Das vorliegende Studiendesign sah vor, dass alle Probanden in der Zeit von Messzeitpunkt 1 (prä) bis Messzeitpunkt 4 (3h) im Prüfzentrum verblieben. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Probanden in dieser Zeit durch das Studienpersonal betreut und überwacht wurden. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die

Probanden entgegen den Vorgaben in dieser Zeit Nahrung zu sich nahmen, körperlich aktiv waren oder sonstigen Aktivitäten nachgingen, die einen Einfluss auf den Studienverlauf und die Zielgrößen hätten nehmen können. Einzig im Zeitraum zwischen Messzeitpunkt 4 (3h) und dem letzten Nachbeobachtungstermin 5 (24h) durften die Probanden das Prüfzentrum verlassen. Sie wurden zwar mehrfach vom Versuchsleiter angewiesen, sich entsprechend den Vorgaben zu verhalten, dennoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es in dieser Zeit zu Verletzungen der Vorgaben kam.

### 7.2.2 Studiendesign

Die vorliegende Studie entsprach einem Placebo-kontrollierten, randomisierten, doppelblinden Parallel-Gruppen-Design. Randomisierte kontrollierte Studien werden als Goldstandard in der klinischen Forschung angesehen (Schulz et al., 2011). Eine Randomisierung der Probanden soll eine hinsichtlich von Risikofaktoren, Komorbiditäten und genetischen Variabilitäten, möglichst homogene Verteilung in die Behandlungsgruppen ermöglichen (Fleiss, 1986; Altman, 1991). In der vorliegenden Studie erfolgte die Randomisierung durch interne Standardverfahren des Arzneimittelherstellers. Der Test auf Strukturgleichheit zeigt, dass durch die zufällige Gruppenzuweisung eine erfolgreiche Zufallsverteilung aller demographischer Daten sowie Zielgrößen erzielt wurde. Durch die Verblindung der Probanden, des Studienpersonals und der Biometriker bis zur Schließung der Datenbank, wurde eine höchstmögliche Verblindungsstufe sichergestellt und hierdurch Behandlungs-, Beobachtungs- und Auswertungsgleichheit der Behandlungsgruppen gewährleistet.

### 7.2.3 Auswahl der Belastung

In der vorliegenden Studie wurde eine Ausdauerbelastung auf dem Fahrrad bei einer konstanten Belastungsintensität (HF bei 80%$VO_2$max) und einer festgelegten Dauer von 60 min gewählt. Es wurde beabsichtigt, durch eine Belastungskonfiguration aus hoher Intensität und mittleren Umfang, eine größtmögliche kardiopulmonale, periphere (also die arbeitende Beinmuskulatur betreffend) und metabolische Beanspruchung hervorzurufen. Es wurde jedoch weniger das Ziel verfolgt, eine Muskelschädigung zu induzieren. Zur Induktion von Muskelschädigungen existieren ohne Zweifel geeignetere Belastungsmodelle, wie z.B. Bergabläufe oder isolierte exzentrische Muskelkontraktionen. Inwieweit das Ausmaß der belastungsinduzierten Immunantwort durch den Grad der Muskelschädigung determiniert wird, wird ohnehin kontrovers diskutiert (Ostrowski et al., 2001; Peake et al., 2005). Fahrradfahren stellt außerdem geringere koordinative Anforderungen (Marées und Heck, 2006), wodurch es auch

vermeintlich untrainierten Personen ermöglicht wird, eine Belastung über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten. Weiterhin erlaubt das Fahrradfahren gegenüber dem Laufen eine besonders artefaktfreie Messung der HF, wodurch eine ständige Echtzeitkontrolle der aktuellen Intensität sowie die Aufzeichnung und Auswertung auf einem PC ermöglicht wurde. Durch die Festlegung der Belastungsintensität anhand der $VO_2$max (ml/min x kg), wurde eine größtmögliche Standardisierung der Belastungsintensität angestrebt.

### 7.2.4 Dosierung des Prüfpräparats

Die in der vorliegenden Untersuchung vorgegebene Tabletteneinnahme von Verum und Placebo sah eine gemäß BfArM (Kommission D) maximal zugelassene Dosierung an Tag 1 vor. Mit insgesamt 8 Tabletten innerhalb der ersten 2 Nachbelastungsstunden wurde dabei insbesondere auf die kurzfristige Nachbelastungsphase Wert gelegt, da sich in dieser Zeitspanne die ausgeprägtesten Veränderungen der meisten immunologischen Zielgrößen auf zellulärer und humoraler Ebene vollziehen (Walsh et al., 2011). Zwar liegen keine pharmakokinetischen Daten über die Bestandteile von Traumeel®S vor, dennoch ist nicht auszuschließen, dass eine präventive Einnahme von Traumeel®S-Tabletten möglicherweise eher einen Einfluss auf die durch Belastung induzierten immunologischen Veränderungen auszuüben vermag.

### 7.2.5 Messzeitpunkte

Für eine Reihe von immunologischen Parametern, z.B. die Plasma-Konzentration von Zytokinen, wurde bereits eine zirkadiane Rhythmik gezeigt (DeRijk et al., 1997). Daher wurde die erste Blutentnahme standardisiert zwischen 08.00 Uhr-10.00 Uhr morgens vorgenommen. Die Messzeitpunkte prä und post dienten zunächst dazu, einen Vergleich der Ausgangsbedingungen und des Belastungseffekts an sich zwischen den Behandlungsgruppen gewährleisten zu können. Zudem wurde in Anbetracht der hohen interindividuellen Variabilität einiger Zielgrößen vor Belastung, durch Bestimmung der $AUC_I$, welche das individuelle Ausgangsniveau berücksichtigt, eine bestmögliche Abbildung der individuellen Veränderungen ermöglicht. Die Messzeitpunkte 1h und 3h wurden gewählt, um die Akutphase der Immunreaktion abbilden zu können. Da sich einige der gemessenen Zielgrößen erst verzögert nach Belastung ausgeprägt verändern können (z.B. CRP, CK oder das subjektive Schmerzempfinden), wurde durch Messzeitpunkt 24h eine Beurteilung der Spätphase ermöglicht. Da keine pharmakokinetischen Eigenschaften für Traumeel®S beschrieben sind, konnte kein darauf abgestimmter Versuchsaufbau erfolgen. Die Auswahl der Messzeitpunkte orientierte sich daher an vorherigen Studien, in denen ebenso die Auswirkungen einer

erschöpfenden Belastung auf zelluläre und humorale Immunparameter im peripheren Blut untersucht wurden (Überblick bei Pedersen und Hoffman-Goetz, 2000; Suzuki et al., 2003a; Walsh et al., 2011;). Dennoch muss kritisch angemerkt werden, dass der Nachbeobachtungszeitraum eventuell zu kurz gewählt wurde, da insbesondere die Hauptzielgröße hsCRP überhaupt erst nach 24h einen Anstieg aufwies.

### 7.2.6 Kulturmethode

In der vorliegenden Studie wurde eine sVBK eingesetzt, um das belastungsinduzierte Zytokinprofil unter dynamischen Bedingungen zu untersuchen. Diese Methode erlaubt die Untersuchung der Leukozytenfunktion hinsichtlich der Synthese von Zytokinen als Reaktion auf eine Antigen-Stimulation und findet bereits seit vielen Jahren sowohl im klinischen Kontext, z.B. bei Multipler Sklerose (Beck et al., 1988; Chofflon et al., 1991), Rheumatoider Arthritis (Zangerle et al., 1992) oder Sepsis (Volk et al., 1991), als auch in der Sportimmunologie (Lewicki et al., 1988; Northoff et al., 1994; Drenth et al., 1995; Drenth et al., 1998; Schmolz et al., 2004) verbreitete Anwendung. Auch in Studien zur Untersuchung von Arzneimittelwirksamkeit wurde diese Methode eingesetzt (Chernoff et al., 1995; von Aulock et al., 2000). Durch die Verwendung einer Vollblutkultur bleibt die Integrität aller Blutbestandteile erhalten und wird eine möglichst nahe Abbildung der *in vivo* Bedingungen ermöglicht (Yaqoob et al., 1999; Damsgaard et al., 2009). Dennoch, aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Stimuli oder Experimentalbedingungen (z.B. Kulturdauer) fällt ein Vergleich der Studienergebnisse teilweise schwer.

Zur Stimulation wurden in der vorliegenden Arbeit die bakteriellen Bestandteile LPS (Bestandteil grampositiver Bakterien) und SEB (Bestandteil gramnegativer Bakterien) eingesetzt, für die eine synergistische Wirkung beschrieben wurde (Blank et al., 1997). Da LPS hauptsächlich die Ausschüttung von Monokinen (Muzio und Mantovani, 2001) und SEB hauptsächlich die Ausschüttung von Lymphokinen (insbesondere von T-Zellen (Dinges et al., 2000) induziert, wurde die Stimulation eines breiten Zytokinspektrums ermöglicht. Die Stimulation von Monozyten mit Endotoxinen (z.B. LPS) wird als geeignetes Modell für einen Antigen-Kontakt angesehen. Zudem wird dabei eine bessere Annäherung an die natürlichen Bedingungen des immunregulatorischen Komplexes ermöglicht, als dies z.B. bei Verwendung von Mitogenen wie Concanavalin A (Con A) oder Phythämagglutinin (PHA) der Fall ist (Weinstock et al., 1997). SEB gehört zur Gruppe der Enterotoxinen, welche durch superantigen-vermittelte Aktivierung von T-Zellen eine Überproduktion von Zytokinen bewirken (Llewelyn und Cohen, 2002). Die SEB-induzierte Lymphokinausschüttung wird als geeignete Methode zur Untersuchung eines Teilaspekts des Immunsystems

angesehen (Hermann et al., 2003) und wurde auch in anderen Studien zur Charakterisierung des Immunstatus eingesetzt (Baum et al., 1999; Westerholt et al., 2000). Insofern wurde eine Kombination von Stimulantien ausgewählt, deren Anwendung etabliert zu sein scheint und die eine deutliche und vielfältige Zytokinreaktion hervorrufen.

Die Kulturdauer wurde auf 24 Stunden festgelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten Lymphokine bereits nach 24-stündiger Inkubationszeit mit SEB-Stimulation aber nicht mit PHA-Stimulation nachweisbar sind (Hermann et al., 2003). Für die LPS-stimulierte Zytokinproduktion von Monozyten wird ebenfalls ein Zeitraum von 24 Stunden als optimal erachtet (Damsgaard et al., 2009). Es wurde bereits Kritik an der Verwendung einer 24-stündigen Vollblutkultur geäußert, da hierdurch unphysiologische Bedingungen geschaffen würden. Es wurde argumentiert, dass eine 24-stündige Inkubationszeit, insbesondere nach sportlicher Belastung, einen Mangel an für Leukozyten wichtigen Energieträgern (Glucose, Glutamin) zur Folge hätte und dadurch einen Anstieg der Laktat-Konzentration bedingen würde (Gleeson, 1998). Das Kulturmedium der vorliegenden Studie beinhaltete Glucose und Glutamin. Darüber hinaus argumentieren andere Autoren wiederum dagegen, dass die mit der Zeit einhergehenden veränderten Umgebungsbedingungen keinen entscheidenden Einfluss auf die Zytokinkonzentration in sVBK nehmen dürften, da die Gen- und Proteinexpression der meisten Zytokine in den ersten Stunden nach Stimulation am höchsten ist (Netea et al., 1996) und daher davon unbeeinflusst bleiben dürfte (Drenth und van der Meer, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokinproduktion in sVBK zwar eine hohe Interindividuelle Variabilität jedoch eine geringe Intraindividuelle Variabilität aufweist (Yaqoob et al., 1999). Daher bietet sich diese Methode auch zur Erfassung wiederholter Messwerte über einen Zeitraum von 24 Stunden an. Es wurde jedoch kritisiert, dass die Zytokinvariation bei der Untersuchung von Individuen mit unterschiedlichen physiologischen oder pathologischen Zuständen nicht hinsichtlich einer veränderten Zellzahl oder Zellfunktion zur Zytokinsynthese diskrimiert werden kann (Yaqoob et al., 1999). Daher wurde für die Konzentration einiger ausgewählter Zytokine, deren Ursprung nach LPS- bzw. SEB-Stimulation mit hoher Wahrscheinlichkeit auf bestimmte Leukozytensubpopulationen zurückgeführt werden kann, in der vorliegenden Studie zusätzlich auf die entsprechende Zellzahl normiert.

### 7.2.7 Probandencompliance

Die Compliance der Probanden, beurteilt anhand der Einhaltung der Vorgaben zur Nüchternheit, Einnahme der Tabletten und Messzeitpunkte sowie der

Belastungsintervention, lässt sich zusammenfassend für beide Behandlungsgruppen als sehr gut bezeichnen. Alle Probanden gaben an, nüchtern im Prüfzentrum erschienen zu sein und alle Probanden nahmen das Standardfrühstück zu sich. Mehr als 80% der Probanden beider Behandlungsgruppen (87,5% Placebo, 84,6% Traumeel) beendeten die komplette 60-minütige Fahrradbelastung. Die übrigen Probanden fuhren mindestens 40 Minuten lang und Grund für einen vorzeitigen Abbruch war stets eine vorzeitige Erschöpfung. Die vorgegebene HF wurde dabei im Mittel um lediglich 1% in beiden Gruppen verfehlt. Die vorgegebene Umdrehungszahl von 75 bis 85 U/min wurde von ca. 75% der Probanden beider Gruppen eingehalten. Es lagen lediglich geringe Abweichungen vor. Alle 79 Probanden gaben die Tabletten nach Studienende an die Prüfärzte zurück. Es zeigte sich, dass mindestens 85% der Probanden die vorgegebene Dosis von insgesamt 14 Tabletten eingenommen hatten. Bei den restlichen Probanden kam es zu minimalen Abweichungen (± 1-2 Tabletten).

### 7.2.8 Plasma-Volumen-Korrektur

Einige Autoren führen vor Analyse der Zielgrößen anhand der Formel von Dill und Costill unter Verwendung des Hämatokrits und der Hämoglobinmenge eine Plasma-Volumen-Korrektur durch, da sich der Hämatokrit infolge körperlicher Belastung erhöhen und damit einen Einfluss auf die gemessene Konzentration von zirkulierenden Analyten nehmen kann (Dill und Costill, 1974). In der vorliegenden Studie wurde allerdings bewusst auf diese Korrektur verzichtet. Zum Einen wird diese Methode kontrovers diskutiert. So postulieren einige Autoren, dass mit dieser Methode eine Überschätzung der Plasma-Volumen-Veränderung einhergeht (Schulz et al., 2011). Zum Anderen argumentieren andere Autoren, dass die tatsächlich vorliegende Konzentration, die schließlich eine biologische Reaktion des Organismus hervorruft, von Interesse ist (Altman, 1991). Nicht zuletzt gibt es keinen Hinweis darauf (Ergebnisse der ANOVA des roten Blutbilds nicht dargestellt), dass Unterschiede des Hämatokrits und der Hämoglobinmenge zwischen den Behandlungsgruppen im Verlauf der Untersuchung vorlagen.

# 8 Fazit

In Studienabschnitt A konnten keine linearen Zusammenhänge zwischen den belastungsinduzierten Zytokinreaktionen im Serum und sVBK gefunden werden. Dennoch wiesen die meisten der gemessenen Zytokine ähnliche statistische Auffälligkeiten und Verläufe auf. Da die absoluten Zytokinkonzentrationen in sVBK deutlich höher ausfielen als in Serum-Proben, wurde die Belastungsreaktion durch Verwendung einer Antigen-Stimulation *in vitro* potenziert und, damit verbunden, bessere Detektierbarkeit der Analyte erreicht. Folglich wird eine sensitivere Untersuchung der Auswirkungen einer akuten, intensiven Belastung auf die Regulation des Immunsystems auf Zytokinebene ermöglicht.

In Studienabschnitt B konnte keine Wirksamkeit der Einnahme von Traumeel®S Tabletten auf die Beeinflussung der belastungsinduzierten inflammatorischen Immunantwort über einen Zeitraum von 24 Stunden nachgewiesen werden. Jedoch lagen für einige wenige Nebenzielgrößen, speziell im Bereich der Zytokine, Hinweise auf einen Einfluss von Traumeel®S vor. Es konnten bereits vorliegende Hinweise einer Modulation der IL-1β-Synthese durch Traumeel®S erhärtet werden. Weitere Studien sind notwendig, um eine Indikation der Traumeel®S-Gabe im sportimmunologischen Kontext beurteilen zu können.

# 9 Ausblick und Empfehlungen für zukünftige Studien

Die Datenauswertung der vorliegenden Studie basierte auf dem „Full-Analysis-Set“, also aller in die Studie aufgenommenen Probanden. Eine weitere Auswertungspopulation stellt das sogenannte „Per Protocol Set“ dar. Hier gehen alle Probanden ein, bei denen keine schwerwiegenden Protokollverletzungen vorlagen. Allerdings wird der Therapieerfolg bei dieser Methode häufig überschätzt (Gaus und Chase, 2007). Da in der vorliegenden Studien keine schwerwiegenden Protokollverletzungen vorlagen, erscheint eine entsprechende Auswertung des „Per Protocol Set“ weniger sinnvoll.

Da zum Zeitpunkt der Studienplanung keine Daten hinsichtlich des Einflusses von Traumeel®S auf die in dieser Untersuchung gewählten Zielgrößen im Rahmen einer Belastungsreaktion existierten, hatte diese Untersuchung den Charakter einer Pilot-Studie. Aus den vorliegenden Erkenntnissen können jedoch Empfehlungen für weitere Studien abgeleitet werden. Es empfehlenswert Subgruppenanalysen durchzuführen. So könnte die Stichprobe z.B. hinsichtlich der Merkmale BMI, Alter, $VO_2$max stratifiziert werden. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabiliät einiger Zielgrößen, insbesondere der Zytokine, sollte angestrebt werden, Subgruppen mit ähnlichen

Antwortmustern per Clusteranalyse zu identifizieren. Ein entsprechender Vergleich der Subgruppen könnte zusätzliche interessante Informationen generieren.

Die statistisch auffälligen Nebenzielgrößen sollten in zukünftigen Studien als Hauptzielgrößen berücksichtigt und deren Untersuchung um weitere Methoden erweitert werden. Es wäre z.B. eine Messung von Katecholaminen und Cortisol zu überlegen, um Zusammenhänge mit quantitativen Veränderungen der Leukozyten herstellen zu können. Ebenso sollte in diesem Zusammenhang die Bestimmung von G-CSF und GM-CSF im Plasma oder Serum erfolgen. Die vorliegenden Daten erbrachten Hinweise auf eine Reduktion des belastungsinduzierten Anstiegs von Neutrophilen. Es konnten jedoch keine Aussagen über deren Aktivierungs- und Funktionszustand getroffen werden. Daher sollten entsprechende Untersuchungsverfahren, wie z.B. eine Untersuchung des oxidativen Burst oder der Phagozytosefähigkeit von Granulozyten, in weiteren Studien berücksichtigt werden. Ebenso wäre eine weiterführende Untersuchung von Monozyten empfehlenswert, um den Einfluss von Traumeel®S auf die genauen Mechanismen der LPS-stimulierten IL-1β Produktion überprüfen zu können. Dies könnte die Messung der Expression von Oberflächenrezeptoren, wie z.B. TLR4, oder intrazellulärer Signalproteine wie z.B. des Transkriptionsfaktors NF-kB, umfassen. Die vorliegende Studie gab ebenfalls einen Hinweis auf eine mögliche Hemmung der Antigen-stimulierten IL-2 Produktion. Insofern würde sich eine genauere Bestimmung des Funktionszustandes von $T_H1$-Zellen zusätzlich anbieten. Zusammengenommen würde eine Kombination der Überprüfung des Funktionszustandes bestimmter Leukozytensubpopulationen mit der Analyse von Zytokinveränderungen in sVBK eine sich ergänzende Beurteilung der zellulären Immunkompetenz ermöglichen. Bei Erhebung von Zielgrößen, die sich erst verzögert nach Belastung verändern (z.B. CRP), sollten weitere Nachbeobachtungszeitpunkte wie z.B. 48h oder gar 72h, in Betracht gezogen werden. Inwiefern sich die vorliegenden Hinweise auf Gruppenunterschiede auch klinisch auswirkt, z.B. auf die Inzidenz von Infekten, könnte ebenfalls in weiteren Studien überprüft werden. Weiterhin bieten die empirischen Hinweise über die Wirksamkeit von Traumeel®S bei der Behandlung von lokal limitierten Entzündungsprozessen einen interessanten Anknüpfungspunkt für klinische Studien, in denen speziell muskelschädigende Belastungsformen (exzentrische Muskelkontraktionen oder Bergabläufe) zur Anwendung kommen. Hier könnten die Zielgrößen im Bereich des Muskelschadens um weitere Marker, wie z.B. Troponin I oder Myoglobin, ergänzt werden. Darüber hinaus sind weitere Belastungsformen bekannt, die stärkere Immunreaktionen auslösen und wenn unter extremen Umgebungsbedingungen (z.B. Hitze) ausgeführt sogar noch ausgeprägtere Entzündungsreaktionen hervorrufen vermögen. Insbesondere

Wettkämpfe im Extremausdauerbereich induzieren die mitunter stärksten Immunreaktionen und eröffnen damit weitere Möglichkeiten der Überprüfung des therapeutischen Nutzens von Traumeel®S. Hinsichtlich der Dosierung könnte in zukünftigen Studien eine prophylaktische Gabe von Traumeel®S berücksichtigt werden.

# 10 Literaturverzeichnis

**Ablij, H.; Meinders, A. (2002)**: C-reactive protein: history and revival. In: *Eur J Intern Med* 13 (7), S. 412.

**Agarwal, S. K., Marshall, G. D. (2000)**: Beta-adrenergic modulation of human type-1/type-2 cytokine balance. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (1 Pt 1), S. 91–98.

**Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E. et al. (2011)**: Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: Receptors, functions, and roles in diseases. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3), S. 701–721.e70.

**Akerstrom, T., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Penkowa, M., Pedersen, B. Klarlund (2005)**: Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. In: *J Physiol* 563 (Pt 2), S. 507–516.

**Allen, D. G. (2001)**: Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. In: *Acta Physiol. Scand* 171 (3), S. 311–319.

**Altman, D. G.** (**1991)**: Randomisation. In: *BMJ* 302 (6791), S. 1481–1482.

**Aref, S., Abdullah, D., Fouda, M., El Menshawy, N., Azmy, E., Bassam, A. et al. (2011)**: Neutrophil Apoptosis in Neutropenic Patients With Hepatitis C Infection: Role of Caspases 3, 10, and GM-CSF. In: *Indian J Hematol Blood Transfus* 27 (2), S. 81–87.

**Armstrong, R. B. (1984)**: Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. In: *Med Sci Sports Exerc* 16 (6), S. 529–538.

**Aulock, S. von, Boneberg, E. M., Hartung, T. (2000)**: Intermittent G-CSF (filgrastim) treatment cannot induce lymphocytosis in volunteers. In: *Clin. Pharmacol. Ther.* 68 (1), S. 104.

**Baggiolini, M. (2001)**: Chemokines in pathology and medicine. In: *J. Intern. Med.* 250 (2), S. 91–104.

**Bakker, G. Cm, van Erk, M. J., Pellis, L., Wopereis, S., Rubingh, C. M., Cnubben, N. Hp et al. (2010)**: An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (4), S. 1044–1059.

**Baldwin, A. C., Stevenson, S. W., Dudley, G. A. (2001)**: Nonsteroidal anti-inflammatory therapy after eccentric exercise in healthy older individuals. In: *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56 (8), S. M510-3.

**Balistreri, C. Rita, Caruso, C., Listi, F., Colonna-Romano, G., Lio, D., Candore, G. (2011)**: LPS-mediated production of pro/anti-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood samples: biological effects of +896A/G TLR4 polymorphism in a Sicilian population of healthy subjects. In: *Mech Ageing Dev* 132 (3), S. 86–92.

**Bassit, R. A., Sawada, L. A., Bacurau, R. F., Navarro, F., Costa Rosa, L. F. (2000)**: The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. In: *Med Sci Sports Exerc* 32 (7), S. 1214–1219.

**Baum, M., Klöpping-Menke, K., Müller-Steinhardt, M., Liesen, H., Kirchner, H. (1999)**: Increased concentrations of interleukin 1-beta in whole blood cultures supernatants after 12 weeks of moderate endurance exercise. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79 (6), S. 500–503.

**Baum, M., Liesen, H. (1993)**: Erschöpfende Intervallbelastung als Auslöser von Aktivierungen des Immun- und Gerinnungssystems. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 44, S. 423–428.

**Baum, M., Müller-Steinhardt, M., Liesen, H., Kirchner, H. (1997)**: Moderate and exhaustive endurance exercise influences the interferon-gamma levels in whole-blood culture supernatants. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 76 (2), S. 165–169.

**Baylis, A., Cameron-Smith, D., Burke, L. M. (2001)**: Inadvertent doping through supplement use by athletes: assessment and management of the risk in Australia. In: *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11 (3), S. 365–383.

**Bazzoni, F., Cassatella, M. A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., Baggiolini, M. (1991)**: Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. In: *J. Exp. Med.* 173 (3), S. 771–774.

**Beal, A. L., Cerra, F. B. (1994)**: Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. In: *JAMA* 271 (3), S. 226–233.

**Beaton, L. J., Allan, D. A., Tarnopolsky, M. A., Tiidus, P. M., Phillips, S. M. (2002a)**: Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. In: *Med Sci Sports Exerc* 34 (5), S. 798–805.

**Beaton, L. J., Tarnopolsky, M. A., Phillips, S. M. (2002b)**: Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. In: *J. Physiol. (Lond.)* 544 (Pt 3), S. 849–859.

**Beck, J., Rondot, P., Catinot, L., Falcoff, E., Kirchner, H., Wietzerbin, J. (1988)**: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? In: *Acta Neurol. Scand.* 78 (4), S. 318–323.

**Bellavite, P., Conforti, A., Piasere, V., Ortolani, R. (2005)**: Immunology and homeopathy. 1. Historical background. In: *Evid Based Complement Alternat Med* 2 (4), S. 441–452.

**Bellavite, P., Marzotto, M., Chirumbolo, S., Conforti, A. (2011)**: Advances in homeopathy and immunology: a review of clinical research. In: *Front Biosci (Schol Ed)* 3, S. 1363–1389.

**Bellavite, P., Ortolani, R., Conforti, A. (2006)**: Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. In: *Evid Based Complement Alternat Med* 3 (2), S. 171–186.

**Bellavite, P., Ortolani, R., Pontarollo, F., Pitari, G., Conforti, A. (2007)**: Immunology and homeopathy. 5. The rationale of the 'Simile'. In: *Evid Based Complement Alternat Med* 4 (2), S. 149–163.

**Bemelmans, M. H., van Tits, L. J., Buurman, W. A. (1996)**: Tumor necrosis factor: function, release and clearance. In: *Crit. Rev. Immunol.* 16 (1), S. 1–11.

**Berk, L. S., Nieman, D. C., Youngberg, W. S., Arabatzis, K., Simpson-Westerberg, M., Lee, J. W. et al. (1990)**: The effect of long endurance running on natural killer cells in marathoners. In: *Med Sci Sports Exerc* 22 (2), S. 207–212.

**Bermon, S. (2007)**: Airway inflammation and upper respiratory tract infection in athletes: is there a link? In: *Exerc Immunol Rev* 13, S. 6–14.

**Blank, C., Luz, A., Bendigs, S., Erdmann, A., Wagner, H., Heeg, K. (1997)**: Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (4), S. 825–833.

**Boening, D. (2000)**: Muskelkater. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2), S. 63–64.

**Böhmer, D., Ambrus, P. (1992)**: Treatment of Sports Injuries with Traumeel Ointment, A Controlled Double-Blind Study. In: *Biological Therapy*. X (4): 290-300.

**Bosenberg, A. T., Brock-Utne, J. G., Gaffin, S. L., Wells, M. T., Blake, G. T. (1988)**: Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. In: *J. Appl. Physiol.* 65 (1), S. 106–108.

**Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M. Jan, Faas, M. M. (2004)**: Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. In: *Am. J. Reprod. Immunol.* 52 (1), S. 19–26.

**Brenner, I. K., Natale, V. M., Vasiliou, P., Moldoveanu, A. I., Shek, P. N., Shephard, R. J. (1999)**: Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80 (5), S. 452–460.

**Brosius, F. (1998)**: SPSS 8.0. Professionelle Statistik unter Windows. Bonn: MITP-Verl.

**Camus, G., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., Pincemail, J., Lamy, M. (1994)**: Are similar inflammatory factors involved in strenuous exercise and sepsis? In: *Intensive Care Med* 20 (8), S. 602–610.

**Camus, G., Poortmans, J., Nys, M., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., Lamy, M. (1997)**: Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. In: *Clin Sci (Lond)* 92 (4), S. 415–422.

**Cannon, J. G., Evans, W. J., Hughes, V. A., Meredith, C. N., Dinarello, C. A. (1986)**: Physiological mechanisms contributing to increased interleukin-1 secretion. In: *J. Appl. Physiol.* 61 (5), S. 1869–1874.

**Cannon, J. G., Fiatarone, M. A., Fielding, R. A., Evans, W. J. (1994)**: Aging and stress-induced changes in complement activation and neutrophil mobilization. In: *J. Appl. Physiol* 76 (6), S. 2616–2620.

**Cannon, J. G., Kluger, M. J. (1983)**: Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. In: *Science* 220 (4597), S. 617–619.

**Cannon, J. G., Orencole, S. F., Fielding, R. A., Meydani, M., Meydani, S. N., Fiatarone, M. A. et al. (1990)**: Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. In: *Am. J. Physiol* 259 (6 Pt 2), S. R1214-9.

**Cannon, J. G., St Pierre, B. A. (1998)**: Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. In: *Mol. Cell. Biochem* 179 (1-2), S. 159–167.

**Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975)**: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 72 (9), S. 3666–3670.

**Chang, M.-K., Binder, C. J., Torzewski, M., Witztum, J. L. (2002)**: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (20), S. 13043–13048.

**Chen, Y.-j., Wong, S. Heung-sang, Wong, C.-k., Lam, C.-W., Huang, Y.-j., Siu, P. Ming-fai (2008)**: The effect of a pre-exercise carbohydrate meal on immune

responses to an endurance performance run. In: *Br. J. Nutr.* 100 (6), S. 1260–1268.

**Chernoff, A. E., Granowitz, E. V., Shapiro, L., Vannier, E., Lonnemann, G., Angel, J. B. et al. (1995)**: A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. In: *J. Immunol.* 154 (10), S. 5492–5499.

**Child, R. B., Saxton, J. M., Donnelly, A. E. (1998)**: Comparison of eccentric knee extensor muscle actions at two muscle lengths on indices of damage and angle-specific force production in humans. In: *J Sports Sci* 16 (4), S. 301–308.

**Chofflon, M., Juillard, C., Gauthier, G., Grau, G. E. (1991)**: Correlation between in vitro cytokine production and clinical evolution of multiple sclerosis patients. In: *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 142 (2), S. 107–112.

**Chrousos, G. P. (1995)**: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. In: *N Engl J Med* 332 (20), S. 1351–1362.

**Clausen, T., Nielsen, O. Baekgaard (2007)**: Potassium, Na+,K+-pumps and fatigue in rat muscle. In: *J. Physiol. (Lond.)* 584 (Pt 1), S. 295–304.

**Close, G. L., Kayani, A., Vasilaki, A., McArdle, A. (2005)**: Skeletal muscle damage with exercise and aging. In: *Sports Med* 35 (5), S. 413–427.

**Coelho, A. L., Hogaboam, C. M., Kunkel, S. L. (2005)**: Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (6), S. 553–560.

**Conforti, A., Bertani, S., Mertelmann, H., Chirumbolo, S., Lussignoli, S., Bellavite, P. (1997)**: Experimental Studies on the Anti-Inflammatory Activity of a Homeopathic Preparation. In: *Biomedical Therapy*. XV (1): 28-31.

**Connolly, D. A. J., Sayers, S. P., McHugh, M. P. (2003)**: Treatment and prevention of delayed onset muscle soreness. In: *J Strength Cond Res* 17 (1), S. 197–208.

**Cox, A. J., Gleeson, M., Pyne, D. B., Callister, R., Fricker, P. A., Scott, R. J. (2010)**: Cytokine gene polymorphisms and risk for upper respiratory symptoms in highly-trained athletes. In: *Exerc Immunol Rev* 16, S. 8–21.

**Cox, A. J., Gleeson, M., Pyne, D. B., Callister, R., Hopkins, W. G., Fricker, P. A. (2008)**: Clinical and laboratory evaluation of upper respiratory symptoms in elite athletes. In: *Clin J Sport Med* 18 (5), S. 438–445.

**Damsgaard, C. T., Lauritzen, L., Calder, P. C., Kjaer, T. M. R., Frøkiaer, H. (2009)**: Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. In: *J. Immunol. Methods* 340 (2), S. 95–101.

**Dandona, P., Aljada, A., Bandyopadhyay, A. (2004)**: Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. In: *Trends Immunol.* 25 (1), S. 4–7.

**Dannecker, E. A., Koltyn, K. F., Riley, J. L., Robinson, M. E. (2002)**: The influence of endurance exercise on delayed onset muscle soreness. In: *J Sports Med Phys Fitness* 42 (4), S. 458–465.

**Davies, M. G., Hagen, P. O. (1997a)**: Systemic inflammatory response syndrome. In: *Br J Surg* 84 (7), S. 920–935.

**Davies, M. G., Hagen, P. O. (1997b)**: Systemic inflammatory response syndrome. In: *Br J Surg* 84 (7), S. 920–935.

**Davison, G., Gleeson, M. (2005)**: Influence of acute vitamin C and/or carbohydrate ingestion on hormonal, cytokine, and immune responses to prolonged exercise. In: *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 15 (5), S. 465–479.

**Davison, G., Gleeson, M. (2006)**: The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoendocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man. In: *Eur. J. Appl. Physiol.* 97 (4), S. 454–461.

**DeRijk, R., Michelson, D., Karp, B., Petrides, J., Galliven, E., Deuster, P. et al. (1997)**: Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) production in humans: high sensitivity of TNF alpha and resistance of IL-6. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (7), S. 2182–2191.

**Dill, D. B., Costill, D. L. (1974)**: Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. In: *J Appl Physiol* 37 (2), S. 247–248.

**Dinarello, C. A. (2009)**: Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 519–550.

**Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. (2000)**: Exotoxins of Staphylococcus aureus. In: *Clin. Microbiol. Rev.* 13 (1), S. 16-34, table of contents.

**Donnelly, A. E., Maughan, R. J., Whiting, P. H. (1990)**: Effects of ibuprofen on exercise-induced muscle soreness and indices of muscle damage. In: *Br J Sports Med* 24 (3), S. 191–195.

**Douziech, N., Seres, I., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P. Michel, Arcand, M. et al. (2002)**: Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. In: *Exp. Gerontol.* 37 (2-3), S. 369–387.

**Draisma, A., Pickkers, P., Bouw, M. P. W. J. M., van der Hoeven, J. G. (2009)**: Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. In: *Crit. Care Med.* 37 (4), S. 1261–1267.

**Drenth, J. P. H., van der Meer, J. W. M. (1999)**: Whole-blood cultures: a valid and reliable tool for studying cytokines in exercise. In: *Eur J Clin Invest* 29 (2), S. 182–183.

**Drenth, J. P., Krebbers, R. J., Bijzet, J., van der Meer, J. W. (1998)**: Increased circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production but decreased tumour necrosis factor-alpha production after a 5-km run. In: *Eur. J. Clin. Invest.* 28 (10), S. 866–872.

**Drenth, J. P., van Uum, S. H., van Deuren, M., Pesman, G. J., van der Ven-Jongekrijg, J., van der Meer, J. W. (1995)**: Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. In: *J. Appl. Physiol.* 79 (5), S. 1497–1503.

**Dubuisson, D., Melzack, R. (1976)**: Classification of clinical pain descriptions by multiple group discriminant analysis. In: *Exp. Neurol.* 51 (2), S. 480–487.

**Eisenberg, S. P., Evans, R. J., Arend, W. P., Verderber, E., Brewer, M. T., Hannum, C. H., Thompson, R. C. (1990)**: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. In: *Nature* 343 (6256), S. 341–346.

**Elenkov, Chrousos (1999)**: Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. In: *Trends Endocrinol. Metab.* 10 (9), S. 359–368.

**Ertel, W., Keel, M., Buergi, U., Hartung, T., Imhof, H. G., Trentz, O. (1999)**: Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. In: *J Trauma* 46 (5), S. 784-92, discussion 792-3.

**Espersen, G. T., Elbaek, A., Ernst, E., Toft, E., Kaalund, S., Jersild, C., Grunnet, N. (1990)**: Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. In: *APMIS* 98 (5), S. 395–400.

**Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M. (1992)**: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. In: *J. Immunol.* 148 (7), S. 2207–2216.

**Febbraio, M. A., Ott, P., Nielsen, H. Bay, Steensberg, A., Keller, C., Krustrup, P. et al. (2003)**: Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2), S. E397-402.

**Fekedulegn, D. B., Andrew, M. E., Burchfiel, C. M., Violanti, J. M., Hartley, T. A., Charles, L. E., Miller, D. B. (2007)**: Area under the curve and other summary indicators of repeated waking cortisol measurements. In: *Psychosom Med* 69 (7), S. 651–659.

**Filep, J. G., Beauchamp, M., Baron, C., Paquette, Y. (1998)**: Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. In: *J. Immunol* 161 (10), S. 5656–5662.

**Fink, R., Hase, S., Lüttgau, H. C., Wettwer, E. (1983)**: The effect of cellular energy reserves and internal calcium ions on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog. In: *J. Physiol. (Lond.)* 336, S. 211–228.

**Fleiss, J. L. (1986)**: The design and analysis of clinical experiments. New York: Wiley.

**Fridén, J., Lieber, R. L. (1992)**: Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. In: *Med Sci Sports Exerc* 24 (5), S. 521–530.

**Friden, J., Sjostrom, M., Ekblom, B. (1983)**: Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. In: *Int J Sports Med* 4 (3), S. 170–176.

**Froiland, K., Koszewski, W., Hingst, J., Kopecky, L. (2004)**: Nutritional supplement use among college athletes and their sources of information. In: *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14 (1), S. 104–120.

**Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P., Keast, D. (1992b)**: Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64 (3), S. 218–227.

**Fry, R. W., Morton, A. R., Keast, D. (1992a)**: Acute intensive interval training and T-lymphocyte function. In: *Med Sci Sports Exerc* 24 (3), S. 339–345.

**Fujishima, S., Aikawa, N. (1995)**: Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. In: *Intensive Care Med* 21 (3), S. 277–285.

**Gabay, C., Kushner, I. (1999)**: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. In: *N. Engl. J. Med.* 340 (6), S. 448–454.

**Gabriel, H., Müller, H. J., Urhausen, A., Kindermann, W. (1994a)**: Suppressed PMA-induced oxidative burst and unimpaired phagocytosis of circulating granulocytes one week after a long endurance exercise. In: *Int J Sports Med* 15 (7), S. 441–445.

**Gabriel, H., Urhausen, A., Brechtel, L., Müller, H. J., Kindermann, W. (1994b)**: Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69 (2), S. 179–181.

**Garrey, W. E., Bryan, W. R. (1935)**: Variations in white blood cell counts. In: *Physiol. Rev.* 15: 597-638.

**Gaus, W., Chase, D. (2007)**: Klinische Studien. Regelwerke Strukturen Dokumente Daten. 2. Aufl. Norderstedt: Books on Demand.

**Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K. B. (2000)**: C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. In: *J. Exp. Med.* 192 (9), S. 1353–1364.

**Gillum, T. L., Kuennen, M. R., Schneider, S., Moseley, P. (2011)**: A review of sex differences in immune function after aerobic exercise. In: *Exerc Immunol Rev* 17, S. 104–121.

**Gissel, H., Clausen, T. (2001)**: Excitation-induced Ca2+ influx and skeletal muscle cell damage. In: *Acta Physiol. Scand* 171 (3), S. 327–334.

**Gleeson, M. (1998)**: Are circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production increased and tumour necrosis factor-alpha production decreased after a 5-km run? In: *Eur J Clin Invest* 28 (10), S. 873–874.

**Gleeson, M. (2000)**: The scientific basis of practical strategies to maintain immunocompetence in elite athletes. In: *Exerc Immunol Rev* 6, S. 75–101.

**Gleeson, M. (2005)**: Assessing immune function changes in exercise and diet intervention studies. In: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8 (5), S. 511–515.

**Gleeson, M. (2006)**: Immune system adaptation in elite athletes. In: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9 (6), S. 659–665.

**Gleeson, M. (2007)**: Immune function in sport and exercise. In: *J. Appl. Physiol.* 103 (2), S. 693–699.

**Gleeson, M., Almey, J., Brooks, S., Cave, R., Lewis, A., Griffiths, H. (1995)**: Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71 (2-3), S. 137–142.

**Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., McCauley, T., Tauler, P. (2011b)**: Sex differences in immune variables and respiratory infection incidence in an athletic population. In: *Exerc Immunol Rev* 17, S. 122–135.

**Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., Tauler, P. (2011a)**: Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports*.

**Gleeson, M., Nieman, D. C., Pedersen, B. K. (2004)**: Exercise, nutrition and immune function. In: *J Sports Sci* 22 (1), S. 115–125.

**Gokhale, R., Chandrashekara, S., Vasanthakumar, K. C. (2007)**: Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes--an adaptive response. In: *Cytokine* 40 (2), S. 123–127.

**Golden, C. L., Dudley, G. A. (1992)**: Strength after bouts of eccentric or concentric actions. In: *Med Sci Sports Exerc* 24 (8), S. 926–933.

**Gorski, T., Cadore, E. Lusa, Pinto, S. Santana, da Silva, E. Marczwski, Correa, C. Silva, Beltrami, F. Gabe, Kruel, L. F. Martins (2011)**: Use of NSAIDs in triathletes: prevalence, level of awareness and reasons for use. In: *Br J Sports Med* 45 (2), S. 85–90.

**Gould, J. M., Weiser, J. N. (2001)**: Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. In: *Infect. Immun.* 69 (3), S. 1747–1754.

**Granowitz, E. V., Santos, A. A., Poutsiaka, D. D., Cannon, J. G., Wilmore, D. W., Wolff, S. M., Dinarello, C. A. (1991)**: Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. In: *Lancet* 338 (8780), S. 1423–1424.

**Greiner, K., Amer, R. (2008)**: Zytokine in der Diagnostik der Uveitis. In: *Klin Monatsbl Augenheilkd* 225 (6), S. 564–569.

**Grimm, S. (2003)**: Die Apoptose: Programmierter Zelltod. In: *Chemie in unserer Zeit* 37 (3), S. 172–178.

**Groote, D. de, Zangerle, P. F., Gevaert, Y., Fassotte, M. F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F. et al. (1992)**: Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. In: *Cytokine* 4 (3), S. 239–248.

**Haahr, P., Pedersen, B., Fomsgaard, A., Tvede, N., Diamant, M., Klarlund, K. et al. (1991)**: Effect of physical exercise on in vitro production of interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin 2 and interferon-gamma. Auswirkung von koerperlichem Training auf die in vitro Produktion von Interleukin 1, Interleukin 6, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interleukin 2 und Interferon-gamma. In: *International journal of sports medicine* 12 (2), S. 223–227.

**Hamada, K., Vannier, E., Sacheck, J. M., Witsell, A. L., Roubenoff, R. (2005)**: Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. In: *FASEB J* 19 (2), S. 264–266.

**Haskill, S., Martin, G., van Le, L., Morris, J., Peace, A., Bigler, C. F. et al. (1991)**: cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (9), S. 3681–3685.

**Hausswirth, C., Louis, J., Bieuzen, F., Pournot, H., Fournier, J., Filliard, J.-R., Brisswalter, J. (2011)**: Effects of whole-body cryotherapy vs. far-infrared vs. passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners. In: *PLoS ONE* 6 (12), S. e27749.

**Heine, H., Schmolz, M. (1998)**: Induction of the Immunological Bystander Reaction by plant Extracts. In: *Biomedical Therapy*. XVI (3): 224-226.

**Helenius, I., Lumme, A., Haahtela, T. (2005)**: Asthma, airway inflammation and treatment in elite athletes. In: *Sports Med* 35 (7), S. 565–574.

**Herbold, N. H., Visconti, B. K., Frates, S., Bandini, L. (2004)**: Traditional and nontraditional supplement use by collegiate female varsity athletes. In: *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14 (5), S. 586–593.

**Hermann, C., Aulock, S. von, Graf, K., Hartung, T. (2003)**: A model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use. In: *J. Immunol. Methods* 275 (1-2), S. 69–79.

**Hirata, A., Masuda, S., Tamura, T., Kai, K., Ojima, K., Fukase, A. et al. (2003)**: Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal

muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. In: *Am. J. Pathol* 163 (1), S. 203–215.

**Hiscock, N., Chan, M. H. Stanley, Bisucci, T., Darby, I. A., Febbraio, M. A. (2004)**: Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. In: *FASEB J.* 18 (9), S. 992–994.

**Hollmann, W., Hettinger, T., Strüder, H. K., Hollmann-Hettinger (2000)**: Sportmedizin. Grundlagen für Arbeit, Training und Präventivmedizin , mit 101 Tabellen. 4. Aufl. Stuttgart: Schattauer.

**Horn, F. (2009)**: Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.

**Huard, J., Li, Y., Fu, F. H. (2002)**: Muscle injuries and repair: current trends in research. In: *J Bone Joint Surg Am* 84 (5), S. 822–832.

**Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N. et al. (2001)**: Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. In: *Immunity* 14 (6), S. 705–714.

**Ikuta, T., Okubo, H., Ishibashi, H., Okumura, Y., Hayashida, K. (1986)**: Human lymphocytes synthesize C-reactive protein. In: *Inflammation* 10 (3), S. 223–232.

**ISAACS, A., LINDENMANN, J. (1957)**: Virus interference. I. The interferon. In: *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 147 (927), S. 258–267.

**Jabs, W. J., Lögering, B. A., Gerke, P., Kreft, B., Wolber, E.-M., Klinger, M. Heinrich Friedrich et al. (2003)**: The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. In: *Eur. J. Immunol.* 33 (1), S. 152–161.

**Jacob, C. O., Fronek, Z., Lewis, G. D., Koo, M., Hansen, J. A., McDevitt, H. O. (1990)**: Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (3), S. 1233–1237.

**Jeukendrup, A. E., Vet-Joop, K., Sturk, A., Stegen, J. H., Senden, J., Saris, W. H., Wagenmakers, A. J. (2000)**: Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. In: *Clin. Sci.* 98 (1), S. 47–55.

**Jiang, Q., Detolla, L., Singh, I. S., Gatdula, L., Fitzgerald, B., van Rooijen, N. et al. (1999)**: Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. In: *Am. J. Physiol* 276 (6 Pt 2), S. R1653-60.

**Jones, D. A., Newham, D. J., Torgan, C. (1989)**: Mechanical influences on long-lasting human muscle fatigue and delayed-onset pain. In: *J. Physiol. (Lond.)* 412, S. 415–427.

**Karavitis, J., Kovacs, E. J. (2011)**: Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. In: *J Leukoc Biol* 90 (6), S. 1065–1078.

**Kasapis, C., Thompson, P. D. (2005)**: The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (10), S. 1563–1569.

**Kellar, K. L., Kalwar, R. R., Dubois, K. A., Crouse, D., Chafin, W. D., Kane, B. E. (2001)**: Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. In: *Cytometry* 45 (1), S. 27–36.

**Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A. K., Fischer, C. P., Plomgaard, P., Pedersen, B. Klarlund (2005)**: Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. In: *J. Appl. Physiol.* 99 (6), S. 2075–2079.

**Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., Pedersen, B. K., Neufer, P. D. (2001)**: Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. In: *FASEB J.* 15 (14), S. 2748–2750.

**Kendall, B., Eston, R. (2002)**: Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. In: *Sports Med* 32 (2), S. 103–123.

**Krüger, K., Frost, S., Most, E., Völker, K., Pallauf, J., Mooren, F. C. (2009)**: Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296 (5), S. R1518-27.

**Krüger, K.; Mooren, F. C. (2007)**: T cell homing and exercise. In: *Exerc Immunol Rev* 13, S. 37–54.

**Kunkel, S. L. (1999)**: Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. In: *J. Clin. Invest.* 104 (10), S. 1333–1334.

**Kurokawa, Y., Shinkai, S., Torii, J., Hino, S., Shek, P. N. (1995)**: Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocytes subpopulations. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71 (2-3), S. 245–252.

**Kushner, I., Rzewnicki, D. L. (1994)**: The acute phase response: general aspects. In: *Baillieres Clin Rheumatol* 8 (3), S. 513–530.

**Kvernmo, H., Olsen, J. O., Osterud, B. (1992)**: Changes in blood cell response following strenuous physical exercise. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64 (4), S. 318–322.

**Lambert, G. P. (2009)**: Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. In: *Journal of Animal Science* 87 (Num 14,Supp 09), S. E101.

**Lancaster, G. I., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T., Gleeson, M. (2005)**: The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. In: *J. Physiol. (Lond.)* 563 (Pt 3), S. 945–955.

**Lee, J., Taneja, V., Vassallo, R. (2012)**: Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. In: *J Dent Res* 91 (2), S. 142–149.

**Lesourd, B. (2006)**: Nutritional factors and immunological ageing. In: *Proc Nutr Soc* 65 (3), S. 319–325.

**Lewicki, R., Tchórzewski, H., Majewska, E., Nowak, Z., Baj, Z. (1988)**: Effect of maximal physical exercise on T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL 1) and interleukin 2 (IL 2) production in vitro. In: *Int J Sports Med* 9 (2), S. 114–117.

**Li, N. (2008)**: Platelet-lymphocyte cross-talk. In: *J. Leukoc. Biol.* 83 (5), S. 1069–1078.

**Li, Q., Verma, I. M. (2002)**: NF-κB regulation in the immune system. In: *Nat Rev Immunol* 2 (10), S. 725–734, zuletzt geprüft am 05.07.2012.

**Lieber, R. L., Friden, J. (2002)**: Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle soreness. In: *J Am Acad Orthop Surg* 10 (1), S. 67–73.

**Liesen, H. (1997)**: Sport und Immunsystem. Praktische Einführung in die Sportimmunologie. Stuttgart: Hippokrates Verlag.

**Llewelyn, M., Cohen, J. (2002)**: Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. In: *Lancet Infect Dis* 2 (3), S. 156–162.

**Loppnow, H. (2001)**: Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. In: *Der Internist* 42, S. 13–27.

**Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., Gevaert, Y., Schaaf-Lafontaine, N., Roland, S. et al. (1998)**: Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. In: *Clin. Exp. Immunol.* 113 (3), S. 401–406.

**Lussignoli, S., Bertani, S., Metelmann, H., Bellavite, P., Conforti, A. (1999)**: Effect of Traumeel S, a homeopathic formulation, on blood-induced inflammation in rats. In: *Complement Ther Med* 7 (4), S. 225–230.

**Lyall, K. A., Hurst, S. M., Cooney, J., Jensen, D., Lo, K., Hurst, R. D., Stevenson, L. M. (2009)**: Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (1), S. R70-81.

**Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L., Merfort, I. (1998)**: The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. In: *J. Biol. Chem.* 273 (50), S. 33508–33516.

**Mackinnon, L. T., Ginn, E., Seymour, G. J. (1993)**: Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67 (2), S. 180–184.

**Malm, C., Nyberg, P., Engstrom, M., Sjodin, B., Lenkei, R., Ekblom, B., Lundberg, I. (2000)**: Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. In: *J. Physiol. (Lond.)* 529 Pt 1, S. 243–262.

**Malm, C., Sjödin, T. Late Bertil, Sjöberg, B., Lenkei, R., Renström, P., Lundberg, I. E., Ekblom, B. (2004)**: Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. In: *J. Physiol. (Lond.)* 556 (Pt 3), S. 983–1000.

**Marées, H. de, Heck, H. (2006)**: Sportphysiologie. 9. Aufl. Köln: Sportverl. Strauß.

**Mars, M., Govender, S., Weston, A., Naicker, V., Chuturgoon, A. (1998)**: High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (2), S. 366–370.

**Martin, M., Resch, K. (2009)**: Immunologie. Stuttgart: Ulmer.

**Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L. (2000)**: Chemokines and innate immunity. In: *Rev Immunogenet* 2 (3), S. 339–358.

**Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W. et al. (1988)**: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by

interleukin 1 and tumor necrosis factor. In: *J. Exp. Med.* 167 (6), S. 1883–1893.

**McAnulty, S. R., Owens, J. T., McAnulty, L. S., Nieman, D. C., Morrow, J. D., Dumke, C. L., Milne, G. L. (2007)**: Ibuprofen use during extreme exercise: effects on oxidative stress and PGE2. In: *Med Sci Sports Exerc* 39 (7), S. 1075–1079.

**McCarthy, D. A., Macdonald, I., Grant, M., Marbut, M., Watling, M., Nicholson, S. et al. (1992)**: Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64 (6), S. 513–517.

**McInnes, I. B., Schett, G. (2007)**: Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Nat. Rev. Immunol.* 7 (6), S. 429–442.

**Melzack, R. (1975)**: The McGill pain questionnaire. Major properties and scoring methods. Amsterdam: Elsevier/North-Holland.

**Melzack, R. (1987)**: The short-form McGill Pain Questionnaire. In: *Pain* 30 (2), S. 191–197.

**Meyer, T., Gabriel, H. H., Rätz, M., Müller, H. J., Kindermann, W. (2001)**: Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. In: *Med Sci Sports Exerc* 33 (4), S. 549–555.

**Milias, G. A., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Athanasopoulos, S., Antonopoulou, S. (2005)**: Effects of eccentric exercise-induced muscle injury on blood levels of platelet activating factor (PAF) and other inflammatory markers. In: *Eur. J. Appl. Physiol* 95 (5-6), S. 504–513.

**Mohamed-Ali, V. (1997)**: Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor-, in Vivo. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82 (12), S. 4196–4200.

**Mokuno, K., Riku, S., Sugimura, K., Takahashi, A., Kato, K., Osugi, S. (1987)**: Serum creatine kinase isoenzymes in Duchenne muscular dystrophy determined by sensitive enzyme immunoassay methods. In: *Muscle Nerve* 10 (5), S. 459–463.

**Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J., Shek, P. N. (2000)**: Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. In: *J. Appl. Physiol* 89 (4), S. 1499–1504.

**Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J., Shek, P. N. (2001)**: The cytokine response to physical activity and training. In: *Sports Med* 31 (2), S. 115–144.

**Mooren, F. C., Blöming, D., Lechtermann, A., Lerch, M. M., Völker, K. (2002)**: Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. In: *J. Appl. Physiol.* 93 (1), S. 147–153.

**Mooren, F. C., Lechtermann, A., Völker, K. (2004)**: Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. In: *Med Sci Sports Exerc* 36 (9), S. 1476–1483.

**Mooren, F. C., Volker, K., Klocke, R., Nikol, S., Waltenberger, J., Kruger, K. (2012)**: Exercise delays neutrophil apoptosis by a G-CSF dependent mechanism. In: *J Appl Physiol*.

**Mooren, F.C. (2003)**: Immunologie und Sport. In: *Akt Rheumatol*. 28: 187-195.

**Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A. M., Pella, N. et al. (1991)**: CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal

antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. In: *J. Exp. Med.* 174 (6), S. 1393–1398.

**Moser, B., Loetscher, P. (2001)**: Lymphocyte traffic control by chemokines. In: *Nat. Immunol* 2 (2), S. 123–128.

**Mucci, P., Durand, F., Lebel, B., Bousquet, J., Préfaut, C. (2000)**: Interleukins 1-beta, -8, and histamine increases in highly trained, exercising athletes. In: *Med Sci Sports Exerc* 32 (6), S. 1094–1100.

**Murphy, E. Angela, Davis, J. Mark, Carmichael, M. D., Mayer, E. P., Ghaffar, A. (2009)**: Benefits of oat beta-glucan and sucrose feedings on infection and macrophage antiviral resistance following exercise stress. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (4), S. R1188-94.

**Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K. et al. (2000)**: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. In: *Pharmacol. Rev* 52 (1), S. 145–176.

**Muzio, M., Mantovani, A. (2001)**: Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. In: *Journal of Endotoxin Research* 7 (4), S. 297–300.

**Nelson, R. J. (2004)**: Seasonal immune function and sickness responses. In: *Trends Immunol* 25 (4), S. 187–192.

**Netea, M. G., Drenth, J. P., Bont, N. de, Hijmans, A., Keuter, M., Dharmana, E. et al. (1996)**: A semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for measurement of MRNA for TNF-alpha and IL-1 beta in whole blood cultures: its application in typhoid fever and exentric exercise. In: *Cytokine* 8 (9), S. 739–744.

**Neumann, J. (2008)**: Immunbiologie. Eine Einführung. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag (Springer-Lehrbuch).

**Newham, D. J. (1988)**: The consequences of eccentric contractions and their relationship to delayed onset muscle pain. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57 (3), S. 353–359.

**Newham, D. J., Jones, D. A., Clarkson, P. M. (1987)**: Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. In: *J. Appl. Physiol* 63 (4), S. 1381–1386.

**Newham, D. J., Mills, K. R., Quigley, B. M., Edwards, R. H. (1983)**: Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. In: *Clin. Sci* 64 (1), S. 55–62.

**Nguyen, H. X., Tidball, J. G. (2003a)**: Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. In: *J. Physiol. (Lond.)* 547 (Pt 1), S. 125–132.

**Nguyen, H. X., Tidball, J. G. (2003b)**: Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. In: *J. Physiol. (Lond.)* 553 (Pt 3), S. 833–841.

**Nielsen, S., Pedersen, B. Klarlund (2008)**: Skeletal muscle as an immunogenic organ. In: *Curr Opin Pharmacol* 8 (3), S. 346–351.

**Nieman, D. (2000)**: Sportimmunologie: aktuelle Perspektiven für den Sportler. In: *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (9), S. 291–296.

**Nieman, D. C. (1994)**: Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. In: *Med Sci Sports Exerc* 26 (2), S. 128–139.

**Nieman, D. C. (1998)**: Influence of carbohydrate on the immune response to intensive, prolonged exercise. In: *Exerc Immunol Rev* 4, S. 64–76.

**Nieman, D. C. (2008)**: Immunonutrition support for athletes. In: *Nutr. Rev.* 66 (6), S. 310–320.

**Nieman, D. C., Berk, L. S., Simpson-Westerberg, M., Arabatzis, K., Youngberg, S., Tan, S. A. et al. (1989)**: Effects of long-endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners. In: *Int J Sports Med* 10 (5), S. 317–323.

**Nieman, D. C., Henson, D. A., Dumke, C. L., Oley, K., McAnulty, S. R., Davis, J. Mark et al. (2006)**: Ibuprofen use, endotoxemia, inflammation, and plasma cytokines during ultramarathon competition. In: *Brain Behav. Immun.* 20 (6), S. 578–584.

**Nieman, D. C., Henson, D. A., Maxwell, K. R., Williams, A. S., McAnulty, S. R., Jin, F. et al. (2009)**: Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. In: *Med Sci Sports Exerc* 41 (7), S. 1467–1475.

**Nieman, D. C., Henson, D. A., Smith, L. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Davis, J. M. et al. (2001)**: Cytokine changes after a marathon race. In: *J. Appl. Physiol* 91 (1), S. 109–114.

**Nieman, D. C., Johanssen, L. M., Lee, J. W., Arabatzis, K. (1990)**: Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. In: *J Sports Med Phys Fitness* 30 (3), S. 316–328.

**Nieman, D. C., Miller, A. R., Henson, D. A., Warren, B. J., Gusewitch, G., Johnson, R. L. et al. (1994)**: Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. In: *Int J Sports Med* 15 (4), S. 199–206.

**Nieman, D. C., Peters, E. M., Henson, D. A., Nevines, E. I., Thompson, M. M. (2000)**: Influence of Vitamin C Supplementation on Cytokine Changes Following an Ultramarathon. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research* 20 (11), S. 1029–1035.

**Northoff, H., Berg, A. (1991)**: Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. In: *Int J Sports Med* 12 Suppl 1, S. S9-15.

**Northoff, H., Berg, A., Weinstock, C. (1998)**: Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN-gamma concept. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76 (5), S. 497–504.

**Northoff, H., Weinstock, C., Berg, A. (1994)**: The cytokine response to strenuous exercise. In: *Int J Sports Med* 15 Suppl 3, S. S167-71.

**Oberbaum, M., Spira, R. M., Lukasiewicz, E., Armon, Y., Samuels, N., Singer, S. Roee et al. (2011a)**: Effect of Traumeel S on cytokine profile in a cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model in rats. In: *J Altern Complement Med* 17 (10), S. 909–913.

**Oberbaum, M., Spira, R. M., Lukasiewicz, E., Armon, Y., Samuels, N., Singer, S. Roee et al. (2011b)**: Effect of Traumeel S on cytokine profile in a cecal ligation and puncture (CLP) sepsis model in rats. In: *J Altern Complement Med* 17 (10), S. 909–913.

**Oberbaum, M., Yaniv, I., Ben-Gal, Y., Stein, J., Ben-Zvi, N., Freedman, L. S., Branski, D. (2001)**: A randomized, controlled clinical trial of the homeopathic medication TRAUMEEL S in the treatment of chemotherapy-induced

stomatitis in children undergoing stem cell transplantation. In: *Cancer* 92 (3), S. 684–690.

**Oesch, P. (2007)**: Assessments in der muskuloskelettalen Rehabilitation. 1. Aufl. Bern: Huber.

**Opdenakker, G., Fibbe, W. E., van Damme, J. (1998)**: The molecular basis of leukocytosis. In: *Immunol. Today* 19 (4), S. 182–189.

**O'Shea, J. J., Ma, A., Lipsky, P. (2002)**: Cytokines and autoimmunity. In: *Nat. Rev. Immunol.* 2 (1), S. 37–45.

**Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., Pedersen, B. K. (1999)**: Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. In: *J. Physiol. (Lond.)* 515 (Pt 1), S. 287–291.

**Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., Pedersen, B. K. (2001)**: Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. In: *Eur. J. Appl. Physiol* 84 (3), S. 244–245.

**Ostrowski, K., Schjerling, P., Pedersen, B. (2000)**: Physical activity and plasma interleukin-6 in humans - effect of intensity of exercise. Koerperliche Aktivitaet und die Plasmakonzentration des Interleukin-6 beim Menschen - Auswirkung der Belastungsintensitaet. In: *European journal of applied physiology* 83 (6), S. 512–515.

**Peake, J., Nosaka, K., Suzuki, K. (2005)**: Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. In: *Exerc Immunol Rev* 11, S. 64–85.

**Pedersen, B. K., Febbraio, M. A. (2008)**: Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. In: *Physiol. Rev.* 88 (4), S. 1379–1406.

**Pedersen, B. K., Hoffman-Goetz, L. (2000)**: Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. In: *Physiol. Rev.* 80 (3), S. 1055–1081.

**Pedersen, B. K., Ostrowski, K., Rohde, T., Bruunsgaard, H. (1998)**: The cytokine response to strenuous exercise. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76 (5), S. 505–511.

**Pedersen, B. K., Steensberg, A., Schjerling, P. (2001)**: Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. In: *J. Physiol. (Lond.)* 536 (Pt 2), S. 329–337.

**Pedersen, B. K. (2006)**: The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. In: *Essays Biochem.* 42, S. 105–117.

**Pedersen, B. K. (2011)**: Muscles and their myokines. In: *J. Exp. Biol.* 214 (Pt 2), S. 337–346.

**Pepys, M. B., Baltz, M. L. (1983)**: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. In: *Adv. Immunol.* 34, S. 141–212.

**Pepys, M. B., Hirschfield, G. M. (2003)**: C-reactive protein: a critical update. In: *J. Clin. Invest.* 111 (12), S. 1805–1812.

**Peters, E. M. (1997)**: Exercise, immunology and upper respiratory tract infections. In: *Int J Sports Med* 18 Suppl 1, S. S69-77.

**Peters, E. M., Goetzsche, J. M., Grobbelaar, B., Noakes, T. D. (1993)**: Vitamin C supplementation reduces the incidence of postrace symptoms of upper-respiratory-tract infection in ultramarathon runners. In: *Am. J. Clin. Nutr* 57 (2), S. 170–174.

**Petersen, A. Marie W., Pedersen, B. Klarlund (2005)**: The anti-inflammatory effect of exercise. In: *J. Appl. Physiol.* 98 (4), S. 1154–1162.

**Phillips, M. D., Flynn, M. G., McFarlin, B. K., Stewart, L. K., Timmerman, K. L., Ji, H. (2008)**: Resistive exercise blunts LPS-stimulated TNF-alpha and Il-1 beta. In: *Int J Sports Med* 29 (2), S. 102–109.

**Pool, E. J., Robson, P. J., Smith, C., van Wyk, J. H., Myburgh, K. H. (2002)**: In vitro interleukin-6 release in whole blood cultures in samples taken at rest from triathletes and professional rugby players. In: *Eur. J. Appl. Physiol.* 87 (3), S. 233–237.

**Porozov, S., Cahalon, L., Weiser, M., Branski, D., Lider, O., Oberbaum, M. (2004)**: Inhibition of IL-1beta and TNF-alpha secretion from resting and activated human immunocytes by the homeopathic medication Traumeel S. In: *Clin. Dev. Immunol.* 11 (2), S. 143–149.

**Powis, G., Gallegos, A., Abraham, R. T., Ashendel, C. L., Zalkow, L. H., Grindey, G. B., Bonjouklian, R. (1994)**: Increased intracellular Ca2+ signaling caused by the antitumor agent helenalin and its analogues. In: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34 (4), S. 344–350.

**Proske, U., Allen, T. J. (2005)**: Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. In: *Exerc Sport Sci Rev* 33 (2), S. 98–104.

**Proske, U., Morgan, D. L. (2001)**: Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. In: *J. Physiol. (Lond.)* 537 (Pt 2), S. 333–345.

**Pruessner, J. C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., Hellhammer, D. H. (2003)**: Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. In: *Psychoneuroendocrinology* 28 (7), S. 916–931.

**Radvila, A., Adler, R. H., Galeazzi, R. L., Vorkauf, H. (1987)**: The development of a German language (Berne) pain questionnaire and its application in a situation causing acute pain. In: *Pain* 28 (2), S. 185–195.

**Rehman, J., Mills, P. J., Carter, S. M., Chou, J., Thomas, J., Maisel, A. S. (1997)**: Dynamic exercise leads to an increase in circulating ICAM-1: further evidence for adrenergic modulation of cell adhesion. In: *Brain Behav. Immun.* 11 (4), S. 343–351.

**Retraction (2011)**: Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. In: *J Physiol* 589 (Pt 13), S. 3407.

**Rhind, S. G., Shek, P. N., Shinkai, S., Shephard, R. J. (1996)**: Effects of moderate endurance exercise and training on in vitro lymphocyte proliferation, interleukin-2 (IL-2) production, and IL-2 receptor expression. In: *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74 (4), S. 348–360.

**Rivier, A., Pène, J., Chanez, P., Anselme, F., Caillaud, C., Préfaut, C. et al. (1994)**: Release of cytokines by blood monocytes during strenuous exercise. In: *Int J Sports Med* 15 (4), S. 192–198.

**Romagnani, S. (1997)**: The Th1/Th2 paradigm. In: *Immunol. Today* 18 (6), S. 263–266.

**Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K. B., Dower, S. K. (2002)**: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. In: *J. Immunol* 168 (9), S. 4701–4710.

**Sayers, S., Clarkson, P. (2001)**: Force recovery after eccentric exercise in males and females. Regeneration der Muskelkraft nach exzentrischer Muskelarbeit bei Maennern und Frauen. In: *European journal of applied physiology* 84 (1-2), S. 122–126.

**Schmolz, M., Hurst, T., Bailey, D., Powell, J., Forsey, R., Thompson, J. et al. (2004)**: Validation of a new highly standardised, lab-independent whole-blood leukocyte function assay for clinical trials (ILCS®). In: *Experimental Gerontology* 39 (4), S. 667–671.

**Schneider, C. (2011)**: Traumeel - an emerging option to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of acute musculoskeletal injuries. In: *Int J Gen Med* 4, S. 225–234.

**Schulz, K. F., Altman, D. G., Moher, D. (2011)**: CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. In: *Int J Surg* 9 (8), S. 672–677.

**Schütt, C., Bröker, B. (2011)**: Grundwissen Immunologie. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

**Sencer, S. F., Zhou, T., Freedman, L. S., Ives, J. A., Chen, Z., Wall, D. et al. (2012)**: Traumeel S in preventing and treating mucositis in young patients undergoing SCT: a report of the Children's Oncology Group. In: *Bone Marrow Transplant*.

**Senchina, D. S., Shah, N. B., Doty, D. M., Sanderson, C. R., Hallam, J. E. (2009)**: Herbal supplements and athlete immune function--what's proven, disproven, and unproven? In: *Exerc Immunol Rev* 15, S. 66–106.

**Shephard, R. J. (2001)**: Sepsis and mechanisms of inflammatory response: is exercise a good model? In: *Br J Sports Med* 35 (4), S. 223–230.

**Skurvydas, A., Sipaviciene, S., Krutulyte, G., Gailiuniene, A., Stasiulis, A., Mamkus, G., Stanislovaitis, A. (2006)**: Dynamics of indirect symptoms of skeletal muscle damage after stretch-shortening exercise. In: *J Electromyogr Kinesiol* 16 (6), S. 629–636.

**Smith, J. A., Telford, R. D., Baker, M. S., Hapel, A. J., Weidemann, M. J. (1992)**: Cytokine immunoreactivity in plasma does not change after moderate endurance exercise. In: *J. Appl. Physiol.* 73 (4), S. 1396–1401.

**Smith, J., Pyne, D. (1997)**: Exercise, training, and neutrophil function. Koerperliche Belastung, koerperliches Training und die Funktion der Neutrophilen. In: *Exercise Immunology Review* 3, S. 96–117.

**Smith, L. L. (2000)**: Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? In: *Med Sci Sports Exerc* 32 (2), S. 317–331.

**Sorichter, S., Koller, A., Haid, C., Wicke, K., Judmaier, W., Werner, P., Raas, E. (1995)**: Light concentric exercise and heavy eccentric muscle loading: effects on CK, MRI and markers of inflammation. In: *Int J Sports Med* 16 (5), S. 288–292.

**Spence, L., Brown, W. J., Pyne, D. B., Nissen, M. D., Sloots, T. P., McCormack, J. G. et al. (2007)**: Incidence, etiology, and symptomatology of upper respiratory illness in elite athletes. In: *Med Sci Sports Exerc* 39 (4), S. 577–586.

**Sprenger, H., Jacobs, C., Nain, M., Gressner, A. M., Prinz, H., Wesemann, W., Gemsa, D. (1992)**: Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. In: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 63 (2), S. 188–195.

**Starkie, R. L., Arkinstall, M. J., Koukoulas, I., Hawley, J. A., Febbraio, M. A. (2001)**: Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. In: *J. Physiol. (Lond.)* 533 (Pt 2), S. 585–591.

**Starkie, R. L., Hargreaves, M., Rolland, J., Febbraio, M. A. (2005)**: Heat stress, cytokines, and the immune response to exercise. In: *Brain Behav. Immun.* 19 (5), S. 404–412.

**Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B., Pedersen, B. K. (2001a)**: Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. In: *J. Physiol. (Lond.)* 537 (Pt 2), S. 633–639.

**Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K., Pedersen, B. Klarlund (2003)**: IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2), S. E433-7.

**Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A., Pedersen, B. Klarlund (2002)**: IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (6), S. E1272-8.

**Steensberg, A., Toft, A. D., Bruunsgaard, H., Sandmand, M., Halkjaer-Kristensen, J., Pedersen, B. K. (2001b)**: Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. In: *J. Appl. Physiol.* 91 (4), S. 1708–1712.

**Suzuki, K., Nakaji, S., KURAKAKE, S., Totsuka, M., Sato, K., Kuriyama, T. et al. (2003a)**: Exhaustive exercise and type-1/type-2 cytokine balance with special focus on interleukin-12 p40/p70. In: *Exerc Immunol Rev* 9, S. 48–57.

**Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., LIU, Q., KURAKAKE, S., OKAMURA, N. et al. (2003b)**: Impact of a Competitive Marathon Race on Systemic Cytokine and Neutrophil Responses. In: *Medicine & Science in Sports & Exercise* 35 (2), S. 348–355.

**Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Totsuka, M., Sato, K., Sugawara, K. (2002)**: Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. In: *Exerc Immunol Rev* 8, S. 6–48.

**Suzuki, K., Sato, H., Kikuchi, T., Abe, T., Nakaji, S., Sugawara, K. et al. (1996)**: Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. In: *J. Appl. Physiol.* 81 (3), S. 1213–1222.

**Suzuki, K., Totsuka, M., Nakaji, S., Yamada, M., Kudoh, S., Liu, Q. et al. (1999)**: Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. In: *J. Appl. Physiol* 87 (4), S. 1360–1367.

**Szumilak, D., Sułowicz, W., Walatek, B. (1998)**: Rhabdomioliza: obraz kliniczny, przyczyny, powikłania i leczenie. In: *Prz. Lek* 55 (5), S. 274–279.

**Taylor, C., Rogers, G., Goodman, C., Baynes, R., Bothwell, T., Bezwoda, W. et al. (1987)**: Hematologic, iron-related, and acute-phase protein responses to sustained strenuous exercise. Reaktionen der Blutzusammensetzung, des Eisenstoffwechsels und des reaktiven Proteins auf andauernde erschoepfende Belastung. In: *Journal of applied physiology* 62 (2), S. 464–469.

**Testi, R., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (1989)**: Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor

cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca++] and stimulation of protein kinase C. In: *J. Immunol.* 142 (6), S. 1854–1860.

**Tilg, H., Dinarello, C. A., Mier, J. W. (1997)**: IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. In: *Immunol. Today* 18 (9), S. 428–432.

**Timmons, B. W., Hamadeh, M. J., Tarnopolsky, M. A. (2009)**: Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise. In: *Eur. J. Appl. Physiol.* 105 (1), S. 13–18.

**Toft, A. Dyhr, Falahati, A., Steensberg, A. (2011)**: Source and kinetics of interleukin-6 in humans during exercise demonstrated by a minimally invasive model. In: *Eur. J. Appl. Physiol.* 111 (7), S. 1351–1359.

**Travers, P., Walport, M. (2009)**: Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Online verfügbar unter http://media.obvsg.at/AC07663593-4001.

**Turk, D. C., Rudy, T. E., Salovey, P. (1985)**: The McGill Pain Questionnaire reconsidered: confirming the factor structure and examining appropriate uses. In: *Pain* 21 (4), S. 385–397.

**Tvede, N., Kappel, M., Halkjaer-Kristensen, J., Galbo, H., Pedersen, B. K. (1993)**: The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. In: *Int J Sports Med* 14 (5), S. 275–282.

**Ullum, H., Haahr, P. M., Diamant, M., Palmø, J., Halkjaer-Kristensen, J., Pedersen, B. K. (1994)**: Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. In: *J. Appl. Physiol* 77 (1), S. 93–97.

**van Damme, J., Ley, M. de, Opdenakker, G., Billiau, A., Somer, P. de, van Beeumen, J. (1985)**: Homogeneous interferon-inducing 22K factor is related to endogenous pyrogen and interleukin-1. In: *Nature* 314 (6008), S. 266–268.

**van Damme, J., Opdenakker, G., Ley, M. de, Heremans, H., Billiau, A. (1986)**: Pyrogenic and haematological effects of the interferon-inducing 22K factor (interleukin 1 beta) from human leukocytes. In: *Clin. Exp. Immunol.* 66 (2), S. 303–311.

**van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. (1998)**: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. In: *Cytometry* 31 (1), S. 1–9.

**Volk, H. D., Thieme, M., Heym, S., Döcke, W. D., Ruppe, U., Tausch, W. et al. (1991)**: Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. In: *Behring Inst. Mitt.* (88), S. 208–215.

**Vollmar, A., Dingermann, T., Zündorf, I. (2005)**: Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe , mit 47 Tabellen. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

**Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Gleeson, M., Woods, J. A., Bishop, N. C. et al. (2011)**: Position statement. Part one: Immune function and exercise. In: *Exerc Immunol Rev* 17, S. 6–63.

**Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A., Armstrong, R. B. (2001)**: Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. In: *Exerc Sport Sci Rev* 29 (2), S. 82–87.

**Weinstock, C., König, D., Harnischmacher, R., Keul, J., Berg, A., Northoff, H. (1997)**: Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. In: *Med Sci Sports Exerc* 29 (3), S. 345–354.

**Westerholt, S., Hartung, T., Tollens, M., Güstrau, A., Oberhoffer, M., Karch, H. et al. (2000)**: Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. In: *Cytokine* 12 (6), S. 822–827.

**Wouters, I. M., Douwes, J., Thorne, P. S., Heederik, D., Doekes, G. (2002)**: Inter- and intraindividual variation of endotoxin- and beta(1 -- 3)-glucan-induced cytokine responses in a whole blood assay. In: *Toxicol Ind Health* 18 (1), S. 15–27.

**Yamada, M., Suzuki, K., Kudo, S., Totsuka, M., Nakaji, S., Sugawara, K. (2002)**: Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. In: *J. Appl. Physiol.* 92 (5), S. 1789–1794.

**Yaqoob, P., Newsholme, E. A., Calder, P. C. (1999)**: Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. In: *Cytokine* 11 (8), S. 600–605.

**Yudkin, J. S. (2007)**: Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. In: *Horm Metab Res* 39 (10), S. 707–709.

**Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D. A., Emeis, J. J., Coppack, S. W. (1999)**: C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction. A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue? In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (4), S. 972–978, zuletzt geprüft am 25.06.2012.

**Zallen, G., Moore, E. E., Johnson, J. L., Tamura, D. Y., Aiboshi, J., Biffl, W. L., Silliman, C. C. (1999)**: Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. In: *J Trauma* 46 (1), S. 42–48.

**Zangerle, P. F., Groote, D. de, Lopez, M., Meuleman, R. J., Vrindts, Y., Fauchet, F. et al. (1992)**: Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood: II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Cytokine* 4 (6), S. 568–575.

**Zell, J., Connert, W. D., Mau, J., Feuerstake, G. (1988)**: Behandlung von akuten Sprunggelenksdistorsionen. Doppelblindstudie zum Wirksamkeitsnachweis eines homöopathischen Salbenpräparats. In: *Fortschr. Med.* 106 (5), S. 96–100.

# 11 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich des Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde, unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Das Gleiche gilt auch für die Abbildungen und Tabellen in dieser Arbeit."

Gießen, im August 2012 ……..

Christian Pilat

# 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen, mich unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieser Forschungsarbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gebührt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Frank C. Mooren, der mir das Vertrauen zur Durchführung dieser Arbeit geschenkt, meinen gesamten wissenschaftlichen Werdegang begleitet und mich dabei stets freundschaftlich unterstützt hat.

Meinen lieben Eltern danke ich dafür, dass sie mich stets in dem, was ich tue unterstützen und mir in allen Lebenslagen Liebe und Rückhalt schenken.

Aus tiefstem Herzen danke ich Ayten Hausam, Du hast mir während der gesamten Promotion die nötige Kraft gegeben und warst immer für mich da.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Karsten Krüger, der mich stets in allen Belangen fachlich und moralisch unterstützt hat und mir zudem als Freund zur Seite stand.

Des Weiteren wäre diese Arbeit nicht ohne die tatkräftige Unterstützung aller Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung für Sportmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen möglich gewesen. Insbesondere danke ich Rosalie Hausner, Achim Wagner und Torsten Frech, auf deren Unterstützung ich stets zählen konnte.

Mein weiterer Dank gilt Laura Bürmann und Maurice Barbehön und allen Examens- und Bachelorkandidaten, die an der Durchführung dieser Forschungsarbeit beteiligt waren. Ich wünsche Euch alles Gute für Euren weiteren Werdegang.

Nicht zuletzt möchte ich allen Kooperationspartnern danken. Ein besonderer Dank gilt Herrn Wolfgang Mayer, den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Statistik und Herrn Dr. med. Zatik für die freundschaftliche Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung.

# 13 Anhang

Datenerhebungsbogen („Case Report Form“)

Schmerzfragebogen SF-MPQ

Probandeninformation

# TEIR-1

**EudraCT No.: 2009-010897-39**

## EFFECTS OF TRAUMEEL®S TABLETS ON EXERCISE INDUCED INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE

**A MONO-CENTER**
**RANDOMIZED, DOUBLE BLIND**
**PLACEBO-CONTROLLED**
**PARALLEL GROUP**
**PILOT STUDY**

# CASE REPORT FORM

**Amendment #1 Included**

## STUDY SUBJECT NUMBER

**1-I___I___I___I**

## DATE OF STUDY ENROLLMENT

**I___I___I___I___I___I___I**

**Prof. Dr. med. Frank C. Mooren**
**Lehrstuhl für Sportmedizin**
**Institut für Sportwissenschaft der**
**Justus-Liebig-Universität Giessen**
**Kugelberg 62**
**35394 Giessen**

# TEIR-1

## Instructions for CRF Completion

1. Please fill in every data field completely and accurately in print letters by using a **black** ball point pen. For any missing data a written explanation needs to be provided.
2. Write "N/D" in the empty space, if a procedure was not done. If an item is not applicable to the individual case, write "N/A".
3. Please enter the study subject number on top of each page.
4. Erroneous entries should be crossed out with a single slash leaving the erroneous information legible. Write the correct information above or below. Corrections always need to be initialed and dated by the investigator or an authorized designee.
5. At the end of each CRF section the investigator confirms by signature and date that the information provided is reviewed, complete and accurate.
6. Please enter the time always in the 24-hour clock format (4 digits, e.g. 08:35) and dates always in the dd/mm/yy format (6 digits, e.g. 05/08/09).

### STUDY FLOW CHART

| ***Procedures:*** | **Screening** | **Day 1** | | | | | **Day 2** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Day -7 to 0** | **Pre-Exercise** | | **Post-Exercise** | | | **a.m.** |
| | | **prepare** | **TP1** | **TP2** | **TP3** | **TP4** | **TP5** |
| **Demographic Information** | X | | | | | | |
| **Performance Test Review** | X | | | | | | |
| **Previous/Concomitant Disorders** | X | *re-check!* | | | | | X |
| **Previous/Concomitant Medication** | X | *re-check!* | | | | | X |
| **Inclusion/Exclusion Criteria** | X | *re-check!* | | | | | |
| **Subject Information** | X | | | | | | |
| **Signed Informed Consent** | X | | | | | | |
| **Standardized Breakfast** | | X | | | | | |
| **Randomization / Study Entry** | | X | | | | | |
| **Blood Samples** | | | X | X | X | X | X |
| **McGill Pain Questionnaire** | | | X | X | X | X | X |
| **Max. Isometric Strength** | | | X | X | X | X | X |
| **Study Medication** | | | | 1 tab every 15 min post-exercise (8x) 6h and 10h post-exercise 2 tabs each | | | 1x2 tabs early a.m. |
| **Adverse Event Evaluation** | | | | | | X | X |
| **Case Drug Account** | | | | | | X | X |
| | | | *shortly before* | *instantly after* | *1 hour after* | *3 hours after* | *24 hours after* |
| | | | ***Exercise Test*** | | | | |

***TP = Time Point for data collection***

| Effects of Traumeel®S on Exercise Induced Inflammatory Immune Response<br>EudraCT No.: 2009-010897-39 | **TEIR-1 Screening** | **Study Subject Number:**<br>1-\|___\|___\|___\| | **CRF Page 1** |
|---|---|---|---|

*Use only this form to check subjects for study eligibility! Once enrolled, this form will become part of the CRF!*

**DATE SCREENED:** \|___\|___\|___\|___\|___\|___\| **SCREENING NO.:** \|___\|___\|___\|

**DEMOGRAPHIC INFORMATION:**

**Year born: 19** \|___\|___\| **Weight:** \|__\|__\|,\|__\| kg **Height:** \|__\|__\|__\| cm **BMI**: \|__\|__\|,\|__\| kg/m²

**Ethnicity:** ☐ Caucasian ☐ Asian ☐ African ☐ Mixed ☐ Other:

**SPORTS TYPE SPECIFIC PERFORMANCE TEST:** ☐ Bicycle ☐ Treadmill

**Date:** \|__\|__\|__\|__\|__\|__\| **$VO_2$max:** \|__\|__\|,\|__\| ml/kg·min **BPM:** \|__\|__\|__\| at 80% $VO_2$max

**PREVIOUS/CONCOMITANT DISORDERS AND THERAPIES** *(past 3 months)* ☐ None

| *Disorder* | *Date onset* | *Treatment* | *Persistency* |
|---|---|---|---|
| | | | ☐ resolved<br>☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved<br>☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved<br>☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved<br>☐ ongoing |

**INCLUSION CRITERIA:**

- ☐ 1) Sex: male
- ☐ 2) Age ≥ 18 and ≤ 40 years
- ☐ 3) BMI ≥ 18.5 and < 27.5 kg/m²
- ☐ 4) Relative $VO_2$max < 53 ml/kg·min
- ☐ 5) General state of good health
- ☐ 6) Non-smoker
- ☐ 7) Medically approved unrestricted sports participation as shown by diagnostic performance test conducted on bicycle no longer than 3 months prior to study entry
- ☐ 8) Willingness to provide signed informed consent

☐ **ALL INCLUSION CRITERIA MET**

• ***Please note:***
*Subject must meet all inclusion criteria and no exclusion criterion to qualify for study entry!*

**EXCLUSION CRITERIA:** ☒ check all that apply

- ☐ 1) Weekly training volume ≥ 6 hours
- ☐ 2) Use of dietary supplements *(incl. high-dosed vitamins and minerals)*
- ☐ 3) Chronic immune deficiency
- ☐ 4) Current infection
- ☐ 5) Heart and/or circulation disorders
- ☐ 6) Abnormal findings on exercise ECG
- ☐ 7) Musculoskeletal disorders
- ☐ 8) Any current clinical condition that requires systemic therapy or might have an impact on study objectives
- ☐ 9) Hypersensitivity to botanicals of the Compositae family *(e.g. Echinacea)*
- ☐ 10) Lactose intolerance
- ☐ 11) Illicit drug or alcohol abuse
- ☐ 12) Participation in another clinical trial within 4 weeks prior to study entry

☐ **NO EXCLUSION CRITERION GIVEN**

**STUDY ENROLLMENT?**

☐ **YES** ➔ please enter assigned study subject number on top of this page

☐ **NO,** *please specify reason:*
- ☐ not eligible according to I/E criteria
- ☐ eligible but unwilling to participate
- ☐ other, specify:

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ ____/____/____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

# DAY 1

Date: \|__\|__\|__\|__\|__\|__\|

## PRE-STUDY CHECK

| Yes | No | |
|---|---|---|
| ☐ | ☐ | **Signed Informed Consent obtained from subject!** |
| ☐ | ☐ | **Subject arrived fasting at the study site!** |
| ☐ | ☐ | **Inclusion/exclusion criteria re-checked for validity prior to study start!** |

➔ ***All questions above must be answered 'Yes' before proceeding to subject randomization!***

## PRE-EXERCISE / TIME POINT 1

➔ ***Subject will take a standardized breakfast prior to randomization*** ☐ *(tick when breakfast taken)*
➔ ***Subject will be randomized by allocating the lowest free medication number available***
➔ ***Injecting the needle for taking blood at TP1 indicates the time of definitive study entry!***

**Procedures at TP1** ***(shortly before exercise test)***

1. **Blood samples** (7.5 ml heparin, 7.5 ml serum, 2.7 ml EDTA, 1.0 ml TrueCulture) ☐ *(tick when done)*

2. **SF McGill Pain Questionnaire scores** **VAS:** \|__\|__\|__\| \|__\|__\|__\| **:Total**
   *(attach completed questionnaire to the CRF)*

3. **Maximum isometric strength** (m3 Diagnos) \|__\|__\|__\|,\|__\| \|__\|__\|__\|,\|__\| **Nm**
   *(attach printouts to the CRF)* *Flexors* *Extensors*

## BICYCLE EXERCISE TEST

➔ ***The bicycle exercise test will be performed at a heart rate correlating with 80% $VO_2$max. The heart rate will be regulated by manual load adjustment within a speed range of 75-85 rpm. The exercise period is set to exactly 60 minutes unless subject is forced to quit earlier due to exhaustion***

1. **Subject accomplished the exercise test over the entire 60 minutes:** ☐ **Yes** ☐ **No***

   ***If 'No', subject discontinued exercise test after:** \|__\|__\| min

   *due to*: ☐ exhaustion
   ☐ adverse event (AE form)
   ☐ other reason, specify: _____

2. **Average heart rate:** \|__\|__\|__\| BPM **3. Average speed:** \|__\|__\| RPM / **During Exercise**

4. **End of test:** \|__\|__\|:\|__\|__\| h

***REMARKS DAY 1:***

***DAY 1 CONTINUED***

## POST-EXERCISE / TIME POINT 2

**Procedures at TP2** ***(instantly after exercise test)***

1. **Blood samples** (7.5 ml heparin, 7.5 ml serum, 2.7 ml EDTA, 1.0 ml TrueCulture) ☐ *(tick when done)*
2. **SF McGill Pain Questionnaire scores** **VAS:** \|___\|___\|___\| \|___\|___\|___\| **:Total**
   *(attach completed questionnaire to the CRF)*
3. **Maximum isometric strength** (m3 Diagnos) \|___\|___\|___\|,\|__\| \|___\|___\|___\|,\|__\| **Nm**
   *(attach printouts to the CRF)* *Flexors* *Extensors*

➔ ***Immediately after the procedures at TP2, subject will start taking the STUDY MEDICATION. Every 15 minutes one tablet will be dissolved on the tongue until a total of 8 tablets has been ingested.***

## 1H POST-EXERCISE / TIME POINT 3

**Procedures at TP3** ***(1 hour after exercise test)*** \|__\|__\|:\|__\|__\| time

1. **Blood samples** (7.5 ml heparin, 7.5 ml serum, 2.7 ml EDTA, 1.0 ml TrueCulture) ☐ *(tick when done)*
2. **SF McGill Pain Questionnaire scores** **VAS:** \|___\|___\|___\| \|___\|___\|___\| **:Total**
   *(attach completed questionnaire to the CRF)*
3. **Maximum isometric strength** (m3 Diagnos) \|___\|___\|___\|,\|__\| \|___\|___\|___\|,\|__\| **Nm**
   *(attach printouts to the CRF)* *Flexors* *Extensors*

## STUDY MEDICATION (LOADING DOSE)

1. **Did subject take 8 tablets in the first two hours after TP2?** ☐ **Yes** ☐ **No***

   *If 'No', amount of tablets taken: \|__\|__\|

## 3H POST-EXERCISE / TIME POINT 4

**Procedures at TP4** ***(3 hours after exercise test)*** \|__\|__\|:\|__\|__\| time

1. **Blood samples** (7.5 ml heparin, 7.5 ml serum 2.7 ml EDTA, 1.0 ml TrueCulture) ☐ *(tick when done)*
2. **SF McGill Pain Questionnaire scores** **VAS:** \|___\|___\|___\| \|___\|___\|___\| **:Total**
   *(attach completed questionnaire to the CRF)*
3. **Maximum isometric strength** (m3 Diagnos) \|___\|___\|___\|,\|__\| \|___\|___\|___\|,\|__\| **Nm**
   *(attach printouts to the CRF)* *Flexors* *Extensors*

## ADVERSE EVENTS

**Did subject experience an Adverse Event today?** ☐ **No** ☐ **Yes** *(fill in AE Form)*

➔ ***Subject will be given the study medication for taking home. Approx. 6 h and 10 h post-exercise (Day 1) as well as in the early morning of Day 2, subject will take 2 tablets each.***

***END OF DAY 1***

# DAY 2

☐ *Not done* Date: \|__\|__\|__\|__\|__\|__\|

## 24H POST-EXERCISE / TIME POINT 5

**Procedures at TP5** ***(24 hours after exercise test)*** \|__\|__\|:\|__\|__\| time

1. **Blood sample** (7.5 ml heparin, 7.5 ml serum, 2.7 ml EDTA, 1.0 ml TrueCulture) ☐ *(tick when done)*
2. **SF McGill Pain Questionnaire scores** **VAS:** \|__\|__\|__\| \|__\|__\|__\| **:Total**
   *(attach completed questionnaire to the CRF)*
3. **Maximum isometric strength** (m3 Diagnos) \|__\|__\|__\|,\|__\| \|__\|__\|__\|,\|__\| **Nm**
   *(attach printouts to the CRF)* *Flexors* *Extensors*

## ADVERSE EVENTS (AE)

**Did subject experience an AE since last visit?** ☐ **No** ☐ **Yes** *(fill in AE Form)*

➔ ***Please ask subject to report any adverse condition occurring within 8 days after Day 2 that could be associated with the participation in this clinical trial.***

## CONCOMITANT DISORDERS / MEDICATIONS

1. **Did concomitant disorders/medications change since study entry?** *(compare to page 1)*
   ☐ **No** ☐ **Yes** *(if yes, please record in section 3 next page)*
2. **Did subject use any self medication for post-exercise conditions?**
   ☐ **No** ☐ **Yes** *(if yes, please specify in section 3 next page)*

***REMARKS DAY 2:***

**THE INVESTIGATOR CONFIRMS BY SIGNATURE AND DATE THAT THE INFORMATION ENTERED IN THE CRF FOR DAY 1 AND DAY 2 (PAGE 2-4) IS COMPLETE AND ACCURATE:**

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ _____/_____/_____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

# STUDY CONCLUSION / CASE DRUG ACCOUNT

**1. Did subject complete the study as planned?**

☐ **Yes** (subject passed the study until TP5)

☐ **No,** due to: ☐ Adverse event ☐ Lost to follow-up ☐ Premature withdrawal ☐ Other reason, specify:

Date last study med taken: \|__\|__\|__\|__\|__\|__\|

Last TP performed: TP \|___\|

**2. Did subject return unused study medication?** ☐ **Yes** ☐ **No***

Total amount initially provided to subject: **50 Tabs** **Amount returned:** \|___\|___\| **Tabs** (A)**

Total study dose according to protocol is **14 Tabs** **Amount taken:** \|___\|___\| **Tabs** (B)**

**If 'No', please contact subject and ask to return the medication either in person or by mail!*
***If (A) + (B) do not sum up to 50 tabs, please explain in the remarks section!*

**3. CHANGE IN CONCOMITANT DISORDERS AND THERAPIES SINCE STUDY ENTRY** ☐ None

| *Disorder* | *Date onset* | *Treatment* | *Persistency* |
|---|---|---|---|
| | | | ☐ resolved ☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved ☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved ☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved ☐ ongoing |
| | | | ☐ resolved ☐ ongoing |

***REMARKS:***

➔ *Please make sure that all Adverse Events recorded for this subject have been assessed for seriousness and causal relationship and followed-up to the final outcome!*

**THE INVESTIGATOR CONFIRMS BY SIGNATURE AND DATE THAT THE INFORMATION ENTERED IN THE CRF FOR STUDY CONCLUSION / CASE DRUG ACCOUNT (PAGE 5) IS COMPLETE AND ACCURATE:**

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

| _____ | _____/_____/_____ | _____ |
|---|---|---|
| **INVESTIGATOR (Print Letters)** | **Date reviewed** | **INVESTIGATOR'S SIGNATURE** |

# ADVERSE EVENTS 1 – 2

➔ [1,2,3,4] *For definitions see page 8*

| ***ADVERSE EVENT 1 (AE):*** | ***Is AE a Serious[1] Event?*** | ***Severity[2] of AE:*** |
|---|---|---|
| | ☐ No ☐ Yes | ☐ mild ☐ moderate ☐ severe |
| | ***Is AE an Expected[4] Event?*** ☐ Yes ☐ No | |
| ***AE Start Date:*** ____/____/____ ***Time:*** _____:_____ | ***Relationship[3] to Study Med:*** ☐ definitely unrelated ☐ unlikely ☐ possible ☐ probable ☐ definitely related | ***Action Taken:*** ☐ none required ☐ reduction/stop of study med ☐ change in concomitant med ☐ hospitalization ☐ subject withdrawn ☐ other: *specify under remarks* |
| ***AE End Date:*** ____/____/____ ***Time:*** _____:_____ | | |
| ☐ Continuing ☐ Unknown, patient lost to FU | ***Outcome of AE:*** ☐ resolved ☐ continuing ☐ death ☐ resolved with sequelae ☐ unknown | |
| ***Treatment with Study Med:*** *From:* ____/____/____ *To:* ____/____/____ | **Remarks:** | |

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ _____/_____/_____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

| ***ADVERSE EVENT 2 (AE):*** | ***Is AE a Serious[1] Event?*** | ***Severity[2] of AE:*** |
|---|---|---|
| | ☐ No ☐ Yes | ☐ mild ☐ moderate ☐ severe |
| | ***Is AE an Expected[4] Event?*** ☐ Yes ☐ No | |
| ***AE Start Date:*** ____/____/____ ***Time:*** _____:_____ | ***Relationship[3] to Study Med:*** ☐ definitely unrelated ☐ unlikely ☐ possible ☐ probable ☐ definitely related | ***Action Taken:*** ☐ none required ☐ reduction/stop of study med ☐ change in concomitant med ☐ hospitalization ☐ subject withdrawn ☐ other: *specify under remarks* |
| ***AE End Date:*** ____/____/____ ***Time:*** _____:_____ | | |
| ☐ Continuing ☐ Unknown, patient lost to FU | ***Outcome of AE:*** ☐ resolved ☐ continuing ☐ death ☐ resolved with sequelae ☐ unknown | |
| ***Treatment with Study Med:*** *From:* ____/____/____ *To:* ____/____/____ | **Remarks:** | |

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ _____/_____/_____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

# ADVERSE EVENTS 3 – 4

➔ [1,2,3,4] *For definitions see page 8*

| **ADVERSE EVENT 3 (AE):** | **Is AE a Serious[1] Event?** | **Severity[2] of AE:** |
|---|---|---|
| | ☐ No ☐ Yes | ☐ mild ☐ moderate ☐ severe |
| | **Is AE an Expected[4] Event?** ☐ Yes ☐ No | |
| **AE Start Date:** ____/____/____ **Time:** _____:_____ | **Relationship[3] to Study Med:** ☐ definitely unrelated ☐ unlikely ☐ possible ☐ probable ☐ definitely related | **Action Taken:** ☐ none required ☐ reduction/stop of study med ☐ change in concomitant med ☐ hospitalization ☐ subject withdrawn ☐ other: *specify under remarks* |
| **AE End Date:** ____/____/____ **Time:** _____:_____ | | |
| ☐ Continuing ☐ Unknown, patient lost to FU | **Outcome of AE:** ☐ resolved ☐ continuing ☐ death ☐ resolved with sequelae ☐ unknown | |
| **Treatment with Study Med:** *From:* ____/____/____ *To:* ____/____/____ | **Remarks:** | |

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ _____/_____/_____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

| **ADVERSE EVENT 4 (AE):** | **Is AE a Serious[1] Event?** | **Severity[2] of AE:** |
|---|---|---|
| | ☐ No ☐ Yes | ☐ mild ☐ moderate ☐ severe |
| | **Is AE an Expected[4] Event?** ☐ Yes ☐ No | |
| **AE Start Date:** ____/____/____ **Time:** _____:_____ | **Relationship[3] to Study Med:** ☐ definitely unrelated ☐ unlikely ☐ possible ☐ probable ☐ definitely related | **Action Taken:** ☐ none required ☐ reduction/stop of study med ☐ change in concomitant med ☐ hospitalization ☐ subject withdrawn ☐ other: *specify under remarks* |
| **AE End Date:** ____/____/____ **Time:** _____:_____ | | |
| ☐ Continuing ☐ Unknown, patient lost to FU | **Outcome of AE:** ☐ resolved ☐ continuing ☐ death ☐ resolved with sequelae ☐ unknown | |
| **Treatment with Study Med:** *From:* ____/____/____ *To:* ____/____/____ | **Remarks:** | |

☐ Prof. Mooren ☐ Herr Wagner

_____ _____/_____/_____ _____

**INVESTIGATOR (Print Letters)** **Date reviewed** **INVESTIGATOR'S SIGNATURE**

# DEFINITIONS OF ADVERSE EVENTS / REACTIONS

**ADVERSE EVENT (AE)**
Any untoward medical occurrence in a patient or clinical investigation subject administered a pharmaceutical product and which does not necessarily have a causal relationship with this treatment. An adverse event (AE) can therefore be any unfavourable and unintended sign (including an abnormal laboratory finding), symptom, or disease temporally associated with the use of a medicinal (investigational) product, whether or not related to the medicinal (investigational) product (ICH GCP guideline CPMP/ICH/135/95).

**[1]SERIOUS ADVERSE EVENT (SAE)**
Any untoward medical occurrence that at any dose **results in death, is life-threatening, requires hospitalization or prolongation of hospitalization, results in persistent or significant disability/incapacity and/or a congenital anomaly/birth defect** (ICH GCP guideline CPMP/ICH/135/95). Adverse events which do not meet this definition are classified as non-serious.

**HOW TO ASSESS ADVERSE EVENTS:**

**[2]SEVERITY:**
**mild:** awareness of event but easily tolerated
**moderate:** discomfort enough to cause interference with usual activity
**severe:** inability to carry out usual activity

**[3]CAUSAL RELATIONSHIP:**

**Definitely unrelated:** Where a temporal (timely) relationship of the onset of the event, relative to the administration of the product is not reasonable, e.g. cut finger. Or where another cause can explain the occurrence of the event by itself, e.g. headache associated with migraine.
**Unlikely:** Where a temporal (timely) relationship of the onset of the event, relative to the administration of the product is unlikely but cannot be ruled out, e.g. mouth ulcer following admin of oral drug.
**Possibly Related:** Where a temporal (timely) relationship of the onset of the event, relative to the administration of the product is reasonable, but the event could have been due to an equally likely cause, e.g. headache.
**Probably Related:** Where a temporal (timely) relationship of the onset of the event, relative to the administration of the product is reasonable and the event is more likely to be explained by the medicinal product than by another cause, e.g. nausea and vomiting.
**Definitely Related:** Where a temporal (timely) relationship of the onset of the event, relative to the administration of the product is reasonable and there is no other cause to explain the event, e.g. bone marrow depression following administration of cytotoxic chemotherapy.

Out of these five categories, **'possibly', 'probably'** and **'definitely related'** qualify as **adverse drug reactions. 'Unlikely' and 'definitely unrelated'** do not qualify as a reasonable causal relationship.

**ADVERSE DRUG REACTION (ADR)**
This is defined as any noxious and unintended (harmful or unwanted) response to a medicinal product normally used in humans for prophylaxis, diagnosis or therapy of diseases, or for modification of physiological function, and is suspected to be related to the drug.

**SERIOUS ADVERSE DRUG REACTION (SADR)**
This can be defined as an adverse drug reaction that is serious (see definition of SAE above)

**[4]EXPECTEDNESS**
YES: AE is according to the applicable product information an expectable event
NO: Nature, severity, or outcome of AE is not listed in the applicable product information

**SUSPECTED UNEXPECTED SERIOUS ADVERSE DRUG REACTION (SUSAR)**
This can be defined as a **serious** adverse drug **reaction**, the nature or severity of which is not consistent with the applicable product information. **SUSAR events require breaking of the blind**. Placebo treatment is usually not subject to expedited reporting.

**SUSARs and SADRs are subject to expedited reporting to the Ethics Committee and BfArM!**

**END OF CASE REPORT FORM**

# SHORT FORM McGILL PAIN QUESTIONNAIRE (SF-MPQ) – DEUTSCHE VERSION

Basierend auf Radvila et al. und der nicht validierten Übersetzung von Amir Tal-Akabi und Peter Oesch

**Study subject number:** |____|____| **Date:** |__|__|__|__|__|__|

| ☐ TEIR-1 | ☐ TEIR-2 | ☐ TEIR-3 |
|---|---|---|
| ☐ TP1 ☐ TP2 ☐ TP3<br>☐ TP4 ☐ TP5 | ☐ TP1 ☐ TP2 ☐ TP3<br>☐ TP4 ☐ TP5 ☐ TP6 | ☐ TP1 ☐ TP2 ☐ TP3<br>☐ TP4 ☐ TP5 ☐ TP6 |

**I. Normativ geschätzter Schmerzindex:**
Die untenstehenden Worte beschreiben den durchschnittlichen Schmerztyp. Setzen Sie ein Häkchen (✓) für alle nachstehenden Schmerztypen in diejenige Spalte, die Ihrer gefühlten Schmerzstärke/Intensität entspricht.

| | | keine | | gering/ leicht | | mäßig | | stark | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ia | klopfend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | einschießend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | stechend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | klemmend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | nagend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | heiß/brennend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | schmerzend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | schwer | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | empfindlich | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | durchtrennend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| Ib | ermüdend/ erschöpfend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | Übelkeit erregend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | beängstigend | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | bestrafend/ grausam | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |

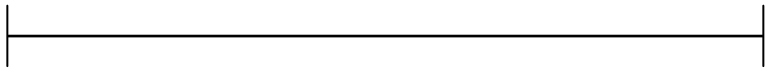
**III. Beurteilung der Intensität der gesamten Schmerzerfahrung:**
Setzen Sie eine Häkchen (✓) in die passende Zeile

| Beurteilung | | |
|---|---|---|
| 0 | schmerzfrei | |
| 1 | gering/leicht | |
| 2 | unangenehm | |
| 3 | belastend | |
| 4 | fürchterlich | |
| 5 | qualvoll | |

**IV. Punktzahl**
(bitte nicht ausfüllen - für die Auswertung)

| | | Punkte |
|---|---|---|
| Ia | sensorischer Schmerzindex | |
| Ib | affektiver Schmerzindex | |
| Ia+Ib | total Schmerzindex | |
| II | aktuelle Schmerzintensität | |
| III | Gesamtbeurteilung | |
| | Total | |

**II. Momentane Schmerzintensität – Visuelle Analogskala (VAS)**
Markieren Sie auf der untenstehenden Skala Ihre Schmerzintensität.



0 schmerzfrei

100 denkbar schlimmster Schmerz

# PROBANDEN-INFORMATION

**Prüfzentrum:** Institut für Sportwissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Abteilung für Sportmedizin, Kugelberg 62, 35394 Gießen
**Prüfärzte:** Prof. Dr. med. Frank C. Mooren, Tel.: 0641 99 25210
Herr Achim Wagner, Tel.: 0641 99 25222
Herr Torsten Frech, Tel. 0641 99 25222

**EudraCT-Nr.** 2009-010897-39

## Wirkungen von Traumeel®S Tabletten auf die belastungsinduzierte entzündliche Immunantwort

Studien-Code: TEIR-1

Sehr geehrter Herr,

nachdem Sie die routinemäßige sportmedizinische Leistungsdiagnostik zur Feststellung Ihrer vollen Sporttauglichkeit ohne einschränkenden Befund absolviert haben, möchten wir Sie fragen, ob Sie bereit sind, an der von uns vorgesehenen klinischen Prüfung (Studie) teilzunehmen.

Klinische Prüfungen sind notwendig, um Erkenntnisse über die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Arzneimitteln zu gewinnen oder zu erweitern. Deshalb schreibt der Gesetzgeber im Arzneimittelgesetz vor, dass Arzneimittel klinisch geprüft werden müssen. Die klinische Prüfung, die wir Ihnen hier vorstellen, wurde – wie es das Gesetz verlangt – von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet und von der zuständigen Behörde genehmigt. Diese klinische Prüfung wird ausschließlich im oben genannten Prüfzentrum in Gießen durchgeführt; es sollen insgesamt 80 Männer daran teilnehmen. Die Studie wird veranlasst, organisiert und geleitet von Prof. Dr. med. Frank C. Mooren. Finanziell unterstützt wird das Projekt von der Firma Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden.

Ihre Teilnahme an dieser klinischen Prüfung ist freiwillig. Sie werden in diese Prüfung also nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Der Prüfarzt hat Ihnen bereits eine Reihe von Informationen zu der geplanten Studie gegeben. Der nachfolgende Text soll Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Anschließend wird ein Prüfarzt das Aufklärungsgespräch mit Ihnen führen. Bitte zögern Sie nicht, alle Punkte anzusprechen, die Ihnen unklar sind. Sie werden danach ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über Ihre Teilnahme zu entscheiden.

### 1. Warum wird diese Prüfung durchgeführt?

Traumeel®S Tabletten sind ein nicht-rezeptpflichtiges, homöopathisches Arzneimittel aus verschiedenen pflanzlichen und mineralischen Bestandteilen, welches seit nahezu 50 Jahren in Deutschland und vielen anderen Ländern erhältlich ist. Bewährte Anwendungsbereiche sind u. a. Verstauchungen, Prellungen, Schwellungen, Blutergüsse, sowie entzündliche und degenerative Prozesse des Bewegungsapparates. Traumeel®S wird häufig auch im Sportbereich zur Behandlung oder Vorbeugung von Beschwerden infolge anhaltender körperlicher Belastungen eingesetzt. Wissenschaftlich fundierte Daten zur Wirksamkeit hinsichtlich der entzündlichen Immunantwort nach körperlicher Belastung liegen derzeit allerdings nicht vor.

In der geplanten klinischen Prüfung werden Traumeel®S Tabletten nach einem Belastungstest auf dem Spinning Bike für eine Dauer von maximal 24 Stunden verabreicht. Ziel der geplanten Studie ist es, zu untersuchen, inwieweit Traumeel®S in der Lage ist:

- entzündliche Reaktionen des Immunsystems, wie sie gewöhnlich nach anhaltender körperlicher Belastung auftreten, zu begrenzen *(Bestimmung anhand spezieller Laboruntersuchungen)*
- die Intensität von Schmerzen nach anhaltender körperlicher Belastung, wie z. B. Muskelkater, zu reduzieren *(Bestimmung anhand eines Fragebogens mit Schmerzskala)*
- die Erholungsphase nach anhaltender körperlicher Belastung zu verkürzen *(Bestimmung mittels isometrischer Kraftmessungen)*

Im Rahmen der geplanten klinischen Prüfung wird auch untersucht, wie gut Traumeel®S Tabletten von Ihnen vertragen werden.

## 2. Erhalte ich das Prüfpräparat auf jeden Fall?

Im Rahmen dieser klinischen Prüfung werden Traumeel®S Tabletten mit einem Placebo verglichen. Bei einem Placebo handelt es sich um eine identisch aussehende Tablette, die jedoch keinen Wirkstoff enthält. Im Falle Ihrer Teilnahme werden Sie entweder Traumeel®S Tabletten oder das Placebo erhalten. Der Vergleich mit dem Placebo dient dazu, die Wirksamkeit hinsichtlich der unter 1.) genannten Studienziele sowie etwaige unerwünschte Wirkungen von Traumeel®S Tabletten besser beurteilen zu können. Ob Sie das Prüfpräparat oder das Placebo erhalten, entscheidet ein zuvor festgelegtes Zufallsverfahren, vergleichbar mit dem Werfen einer Münze; dieses wird Randomisierung genannt. Die Wahrscheinlichkeit, in der geplanten Studie Traumeel®S Tabletten zu erhalten, beträgt 50 %.

Zur objektiven Gewinnung von Studiendaten ist es notwendig, dass weder Sie noch Ihr Prüfarzt wissen, welches Präparat Sie einnehmen (dieses Verfahren wird als „doppelblind" bezeichnet). Sollte es jedoch aus Sicherheitsgründen notwendig sein, kann unverzüglich festgestellt werden, welches Präparat Sie erhalten haben.

## 3. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei Teilnahme beachten?

Vor Aufnahme in diese klinische Prüfung werden Sie zu Ihren Vorerkrankungen und Ihrem aktuellen Gesundheitsstatus befragt. Im Rahmen der sportmedizinischen Leistungsdiagnostik zur Feststellung Ihrer Sporttauglichkeit wurden Sie kürzlich bereits einer umfassenden ärztlichen Untersuchung unterzogen. Dazu gehören insbesondere ein Belastungs-EKG sowie die Messung von Blutdruck, Herzfrequenz und maximaler Sauerstoffaufnahme. Die Möglichkeit Ihrer Teilnahme an dieser klinischen Prüfung ist nur dann gegeben, wenn Ihnen sportmedizinisch volle Sporttauglichkeit attestiert worden ist.

Die Studiendauer erstreckt sich über zwei Tage. Am ersten Tag erscheinen Sie morgens nüchtern am Prüfzentrum, wo Sie ein standardisiertes Frühstück erhalten. Vor dem Belastungstest werden alle Messdaten erfasst; d.h. es wird eine Blutprobe entnommen, ein schmerzspezifischer Fragebogen ausgefüllt und Ihre maximale Kraft gemessen.

Beim Belastungstest auf dem Spinning Bike wird der Tretwiderstand anhand Ihrer Herzfrequenz jeweils so angepasst, dass der zu leistende Kraftaufwand Ihre Sauerstoffaufnahme kontinuierlich im Bereich von 80% des Maximalwertes hält. Zu diesem Zweck tragen Sie während des Tests einen Brustgurt, der Ihre Herzfrequenz misst. Der Belastungstest dauert genau 60 Minuten und endet nur dann früher, wenn Sie körperlich erschöpft sind.

Unmittelbar nach Ende des Belastungstests, sowie eine und drei Stunden später, werden erneut alle Messdaten erfasst (Blutentnahme, Fragebogen, Kraftmessung). Am nächsten Tag erscheinen Sie vormittags am Prüfzentrum zur abschließenden Kontrolluntersuchung, bei der nochmals alle Messdaten erhoben werden. Danach ist die Studie für Sie beendet.

Die Einnahme des Prüfpräparates beginnt nach dem Belastungstest. In den ersten zwei Stunden nach Testende nehmen Sie alle 15 Minuten jeweils 1 Tablette ein (langsam im Mund zergehen lassen). Ungefähr 6 und 10 Stunden nach Testende (also noch am selben Tag) sowie am Morgen des Folgetages nehmen Sie jeweils 2 Tabletten ein. Die gesamte Studiendosis beläuft sich auf 14 Tabletten.

Während dieser Studie sind insgesamt 5 Blutproben erforderlich. Pro Blutprobe werden mit einem Einstich in die Vene ca. 19 ml Blut entnommen, insgesamt also ca. 95 ml.

| **Studienablauf 1. Tag** | **Studienablauf 2. Tag** |
|---|---|
| *<u>Am Prüfzentrum:</u>*<br>08:00 Erfassung aller Messdaten:<br>*<u>stets mit</u>: Blutentnahme, Fragebogen, Kraftmessung*<br>Frühstück<br>09:00 Start Belastungstest<br>10:00 Ende Belastungstest<br>10:00 Erfassung aller Messdaten<br>Beginn Prüfpräparat Einnahme:<br>*alle 15 Min. je 1 Tabl. bis insges. 8 Tabletten eingenommen sind*<br>11:00 Erfassung aller Messdaten<br>13:00 Erfassung aller Messdaten<br>13:30 Ende Besuch Prüfzentrum<br><br>*<u>Zu Hause:</u>*<br>16:00 Prüfpräparat 2 Tabl. einnehmen<br>20:00 Prüfpräparat 2 Tabl. Einnehmen | *<u>Zu Hause</u>:*<br>08:00 Prüfpräparat 2 Tabl. einnehmen<br><br>*<u>Am Prüfzentrum:</u>*<br>10:00 Abschlussuntersuchung mit:<br>Rückgabe der restl. Prüfpraparate<br>Erfassung aller Messdaten:<br>*Blutentnahme, Fragebogen Kraftmessung*<br>10:45 Ende der Studie<br><br>➔ *Anstrengende körperliche Tätigkeiten sind während der gesamten Studiendauer zu meiden. Kommen Sie daher nicht mit dem Fahrrad zum Prüfzentrum und treiben Sie keinen Sport.*<br><br>➔ *Die angegebenen Zeiten am Prüfzentrum können im Einzelfall abweichen.* |

Andere Medikamente dürfen Sie – außer bei Notfällen – nur nach Rücksprache mit Ihrem Prüfarzt einnehmen oder anwenden. Wenn Sie von anderen Ärzten behandelt werden, müssen Sie diese über Ihre Teilnahme an der klinischen Prüfung informieren. Auch Ihr Prüfarzt muss über jede medizinische Behandlung, die Sie durch einen anderen Arzt während der klinischen Prüfung erhalten, informiert werden.

Um Ihre eigene Sicherheit und die wissenschaftliche Aussagekraft der Studie insgesamt nicht zu gefährden, sollten Sie die Untersuchungstermine und Vorgaben zur Einnahme der Prüfpräparate konsequent einhalten.

Die Prüfpräparate, die Sie im Verlauf dieser klinischen Prüfung bekommen, sollten Sie sicher und für Kinder unzugänglich aufbewahren. Die Weitergabe an Dritte ist nicht gestattet. Die Packung mit dem Prüfpräparat enthält mehr Tabletten als Sie einnehmen werden. Alle überzähligen Tabletten geben Sie bitte vollständig und in der Originalpackung an Ihren Prüfarzt am Ende der Studie wieder zurück.

## 4. Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?

Sie werden durch die Teilnahme an dieser Studie voraussichtlich keinen persönlichen Gesundheitsnutzen haben. Die Ergebnisse der Studie können aber dazu beitragen, die Vorbeugung oder Behandlung von Beschwerden nach ausdauernder körperlicher Anstrengung zukünftig zu verbessern oder besser beurteilen zu können.

## 5. Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Bei Einnahme von Traumeel®S Tabletten kann es zu unerwünschten Wirkungen oder Beschwerden kommen. Bislang beobachtet wurden verstärkter Speichelfluss, gelegentlich allergische Reaktionen (0,1-1%), in Einzelfällen Überempfindlichkeitsreaktionen.

Bei Arzneimitteln, die Zubereitungen aus Echinacea (Sonnenhut) enthalten, wurden Hautausschlag und Juckreiz, selten Gesichtsschwellung, Atemnot, Schwindel und Blutdruckabfall beobachtet (jeweils 0,01 - 0,1 %). In Traumeel®S Tabletten ist Echinacea in homöopathischer Zubereitung (1:100 Verdünnung) enthalten. Außerdem enthält die homöopathische Rezeptur von Traumeel®S Tabletten andere Korbblütler (in Verdünnungen von 1:100 oder 1:1000) wie Schafgarbe, Kamille, Ringelblume, Gänseblümchen und Arnika, für die Überempfindlichkeitsreaktionen beschrieben sind.

Die im Rahmen dieser klinischen Prüfung studienbedingt durchgeführten Maßnahmen können mit Risiken behaftet sein. Im Einzelnen handelt es sich um Risiken:

- Bei den Blutentnahmen: Hierbei sind die Risiken vergleichbar zu den Blutentnahmen, die Sie vielleicht schon von Ihrem Hausarzt oder Krankenhaus kennen. Außer einem kurzen Schmerz beim Einstich der Nadel kann es gelegentlich zu einer leichten Einblutung mit nachfolgendem Bluterguss (‚blauer Fleck') kommen, der innerhalb weniger Tage verschwindet. Bei ängstlichen Personen mit Neigung zu Kreislaufreaktionen erfolgt die Blutentnahme bevorzugt im Liegen. Andere Risiken der Blutentnahme wie Infektion, Entzündung der Blutgefäße oder Verletzung von benachbartem Gewebe und Nerven infolge des Nadeleinstichs sind sehr selten und bei geschultem Personal so gut wie ausgeschlossen.

- Beim Belastungstest auf dem Spinning Bike: Es ist nicht auszuschließen, dass der im Rahmen dieser Studie durchgeführte Belastungstest Ihr Herz-Kreislauf-System überfordert. Dabei kann es zu Übelkeit oder Schwindel kommen. In diesem Fall wird der Test umgehend abgebrochen. Durch Flüssigkeitszufuhr und Ausruhen im Liegen stabilisiert sich der Kreislauf gewöhnlich recht schnell wieder.

  Während der gesamten Dauer des Belastungstests sind Ihr Prüfarzt und ein wissenschaftlicher Mitarbeiter anwesend, die den Testablauf permanent überwachen und bei Bedarf sofort eingreifen und die notwendigen Maßnahmen treffen. Insgesamt ist die körperliche Höchstbelastung bei dem in dieser Studie durchzuführenden Belastungstest geringer als bei dem Belastungstest, den Sie bereits von der sportmedizinischen Leistungsdiagnostik her kennen, als Ihre Sporttauglichkeit festgestellt wurde.

Bitte teilen Sie den Mitarbeitern am Prüfzentrum *alle* Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die im Verlauf der klinischen Prüfung auftreten. Falls diese schwerwiegend sind, teilen Sie den Mitarbeitern am Prüfzentrum diese bitte umgehend mit, ggf. telefonisch.

## 6. Wer darf an dieser klinischen Prüfung nicht teilnehmen?

Sie können an dieser klinischen Prüfung nur dann teilnehmen, wenn Sie vollständig gesund und uneingeschränkt sporttauglich sind, nicht rauchen, keine anderen Medikamente einnehmen und sich nicht gleichzeitig für andere klinische Prüfungen oder andere klinische Forschungsprojekte zur Verfügung stellen oder innerhalb der letzten 4 Wochen an solchen teilgenommen haben.

## 7. Entstehen für mich Kosten durch die Teilnahme an der klinischen Prüfung? Erhalte ich eine Aufwandsentschädigung?

Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Prüfung entstehen für Sie keine Kosten.

Sie erhalten eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 40,00 €, wenn Sie an der Studie plangemäß bis zur abschließenden Kontrolluntersuchung teilnehmen.

## 8. Bin ich während der klinischen Prüfung versichert?

Bei der klinischen Prüfung eines Arzneimittels sind alle Studienteilnehmer gemäß dem deutschen Arzneimittelgesetz versichert. Der Umfang des Versicherungsschutzes ergibt sich aus den Versicherungsunterlagen, die Sie auf Wunsch ausgehändigt bekommen.

Wenn Sie vermuten, dass durch die Teilnahme an der klinischen Prüfung Ihre Gesundheit geschädigt oder bestehende Leiden verstärkt wurden, müssen Sie dies unverzüglich dem Versicherer:

| | |
|---|---|
| Name und Anschrift der Versicherung: | HDI Gerling Industrie Versicherung AG<br>Niederlassung Düsseldorf<br>Am Schönenkamp 45, 40599 Düsseldorf |
| Telefon: | 0211 7482 292 |
| Fax: | 0211 7482 462 |
| Versicherungsnummer: | 42 924322 03019 |
| Anmeldenummer: | 1105 2010 102 |

direkt anzeigen, gegebenenfalls mit Unterstützung durch Ihren Prüfarzt, um Ihren Versicherungsschutz nicht zu gefährden. Sofern Ihr Prüfarzt Sie dabei unterstützt, erhalten Sie eine Kopie der Meldung. Sofern Sie Ihre Anzeige direkt an den Versicherer richten, informieren Sie bitte zusätzlich Ihren Prüfarzt.

Bei der Aufklärung der Ursache oder des Umfangs eines Schadens müssen Sie mitwirken und alles unternehmen, um den Schaden abzuwenden und zu mindern.

Während der Dauer der klinischen Prüfung dürfen Sie sich einer anderen medizinischen Behandlung – außer in Notfällen – nur nach vorheriger Rücksprache mit dem Prüfarzt unterziehen. Von einer erfolgten Notfallbehandlung müssen Sie den Prüfarzt unverzüglich unterrichten.

Wir weisen Sie ferner darauf hin, dass Sie auf dem Weg von und zum Prüfzentrum nicht unfallversichert sind.

## 9. Werden mir neue Erkenntnisse während der klinischen Prüfung mitgeteilt?

Sie werden über neue Erkenntnisse, die in Bezug auf diese klinische Prüfung bekannt werden und die für Ihre Bereitschaft zur weiteren Teilnahme wesentlich sein können, informiert. Auf dieser Basis können Sie dann Ihre Entscheidung zur weiteren Teilnahme an dieser klinischen Prüfung überdenken.

## 10. Kann meine Teilnahme an der klinischen Prüfung vorzeitig beendet werden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

Unter gewissen Umständen ist es aber auch möglich, dass der Prüfarzt entscheidet, Ihre Teilnahme an der klinischen Prüfung vorzeitig zu beenden, ohne dass Sie auf die Entscheidung Einfluss haben. Die Gründe hierfür können z. B. sein:

- Ihre weitere Teilnahme an der klinischen Prüfung ist ärztlich nicht länger vertretbar;
- es wird die gesamte klinische Prüfung abgebrochen.

Sofern Sie sich dazu entschließen, vorzeitig aus der klinischen Prüfung auszuscheiden, oder Ihre Teilnahme aus einem anderen der genannten Gründe vorzeitig beendet wird, ist es für Ihre eigene Sicherheit wichtig, dass Sie sich der empfohlenen abschließenden Kontrolluntersuchung unterziehen.

## 11. Was geschieht mit meinen Daten?

Während der klinischen Prüfung werden medizinische Befunde und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und am Prüfzentrum in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die klinische Prüfung wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummerncode mit Angabe des Geburtsjahres.

Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Eine Entschlüsselung erfolgt nur unter den vom Gesetz vorgeschriebenen Voraussetzungen.

Das Arzneimittelgesetz enthält nähere Vorgaben für den erforderlichen Umfang der Einwilligung in die Datenerhebung und -verwendung. **Einzelheiten, insbesondere zur Möglichkeit eines Widerrufs, entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung, die im Anschluss an diese Probanden-Information abgedruckt ist.**

## 12. Was geschieht mit meinen Blutproben?

Ihre Blutproben werden ausschließlich für Laboruntersuchungen im Rahmen dieser klinischen Prüfung verwendet. Etwaiges Restmaterial wird spätestens bei Abschluss der klinischen Prüfung vernichtet.

## 13. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

**Beratungsgespräche am Prüfzentrum**

Sie haben stets die Gelegenheit zu weiteren Beratungsgesprächen mit einem der auf Seite 1 genannten Prüfärzte.

**Kontaktstelle**

Es existiert außerdem eine Kontaktstelle bei der zuständigen Bundesoberbehörde. Teilnehmer an klinischen Prüfungen, ihre gesetzlichen Vertreter oder Bevollmächtigten können sich an diese Kontaktstelle wenden:

**Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte**
Fachgebiet Klinische Prüfung / Inspektionen
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3
**53175 Bonn**

Telefon: 0228 / 207-4318 Fax: 0228 / 207-4355
e-mail: klinpruefung@bfarm.de

**Prüfzentrum:** Institut für Sportwissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen, Abteilung für Sportmedizin, Kugelberg 62, 35394 Gießen
**Prüfärzte:** Prof. Dr. med. Frank C. Mooren
Herr Achim Wagner
Herr Torsten Frech

## Wirkungen von Traumeel®S Tabletten auf die belastungsinduzierte entzündliche Immunantwort

Studien-Code: TEIR-1

# Einwilligungserklärung

.....
**Name des Probanden in Druckbuchstaben**

**geb. am** ..... **Probanden-Nr**. .....

Ich bin in einem persönlichen Gespräch durch den Prüfarzt

.....
**Name des Arztes in Druckbuchstaben**

ausführlich und verständlich über das Prüfmedikament sowie über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der klinischen Prüfung aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Probanden-Information sowie die hier nachfolgend abgedruckte Datenschutzerklärung gelesen und verstanden. Ich hatte die Gelegenheit, mit dem Prüfarzt über die Durchführung der klinischen Prüfung zu sprechen. Alle meine Fragen wurden zufrieden stellend beantwortet.

Möglichkeit zur Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens des Probanden oder sonstiger Aspekte des Aufklärungsgesprächs:

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Prüfung zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

## Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern am Prüfzentrum aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:
   a) an eine vom Studienleiter beauftragte Stelle zum Zweck der wissenschaftlichen Auswertung,
   b) im Falle eines Antrags auf Zulassung: an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde
   c) im Falle unerwünschter Ereignisse: an den Hersteller des Arzneimittels, an die zuständige Ethik-Kommission und die zuständige Bundesoberbehörde *(Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte)*, sowie von dieser an die Europäische Datenbank.

2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Sponsors sowie die zuständigen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3. Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um
   a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen,
   b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden,
   c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.

4. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln verlangen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche oder satzungsmäßige Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

5. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind.

   Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

6. Ich möchte, dass mein Hausarzt

   .....

   .....
   *Name, Adresse, Telefon*

   über meine Teilnahme an der klinischen Prüfung informiert wird *(falls als nicht erforderlich erachtet oder nicht gewünscht, bitte streichen).*

**Ich erkläre mich bereit,**
**an der oben genannten klinischen Prüfung**
**freiwillig teilzunehmen.**

Ein Exemplar der Probanden-Information und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Ein Exemplar verbleibt im Prüfzentrum.

**PROBAND:**

.....
**Name des Probanden in Druckbuchstaben**

..... .....
**Datum** **Unterschrift des Probanden**

**PRÜFARZT:**

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Probanden eingeholt.

.....
**Name des Prüfarztes in Druckbuchstaben**

..... .....
**Datum** **Unterschrift des aufklärenden Prüfarztes**