

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität
zu Köln, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Einfluß von Immobilisation und Vibrationstraining auf Knochen- und
Muskelparameter bei Mäusen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sven Mathias Reuter
aus Solingen

Promoviert am 27. Juni 2012

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Professor Dr. med. E. Schönau

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Privatdozent Dr. rer. nat. F. Zaucke

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. rer. medic. Dr. paed. R. Beccard

Dr. sportwiss. A. Niehoff

Professor Dr. med. E. Schönau

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 25.10.2011

Die in dieser Arbeit angegebenen Untersuchungen sind von mir, nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Dr. Beccard und Frau Dr. Niehoff, durchgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden pQCT-Messergebnisse und Muskeluntersuchungen wurden im Labor des Instituts für Biomechanik und Orthopädie der Deutschen Sporthochschule Köln ermittelt.

Einige Grafiken wurden mit Hilfe der medizinisch-technischen Assistentin Frau A. Stabrey erstellt.

Herrn Professor Dr. med. E. Schönau gilt mein Dank für die Überlassung des Themas sowie für die hilfsbereite und freundliche Betreuung während der Arbeit.

Ich danke besonders Herrn Dr. Dr. R. Beccard für die vielen nützlichen Ratschläge sowie für die konstruktive Kritik beim Erstellen der Arbeit. Weiterhin danke ich Frau Dr. A. Niehoff für die Unterstützung und Hilfe während der Versuchsdurchführung und Datengewinnung. Mein Dank gilt außerdem Frau A. Stabrey für die Hilfe bei der Erstellung von Tabellen und Abbildungen.

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Knochen	2
1.2 Anatomie und Physiologie der Muskeln	3
1.3 Grundlagen des Ganzkörpervibrationstrainings	5
1.4 Funktionelle Muskel-Knochen-Einheit	8
1.5 Botulinumtoxin	11
1.6 Muskel- und Skeletterkrankungen im Kindes- und Jugendalter	12
1.7 Problemstellung	13
2 Ziele der Arbeit	14
3 Studienprotokoll	14
4 Versuchstiere und Methodik	17
4.1 Versuchstiere	17
4.1.1 Haltung	17
4.1.2 Gruppen	19
4.2 Methodik	20
4.2.1 Betäubung der Tiere	20
4.2.2 Immobilisation und NaCl-Injektionen	22
4.2.3 Whole-Body-Vibration	23
4.2.4 Analyse der Mobilität und Gewichtsmessung	24
4.2.5 Entnahme der Knochen	27
4.2.6 Skelettparameter gemessen mit peripherer quantitativer Computertomographie ..	27
4.2.7 Muskelvorbereitung und Analyse der Muskelkapillarisation und des Muskelzellquerschnitts	31
4.2.8 Statistische Verfahren	32
5 Ergebnisse	33
5.1 Ergebnisse des Mobilitäts- und Gewichtsverlaufs	33
5.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels peripherer quantitativer Computertomographie	38
5.3 Ergebnisse der Muskeluntersuchungen	44
6 Diskussion	46
6.1 Gewichtsverlauf	46
6.2 Mobilitätsverlauf	49
6.3 Veränderung der Knochenparameter durch Immobilisation und Whole-Body-Vibration	50
6.3.1 Vergleich der Kontrollgruppe mit der Basiskontrollgruppe und der Immobilisationsgruppe	50

6.3.2	Vergleich der Kontrollgruppe mit der Immobilisations+Whole-Body-Vibration-Gruppe.....	52
6.3.3	Vergleich der Immobilisationsgruppe mit der Immobilisation+Whole-Body-Vibration-Gruppe	54
6.4	Muskelparameter.....	55
6.5	Muskel-Knochen Interaktion	57
7	Zusammenfassung	59
8	Literaturverzeichnis	60
9	Anhang.....	66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCSA	Bone-Cross-Sectional-Area = Knochenquerschnittsfläche
BCSA _{cor}	Cortical Bone-Cross-Sectional-Area = Kortikale Knochenquerschnittsfläche
BCSA _{trab}	Trabecular Bone-Cross-Sectional-Area = Trabekuläre Knochenquerschnittsfläche
BK	Basiskontrollgruppe
BMC	Bone Mineral Content = Knochenmineralgehalt
BMC _{cor}	Cortical Bone Mineral Content = Kortikaler Knochenmineralgehalt
BMC _{trab}	Trabecular Bone Mineral Content = Trabekulärer Knochenmineralgehalt
BMD	Bone Mineral Density = Knochenmineraldichte
BMD _{cor}	Cortical Bone Mineral Density = Kortikale Knochenmineraldichte
BMD _{trab}	Trabecular Bone Mineral Density = Trabekuläre Knochenmineraldichte
BTX	Clostridium botulinum Toxin Typ A (Dysport®)
Cortical Thickness	kortikale (Knochen-) Dicke
Endosteal Circumference	endostealer (Knochen-) Umfang
fMKE	funktionelle Muskel-Knochen-Einheit
HZ	Hertz
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IM	Immobilisationsgruppe
i.m.	intramuskulär
IM+WBV	Immobilisation-und-Whole-Body-Vibration-Gruppe

IM+WBV+IGF-1	Immobilisation-und-Whole-Body-Vibration-und IGF-1-Gruppe
Interventionsgruppen	IM und IM+WBV
i.p.	intraperitoneal
Kap./Zelle	Kapillaren pro (Muskel-)Zelle = Muskelkapillarisation
KG	Kontrollgruppe
MCSA	Muscle-Cross-Sectional-Area = Muskelquerschnittsfläche
Muskelzellquerschnitt	Durchmesser einer Muskelzelle
MW	Mittelwert
OI	Osteogenesis Imperfecta
Periosteal Circumference	periostealer (Knochen-) Umfang
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
s.c.	subcutan
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
SSI	Strength Strain Index = Knochenfestigkeitsindex
Tab.	Tabelle
WBV	Whole Body Vibration = Ganzkörpervibrationstraining

1 Einleitung

Im Jahre 1892 formulierte Julius Wolff das „Gesetz der Transformation der Knochen“. Es besagt, dass sich die äußere Form und die innere Struktur des Knochens ständig an die mechanische Beanspruchung anpassen (98). Der Aachener Orthopäde Friedrich Pauwels griff in den dreißiger Jahren diese Beobachtungen auf. Er konnte zeigen, dass das Skelettsystem einem Leichtbauweise-Prinzip folgt und sich seiner Beanspruchung mit geringst möglichem Materialaufwand angleicht. Als Triebkraft nannte er die der Druckkraft überlagerte Biegebeanspruchung des Knochens (41). Seinen Überlegungen folgte Harold Frosts „Mechanostat-Hypothese“ im Jahre 1964. Er beobachtete, dass Knochenverformungen die durch Muskelaktivität ausgelöst werden eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Knochenfestigkeit spielen. Die Festigkeit wird abhängig von den herbeigeführten Verformungen reguliert (20). In den neunziger Jahren führte eine Kölner Arbeitsgruppe um Eckhard Schönau die Forschungen weiter fort und beschrieb die „funktionelle Muskel-Knochen-Einheit“. Dabei handelt sich um eine Analyse der Regulationsmechanismen am Skelettsystem, die zur Adaptation der Knochenfestigkeit an die von außen einwirkenden Bedingungen führen. Im Mittelpunkt dieses Modells stehen die Interaktionsmechanismen zwischen Skelettmuskulatur und Knochen (82).

Die Architektur des Knochens steht in enger Beziehung zu seiner funktionellen Beanspruchung bei der Muskelaktivität und Schwerkraft auf das Skelettsystem einwirken. Die Regulation der Knochenstruktur erfolgt über eine Rückkopplungsschleife zwischen einer aus Belastung resultierenden Knochen deformation und der sich adaptierenden Knochenfestigkeit. Schon während des Wachstums ermöglicht dieses homöostatische System eine kontinuierliche Anpassung an die äußeren Krafteinflüsse. Beim Heranwachsenden finden knöcherne Adaptationsvorgänge statt, die durch auf den Knochen einwirkende Muskel- und Hebelkräfte beeinflusst werden (77). Die muskulären und knöchernen Anpassungsprozesse und das Zusammenspiel von Muskeln und Knochen wurden in der Vergangenheit in klinischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Erkrankungen, die die Muskelentwicklung beeinträchtigen auch gleichzeitig einen Einfluss auf die Knochenstruktur haben (60). Basierend auf diesen Forschungsergebnissen sollte eine Betrachtung und Bewertung der Knochengeometrie, Knochenfestigkeit und der Knochenmasse nicht isoliert, sondern in Abhängigkeit vom funktionellen Gesamtgefüge erfolgen. Insbesondere gilt dies im Hinblick auf die Interaktion von Muskeln und Knochen. Muskelaktivität und die daraus resultierenden

Knochenverformungen stellen wichtige Aspekte funktioneller Beanspruchung dar und beeinflussen die Knochengeometrie entscheidend.

1.1 Anatomie und Physiologie der Knochen

Das Skelett bei Wirbeltieren wird aus einer Vielzahl unterschiedlicher Knochen gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Knochenparameter an einem Röhrenknochens (Os femoris) von Mäusen untersucht. Ein Röhrenknochen besteht zu 70% aus anorganischen Materialien, zu 20% aus organischen Materialien und zu 10 % aus Wasser. Das Knochengewebe ist histologisch aufgebaut aus Osteozyten, Osteoblasten (knochenaufbauende Zellen), Osteoklasten (knochenabbauende Zellen), kollagenen Fasern vom Typ 1, Knochenmatrix und anorganischen Bestandteilen (zumeist Hydroxylapatit). Am Knochen unterscheidet man die außen liegende Kortikalis und die innen gelegene Spongiosa. In der Kortikalis befinden sich die Osteone. Als Osteon wird ein Verbund aus Havers-Kanal, Knochenlamellen und Osteozyten bezeichnet. In den längs der Kortikalis verlaufenden Havers-Kanälen liegen Nerven und Blutgefäße. Die Havers-Kanäle sind durch die quer verlaufenden Volkmann-Kanäle miteinander verbunden. Zwischen den einzelnen Osteonen liegen die Schalllamellen. Die Trennung zum Markraum bilden die inneren Generallamellen. Die äußeren Generallamellen stellen die Abgrenzung zum oberflächlichen Periost dar. Ein trabekuläres Maschenwerk (Trabekel = Knochenbälkchen) formt den spongiösen Knochenanteil. Das Wachstum eines Röhrenknochens vollzieht sich einerseits auf Basis der enchondralen Ossifikation. Hierbei entsteht aus Knorpelgewebe im Bereich der Wachstumsfuge Knochengewebe, was ein Längenwachstum des Knochens bewirkt. Zum anderen erfolgt das Dickenwachstum eines Röhrenknochens auf der Grundlage des sogenannten „Modellings“, bei dem endokortikal lokalisierte Osteoblasten und periosteale Osteoklasten den Knochen auf- und abbauen. Dabei überwiegt der Knochenaufbau durch die Osteoblasten zumeist den Knochenabbau durch die Osteoklasten (81). Sowohl das durch enchondrale Ossifikation entstandene, als auch das durch Modelling gebildete Knochengewebe unterliegt einem ständigen Umbau, dem sogenannten „Remodelling“. Das Remodelling findet gleichermaßen am trabekulären und kortikalen Knochen statt. Eine Gruppe von Osteoklasten entfernt einen Knochenanteil, der dann von Osteoblasten ersetzt wird. Das Remodelling findet auf einer Seite des kortikalen oder trabekulären Knochens statt, das Modelling vollzieht sich hingegen auf den entgegengesetzten Seiten des kortikalen Knochenanteils. Die Prozesse Modelling und Remodelling sind biologische Prozesse, die in

unterschiedlicher Art und Weise das Knochenwachstum und somit auch die verschiedenen Knochenparameter, wie beispielsweise Knochenmasse, Knochendichte und auch den endostealen/periostealen Umfang mitbestimmen (Abb.1).

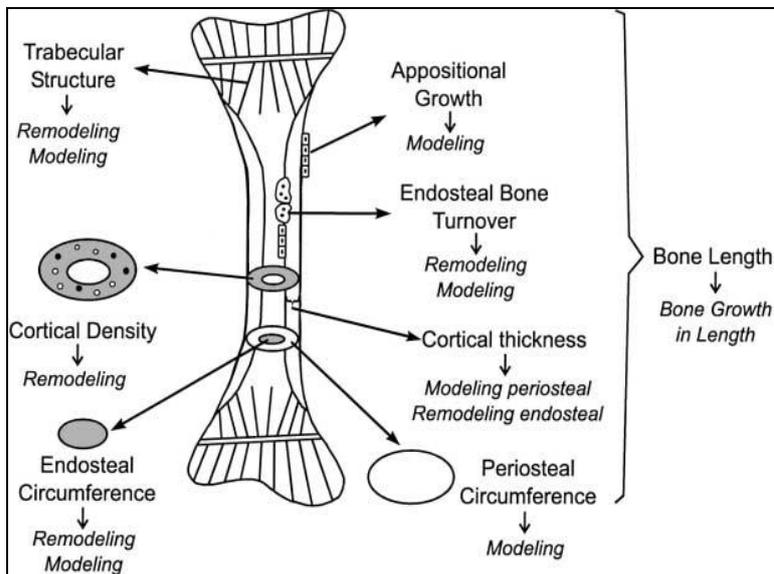


Abb.1: Ablauf Knochenwachstum (81)

1.2 Anatomie und Physiologie der Muskeln

In der vorliegenden Arbeit wurde die Skelettmuskulatur (M.gastrocnemius) von Mäusen untersucht. Zu den verschiedenen Muskelarten bei Säugetieren zählen die glatte und die quergestreifte Muskulatur. Letztere wird weiter in die Herzmuskulatur und die Skelettmuskulatur unterteilt. Die Muskelarten unterscheiden sich in ihrem histologischen Aufbau und in ihrer Funktion. Die Skelettmuskulatur entsteht aus mesodermalen Stammzellen, die sich zunächst zu Vorläuferzellen entwickeln (Prämyoblasten und Myoblasten), um später durch Zellfusion die Muskelzellen zu bilden. Ein Skelettmuskel besteht aus einer Anordnung vieler einzelner Muskelfasern, die in großen Gruppen zusammenliegen. Abhängig vom Muskelkontraktionsmechanismus differenziert man zwischen Slow-Twitch-Fasern (ST-Fasern) und den Fast-Twitch-Fasern (FT-Fasern). Die ST-Fasern sind in der Lage über einen langen Zeitraum eine andauernde Kraft zu entwickeln, während die FT-Fasern eine kurzfristige, sehr hohe Kraftentfaltung ermöglichen. Der M.gastrocnemius zählt zu den Muskeln, die kurzfristig eine hohe Kraft entwickeln können, jedoch nur eine geringe Ausdauerfähigkeit besitzen (76). Umgeben wird der Muskel von einer straffen Hülle aus Bindegewebe, der Muskelfaszie. Von dem darunter liegenden Epimysium strahlen Bindegewebssepten in den Muskel ein und unterteilen ihn in Sekundärbündel.

Die Sekundärbündel werden durch die Perimysiumsepten weiter in Primärbündel geteilt. Innerhalb dieser Primärbündel liegen die parallel angeordneten Muskelfasern. Die Muskelfasern entstehen durch Verschmelzung von einkernigen Muskelvorläuferzellen, den Myoblasten (37). Sie zeichnen sich mikroskopisch durch viele randständige Kerne und durch die quergestreiften Myofibrillen aus. Die einzelnen Fasern sind von einer Zellmembran, dem Sarkolemm, umgeben. Die Myofibrillen bestehen aus elektronenmikroskopisch nachweisbaren Aktin- und Myosinfilamenten, die für die kontraktile Eigenschaft des Muskels verantwortlich sind. Aktin- und Myosinfilamente sind so regelmäßig alternierend angeordnet, dass sich daraus ein charakteristisches Querstreifungsmuster ergibt. Im Polarisationsmikroskop sind verschiedene Banden innerhalb der Muskelfaser zu sehen, sowie eine Abgrenzung zu einzelnen ca. $2,2\mu\text{m}$ großen Sarkomeren (37). Bei der Muskelkontraktion kommt es zu einem Ineinandergleiten der Aktinfilamente zwischen die Myosinfilamente und dadurch zur Sarkomerverkürzung. Durch myotendinöse Verbindungen werden die resultierenden Zugkräfte auf die Kollagenfibrillen einer Sehne und von dort aus weiter auf den Knochen übertragen. Die elektromechanische Kopplung zwischen Nerv und Muskel entsteht durch die Generierung eines Aktionspotentials an der neuromuskulären Synapse. Das Aktionspotential gelangt von dort aus über die motorische Endplatte zum Muskel. Es kommt präsynaptisch zur Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin in den synaptischen Spalt. An der postsynaptischen Membran des Zielmuskels befinden sich Acetylcholinrezeptoren über die die Reizweiterleitung zum Muskel stattfindet (36). Die motorischen Einheiten innerhalb des Muskels bilden die Grundlage der Innervation verschieden großer Muskelfaserverbünde. Als motorische Einheit bezeichnet man ein Motoneuron und die von seinem Axon innervierten Muskelfasern (36). Abhängig von der Funktion eines Muskels beinhaltet eine motorische Einheit viele oder wenige Muskelfasern. Erfüllt der Muskel Präzisionsaufgaben (z.B. mimische Muskulatur) besteht die motorische Einheit aus nur wenigen Muskelfasern. Hingegen ist die Anzahl der von einem Motoneuron innervierten Muskelfasern bei Muskeln, die für gröbere Bewegungsabläufe verantwortlich sind (z.B. Oberschenkelmuskulatur) weitaus größer. Über die Rekrutierung unterschiedlich vieler motorischer Einheiten kann zudem die Muskelkraft innerhalb eines Muskels dosiert werden. Die Skelettmuskulatur ist für die Lokomotion, Stabilisation und den Schutz des Körpers zuständig (4).

1.3 Grundlagen des Ganzkörpervibrationstrainings

Schon seit den fünfziger Jahren werden im Bereich der Arbeitsmedizin die bei Arbeiten anfallenden Schwingungsbelastungen und die daraus resultierenden gesundheitlichen Folgen untersucht (15, 16). Um 1970 wurde das Prinzip der oszillatorischen Schwingungen in der Sowjetunion durch Vladimir Nazarov in Trainingsmethoden integriert, die erst in der Raumfahrt und später in anderen Bereichen eingesetzt wurden. Seit Mitte der neunziger Jahre werden verschiedene Vibrationstrainingsgeräte im Handel angeboten. Es gibt seitenalternierende Systeme (Galileo ®, Novotec Medical GmbH, Pforzheim), vertikal vibrierende Systeme (Powerplate®, PowerPlate Deutschland GmbH, Frankfurt) sowie Mischformen bei denen unterschiedliche Vibrationsrichtungen erzeugt werden können (Zeptor ®, SR Therapiesysteme GmbH & Co., Wien). Beim WBV werden auf einer seitenalternierenden Vibrations-Platte mechanische Schwingungen generiert, die vom Patienten in verschiedenen Ausgangstellungen kompensiert werden müssen (Abb.2). Dies führt zu einer Beanspruchung agonistischer und antagonistischer Muskelgruppen. Der Körper versucht die ihm durch das Vibrationssystem aufgezwungenen Bewegungen auszugleichen. Aus mechanischer Sicht wird zwischen Ganz- und Teilkörperschwingungen unterschieden. Während die Teilkörperschwingungen nur auf einen Körperteil oder auf ein einzelnes Körpersystem beschränkt sind, wird bei den Ganzkörperschwingungen ein höherer Körpergewichtsanteil erfasst.

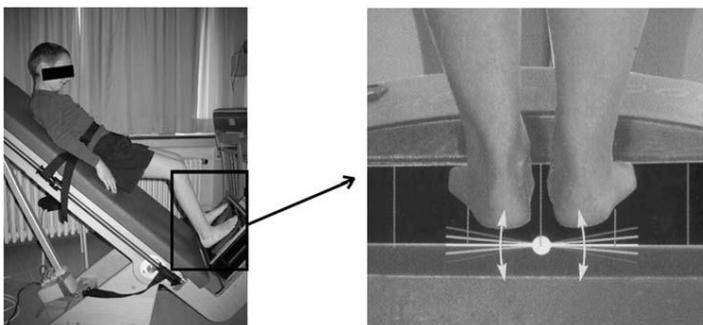


Abb.2: Steh- und Gehtrainersystem (86)

Knochengewebe reagiert auf mechanische Vibration mit verschiedenen morphologischen Adaptationsmechanismen (56, 99). Es ist bekannt, dass unterschiedliche physiologische Sensorsysteme auf Vibrationsreize ansprechen, jedoch sind die der Adaptation von Knochen und Muskulatur zu Grunde liegenden Prozesse bislang noch nicht abschließend geklärt (99). Eklund und Hagbarth beschrieben 1966 den Tonic-Vibration-Reflex, der zu einer Steigerung des Muskeltonus führt (19). Die

meisten aktuellen Erklärungsmodelle zum Wirkungsmechanismus eines Vibrationstrainings lehnen sich an diese frühen Untersuchungen an (58). Die von den Autoren beschriebenen Muskel-Dehn-Reflexe werden ausgelöst, wenn sich der Muskel in Vorspannung befindet und gleichzeitig in kurzer Zeit gedehnt wird. Es kommt zu einer schnellen Verkürzung des gedehnten Muskels, bei der die Verschaltung unwillkürlich auf Rückenmarksebene stattfindet. Dabei wird die Muskelspindel stimuliert und die Umschaltung über das α -Motoneuron führt schließlich zur Muskelkontraktion. Ob ein Vibrationstraining gleichermaßen über eine solche Reflexauslösung zur Muskeltonussteigerung führen kann, wird derzeit diskutiert (50). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch neurale Regulationsmechanismen sowie die Erzeugung von muskulärer Aktivität zur Minimierung der Vibrationsimpuls-Übertragung auf das Weichteilgewebe („Muscle Tuning“) eine Rolle im Hinblick der Muskeltonussteigerung spielen (93). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass auch die durch Vibration erzeugte Stoffwechselsituation grundlegend für die funktionellen Anpassungen des muskuloskelettalen Systems ist (63, 65). Knochenmark-Osteoprogenitor-Zellen können auch direkt auf die Belastungsveränderungen während der Vibration reagieren, und so die Knochenstruktur mitbestimmen (12). Die Effekte eines Vibrationstrainings auf den Organismus sind seit den neunziger Jahren Gegenstand der Forschung in verschiedenen Studien. So wurden am Myokard von Kaninchen unterschiedliche Vibrations-Anwendungen untersucht, die die Energiebereitstellung der Herzmuskelzellen dosisabhängig beeinflussen können (92). Ebenfalls an Kaninchen wurde ein Zusammenhang zwischen strukturellen Veränderungen im Hinterwurzelganglion des Rückenmarks und einem Vibrationstraining nachgewiesen (43). Auch in der muskuloskelettalen Grundlagenforschung werden häufig tierexperimentelle Studien durchgeführt. So führte ein Vibrationstraining der hinteren Extremität bei gesunden Schafen zu einer signifikant erhöhten Knochendichte des proximalen Femurs (71). Vergleichbare Ergebnisse findet man auch bei anderen Tieren, die einem Vibrationstraining unterzogen wurden. Bei immobilisierten Ratten konnte der Knochenabbau durch Vibrationsreize reduziert werden (77, 106). Ovariectomierte Ratten, die an einem Vibrationstraining teilnahmen, zeigten eine erhöhte Knochenneubildung und einen reduzierten Knochenabbau (32, 53). In einer Untersuchung mit heranwachsenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass mechanische Vibrationsreize die Knochenstruktur festigen (99). An immobilisierten Mäusen wurde untersucht inwieweit ein Vibrationstraining geeignet ist die abbauenden Prozesse am muskuloskelettalen System aufzuhalten. Durch die an einer

immobilisierten Extremität applizierten Vibrationsreize kam es zu einer erhöhten trabekulären Knochenfestigkeit (54). Einige tierexperimentelle Untersuchungen deuteten zudem darauf hin, dass Vibrationsreize nicht nur eine lokale Wirkung haben. So sind in der Literatur auch Effekte an den Körperanteilen beschrieben, die nicht unmittelbar der Vibration ausgesetzt waren (22, 54). Bei Mäusen kam es an den nicht vibrierten angrenzenden Körperteilen zu einer Strukturverbesserung (100). Neben der Forschung in tierexperimentellen Studien wurde das Vibrationstraining an gesunden und kranken humanen Probanden untersucht. Bei jungen und gesunden Sportlern ließ sich durch ein regelmäßiges Vibrationstraining mittelfristig die Sprunghöhe steigern (58). Bei alten und gesunden Patienten wurde nach einem Vibrationstraining ein akuter Anstieg des IGF-1-Spiegels und der Cortisolkonzentration beobachtet. Außerdem konnte eine Steigerung der Muskelkraft festgestellt werden (9, 73). Neuerdings wird ein Vibrationstraining auch in der Rehabilitation neurologischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Multiple Sklerose und Apoplex eingesetzt, wo es zu einer besseren Balancefähigkeit der Patienten beitragen kann (58). Vergleichbar mit den tierexperimentellen Immobilisationsstudien wurde auch beim Menschen untersucht, ob sich knochenabbauende Effekte während einer Inaktivitätsphase durch ein Vibrationstraining aufhalten lassen. Hierfür beobachtete man 20 gesunde Männer im Rahmen einer Bed-Rest-Studie. Die Probanden hielten sich während einem 56-tägigen Untersuchungszeitraum ausschließlich in einer horizontal liegenden Position („Bed-Rest“) auf. Während dieser Immobilisationsphase führten einige der Probanden ein Vibrationstraining durch. Das Training wirkte einem Knochenabbau, wie er bei den Probanden ohne ein Vibrationstraining stattfand, entgegen (62). In neueren Untersuchungen im Zusammenhang mit krankheitsbedingten Immobilisationsfolgen konnten positive Effekte eines Vibrationstrainings im Hinblick auf die Mobilität und die Knochenstruktur bei den Patienten aufgezeigt werden (86, 94). Die bisher durchgeführten tierexperimentellen und humanen Studien unterscheiden sich allerdings häufig in den angewandten Vibrationsparametern. An den Vibrationssystemen lassen sich verschiedene Parameter einstellen, die die Effekte des Trainings mitbestimmen. Hierzu zählen Amplitude, Frequenz und Beschleunigung der Vibrationsplatte. Bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen variiert die Frequenz in Langzeitstudien von 12 bis 45 Hz (61), im Zusammenhang mit Knochenuntersuchungen sogar von 17Hz bis 90Hz (56). Im Hinblick auf die optimale Amplitude und die Dauer der einzelnen Vibrationszyklen für unterschiedliche Gewebetypen ist die derzeitige Studienlage ebenfalls nicht eindeutig (56). In tierexperimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden,

dass Frequenzen in einem Bereich von 30 Hz eine anabole Wirkung auf den Knochen haben (71). Zudem liegen die im Alltag stattfindenden dynamischen Muskelaktionen beim Menschen bei länger andauernden Tätigkeiten in einem Bereich von 20 bis 50 Hz (70). Die Kontraktionszeit einer menschlichen Muskelfaser hängt von ihrer Typisierung ab und liegt im Mittel zwischen 0,01 und 0,1 Sekunden, was 600 – 6000 Kontraktionen pro Minute entspricht. Da eine Frequenz von 25 Hz insgesamt maximal 1500 Muskelkontraktion pro Minute herbeiführt, wird die physiologische Leistungsmöglichkeit des Muskels in diesem Frequenzbereich nicht überschritten. Man weiß außerdem, dass ein α -Motoneuron bei Reizfrequenzen von 25 Hz unterhalb seiner Fusionsfrequenz arbeitet, und somit keine tetanische Muskelkontraktion zu Stande kommt (28). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Frequenz von 25 Hz gewählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswahl der optimalen Vibrationsparameter in der Literatur diskutiert wird. Hingegen sind positive Effekte eines Vibrationstrainings für das muskuloskeletale System gut dokumentiert. Nicht-pharmakologische Therapiemöglichkeiten sind eine wichtige Ergänzung für Patienten bei denen eine medikamentöse Therapie auf Grund von Kontraindikationen nicht möglich ist. Auch für Menschen, deren Mobilität soweit reduziert ist, dass ein körperliches Training mit der Intensität von Alltagsbelastungen nicht durchführbar ist, scheint ein Training mit Vibrationsreizen eine effektive Möglichkeit zu sein, um dem Abbau von Muskel und Knochen entgegenzuwirken.

1.4 Funktionelle Muskel-Knochen-Einheit

Für das Wachstum und die Verknöcherung des Skeletts ist die mechanische Belastung von großer Bedeutung. So finden beim Heranwachsenden knöcherne Adaptationsprozesse statt, die maßgeblich durch die auf den Knochen einwirkenden Muskel- und Hebelkräfte mit beeinflusst werden. Während der Wachstumsphase steigt die Muskelkraft und damit auch die einwirkende Kraft auf das Skelett an (79). Durch den Anstieg der Muskelkraft und die Veränderung der Hebelarme werden auch der Druck und die Biegebeanspruchung auf den Knochen größer und es kommt zur Anpassung der Knochengometrie. Der kortikale Knochenanteil wird erhöht (21). Der modulierende Einfluss von Muskelkraft und körperlicher Aktivität ist gut dokumentiert (57, 80). Auch der Zusammenhang zwischen Muskel- und Knochenentwicklung wurde in der Vergangenheit in klinischen Studien untersucht. Im Rahmen der DONALD-Studie (Dortmund Nutritional and Anthropometric Longitudinal Designed Study)

konnte eine lineare Korrelation des BMC und des BSI zur Muskelentwicklung bei Kindern und Jugendlichen aufgezeigt werden (47). Der enge funktionelle Zusammenhang zwischen Muskel und Knochen wird deshalb auch als „funktionelle Muskel-Knocheneinheit“ (fMKE) bezeichnet (77, 80). Die fMKE stellt den Zusammenhang der Muskel- und Skelettentwicklung beim Menschen dar (82). Es besteht eine ständige Adaptation des Skelettsystems als Reaktion auf die von außen einwirkenden Muskelkräfte. Die größten auf den Knochen wirkenden Kräfte entstehen durch Muskelkraft bei körperlicher Aktivität (60). Dabei kommt es durch die Muskelkontraktionen zu Knochenverformungen, die zur Adaptation des Knochens führen. Die Anpassung des gesunden Knochens auf vermehrte mechanische Beanspruchung vollzieht sich durch die Erhöhung von Knochenmasse und Knochenfestigkeit. Zusätzlich modifizieren nicht-mechanische Faktoren wie Hormone und Ernährung die Anpassung (79). Die Stabilität des Knochens wird neben seinen Materialeigenschaften auch durch Knochendichte, Kortikalisdicke, metaphysäre Trabekeldichte und bei Röhrenknochen zusätzlich durch die diaphysäre Querschnittsfläche bestimmt. Die positive Beeinflussung dieser Merkmale durch körperliche Aktivität wurde beschrieben (13, 41). Umgekehrt führt eine chronische Immobilisation und verminderte körperliche Aktivität zu einem vermehrten Abbau von Muskel- und Knochenmasse (66). Die fMKE stellte einen Paradigmenwechsel in der Diagnostik von Skeletterkrankungen dar und ermöglichte die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Knochenerkrankungen (78). Primäre Knochenerkrankungen sind gekennzeichnet durch Mineralisationsstörungen und Knochenzellfunktionsstörungen. Sie werden verursacht durch genetische, metabolische, hormonelle, ernährungsbedingte oder andere Störungen. Die Muskelfunktion und Muskelkraft sind dabei nicht gestört. Im Unterschied dazu ist bei sekundären Knochenerkrankungen ursächlich die Muskelfunktion und damit die einwirkende Muskelkraft verringert. Die Knochenstruktur reagiert auf die verminderte muskuläre Stimulation mit einer reduzierten Knochenfestigkeit. In der Vergangenheit wurden die in klinischen Arbeiten erfassten Knochenparameter in Bezug auf Alter und in einem Vergleich zum Altersmittelwert einer Population bewertet (79). Die Untersuchung der fMKE basiert hingegen auf einem Zwei-Stufen-Konzept (Abb.3). Zunächst wird der Muskelstatus des Patienten im Bezug zu seiner Körpergröße erfasst. Im zweiten Schritt wird dieser dann im Zusammenhang mit der individuellen Skelettadaptation gewertet. Hintergrund für diese Vorgehensweise ist die Überlegung, dass die Knochenfestigkeit abhängig von der Muskulatur und nicht vom Alter ist. Wird die Knochenmasse und

Knochenfestigkeit auf die Muskulatur bezogen, lässt sich unabhängig vom Alter eine lineare Beziehung nachweisen (79). Im Zwei-Stufen-Konzept der fMKE findet daher zunächst eine Überprüfung der Muskelmasse und der Muskelkraft statt. Zeigt sich eine normale Muskelentwicklung bei einer unzureichenden Knochenanpassung spricht man von einer primären Skeletterkrankung, wie bei der Osteogenesis imperfecta. Einer sekundären Skeletterkrankung entspricht beispielsweise eine vermehrte körperliche Inaktivität. Diese führt zunächst zum Muskelabbau und dadurch erst sekundär zum Abbau des Knochens.

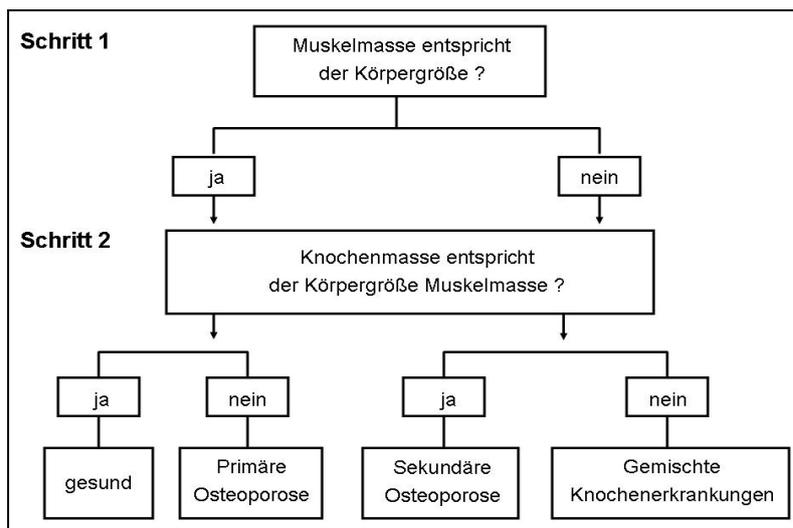


Abb.3: Schematische Darstellung für ein diagnostisches Stufenprogramm (78)

Fehlen mechanische Belastungsreize, so kommt es in der Folge zum Substanzabbau. So beobachteten Rittweger et al. nach einer 24tägige Immobilisationsphase der unteren Extremität bei gesunden Probanden eine Abnahme der Knochenmasse (66). Bekannt ist auch, dass Training und die damit verbundenen Muskelaktivitäten einen Knochenabbau verhindern können (10).

Die Beobachtungen der Vergangenheit zeigen, dass neben Erkrankungen die direkt die Muskel- oder Knochenentwicklung beeinträchtigen, auch eine verminderte körperliche Aktivität zu einer Reduktion von Muskel- und Knochenmasse führt. Bei vielen chronischen Erkrankungen liegt eine Störung der Muskelentwicklung und damit sekundär eine Störung des Skelettsystems vor. Somit kommt einem optimalen Aufbau von Muskelmasse und Muskelfunktion ein hoher Stellenwert in der Therapie zu. Auch die Erkenntnis, dass ein Spitzenwert für Knochenmasse im Jugendalter keinen dauerhaften Schutz vor Osteoporose im höheren Lebensalter bedeutet, zeigt die Notwendigkeit der muskulären Aktivität zur Stimulation des Knochenwachstums (79).

Demnach folgt aus dem Verständnis der funktionellen Muskel-Knochen-Einheit, dass körperliche Aktivität in jedem Lebensalter eine wichtige Grundvoraussetzung für eine lang anhaltende Mobilität bildet.

1.5 Botulinumtoxin

In der vorliegenden Arbeit wurde Clostridium botulinum Toxin Typ A = Dysport® (Ipsen Pharma GmbH, Ettlingen, Deutschland) zur Immobilisation der Tiere verwendet. In der Medizin ist Botulinumtoxin ein zugelassenes Arzneimittel. Die frühe therapeutische Anwendung begann um 1960 zur Behandlung des kindlichen Strabismus (29). Gegenwärtig wird es therapeutisch in verschiedenen medizinischen Fachrichtungen, etwa zur Behandlung zervikaler Dystonien und Blepharospasmus, eingesetzt (17). Botulinumtoxin wird zudem angewendet bei pädiatrischen Patienten mit spastischen Syndromen bei Cerebralparese sowie bei Patienten mit Hyperhidrosis oder exzessivem Speichelfluss (35). Auch in der Kinderklinik der Universität zu Köln wird Botulinumtoxin im Rahmen spastischer Syndrome bei Kindern zur Muskeltonussenkung verwendet.

Die therapeutischen Botulinumtoxin-Präparationen bestehen aus Botulinumtoxin und pharmazeutischen Hilfsstoffen, wie humanem Serumalbumin und Puffersystemen zur pH-Wert-Einstellung (18). Der Botulinumtoxinanteil setzt sich aus dem Botulinumneurotoxin sowie nichttoxischen Proteinen zusammen (Abb.4). Die therapeutischen Präparate werden durch Kultivierung spezieller Zuchtstämme von Clostridium Botulinum auf biologischem Wege hergestellt. Das Botulinumneurotoxin bindet selektiv an Glykoproteine der Nerven-Terminalen und spaltet, nach erfolgter intrazellulärer Aufnahme, verschiedene Proteine der Acetylcholin-Transportprotein-Kaskade, sogenannte SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimidesensitive fusion attachment protein receptor). Diese Proteine vermitteln den Transport der Acetylcholinvesikel vom Intrazellularraum zum synaptischen Spalt (18). Man vermutet, dass die Synapse und die Erregungsübertragung auf die motorische Endplatte so blockiert und die Muskelfunktion gehemmt wird. Botulinumtoxin wirkt primär lokal am quergestreiften Muskel (69). Zentralnervöse und systemische Effekte sind bisher nicht beschrieben (14, 66). Im Tierversuch führte eine intramuskuläre Injektion von Botulinumtoxin zu einem Verlust der Muskelmasse am Injektionsort (95). Direkte Wirkungen von Botulinumtoxin am Knochen sind in der Literatur nicht beschrieben, wohl aber indirekte Effekte in Folge der Muskelinaktivierung. Durch die Blockierung der Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte der Muskulatur, kam es so in

tierexperimentellen Untersuchungen zu einem Bewegungsverlust und infolge auch zu einem Knochenabbau (60, 95). Die Wirkdauer des Botulinumtoxin hängt von der Injektionsmenge ab. In geringeren Dosierungen erlangen die betroffenen Motorneurone ihre Funktion teilweise zurück, hingegen führt bei höheren Dosen erst die Entstehung von neuen Nervenendigungen, das sogenannte „Sprouting“, zum Funktionsrückgewinn. Bei i.m. Injektionen beginnt die Wirkung nach etwa zwei bis drei Tagen, erreicht nach zwei Wochen ein Maximum und klingt nach zweieinhalb Monaten langsam wieder ab (18).

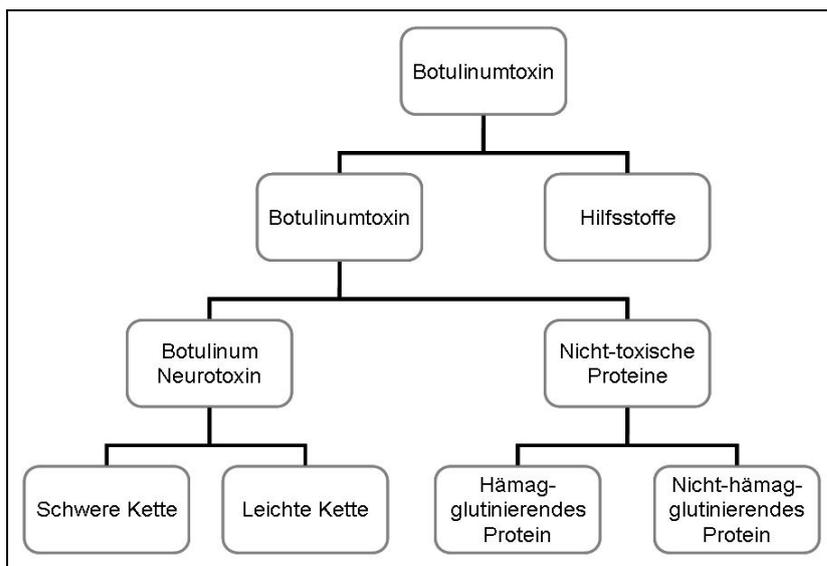


Abb.4: Zusammensetzung therapeutischer Botulinumtoxin-Präparationen (18)

1.6 Muskel- und Skeletterkrankungen im Kindes- und Jugendalter

Die Entstehung von Osteopenien im Kindes- und Jugendalter spielt bei vielen Erkrankungen eine Rolle. Chronische Krankheitsbilder wie Mukoviszidose, Nierenerkrankungen oder rheumatische Erkrankungen führen ebenso zu Störungen der Muskel- und Skelettentwicklung, wie auch Bewegungsmangel bei Kindern und Jugendlichen. Dies hat einen nachhaltigen Einfluss auf die Muskel- und Knochenentwicklung (31). In Folge kommt es zu verminderter Knochenstabilität und Muskelschwäche. Darüber hinaus sind eine Vielzahl anderer muskuloskelettaler Erkrankungen bekannt, die zu einem Verlust der Mobilität und so zu Veränderungen an Knochen- und Muskelgewebe führen.

1.7 Problemstellung

Viele Muskel- und Skeletterkrankungen im Kindes- und Jugendalter führen zu Inaktivität und können mit einer sekundären Inaktivitätsosteoporose verbunden sein. Die im Krankheitsverlauf häufig zunehmende Immobilität führt auch zu einem Verlust der Lebensqualität der Patienten, da Alltagsaktivitäten gar nicht mehr oder nur noch sehr eingeschränkt möglich sind. Zur Simulation muskuloskelettaler Erkrankungen bei Kindern, zur Erforschung neuer Therapieansätze und zum besseren Verständnis der Auswirkungen von muskuloskelettalen Erkrankungen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell gewählt. Das Modell ermöglichte die Durchführung eines WBV-Trainings während einer Inaktivitätsphase. Es ist hinreichend belegt, dass der Nichtgebrauch von Muskulatur zur sekundären Inaktivitätsosteoporose führen kann. Es sind zudem Krankheiten bekannt, bei denen eine solche Inaktivitätsosteoporose auftritt. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Erkrankungen durch Muskelstimulation Therapieerfolge erzielt werden können. Dieser Ansatz hat sich noch nicht genügend durchgesetzt und ist noch nicht ausreichend erforscht. Das „Kölner Konzept“ ist ein Beispiel für einen multidisziplinären Therapieansatz, bei dem WBV einen festen Bestandteil der Therapie darstellt. Oftmals stellt WBV die einzige Möglichkeit zur Muskelstimulation bei schwerwiegendem Krankheitsverlauf dar (z.B. bei schwerer Form der Osteogenesis imperfecta). Es ist allerdings noch zu wenig über den Wirkmechanismus von WBV bekannt. Zur weiteren Erforschung des WBV wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell gewählt, bei dem die rechte hintere Extremität immobilisiert wurde und die Tiere zugleich einem WBV unterzogen wurden.

2 Ziele der Arbeit

In einem Tierversuchsmodell sollen die Effekte von WBV auf Knochen und Muskeln bei durch BTX immobilisierten Mäusen untersucht werden. Es soll aufgezeigt werden, dass eine Immobilisation zur Degeneration von Knochen führt. Das Ziel dieser Tierversuchsstudie ist es, zu zeigen, dass:

1. WBV den durch Immobilisation verursachten Knochenabbau bei Mäusen verhindern kann
2. Immobilisation und WBV zu strukturellen Veränderungen am Knochen und an der Skelettmuskulatur bei Mäusen führen

3 Studienprotokoll

Es wurde eine tierexperimentelle Untersuchung gewählt, da die Analyse der funktionellen Adaptationsprozesse beim Menschen auf Grund der eingeschränkten diagnostischen Methoden nur bedingt möglich ist. Zudem konnten durch das Tiermodell homogene Gruppen unter streng standardisierten Bedingungen untersucht werden. Die vorliegende Studie ist eine Longitudinalstudie, die mit insgesamt 60 Tieren durchgeführt wurde. Die Studie wurde auf zwei Teilstudien mit jeweils 30 Tieren aufgeteilt. Im Rahmen einer Vorstudie wurden der Versuchsaufbau und die Interventionen auf Tauglichkeit geprüft. Die Vorstudie gliederte sich in eine neuntägige Akklimatisationsphase (Versuchstag -8 bis 0) und eine, sich unmittelbar daran anschließende, 28-tägige Versuchsphase (Versuchstag +1 bis +28). Zehn Tiere wurden in zwei Gruppen (KG, IM+WBV) mit jeweils fünf Tieren randomisiert (Abb.5). Alle geplanten Interventionen und der Versuchsaufbau erwiesen sich als praktikabel zur Durchführung der Hauptstudie.

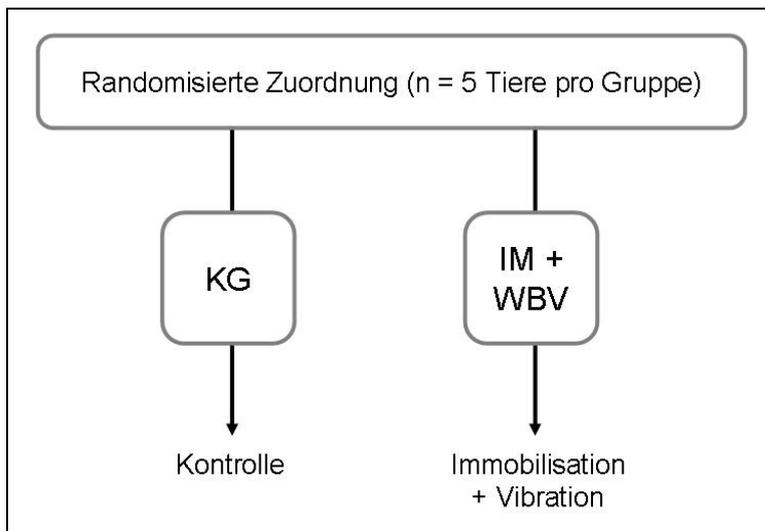


Abb.5: Gruppenzuordnung für die Vorstudie (n =5 Tiere pro Gruppe)

Da nur eine begrenzte Menge an Tierkäfigen und Räumlichkeiten zur Verfügung standen, wurde die Hauptstudie in zwei Teilstudien aufgeteilt. Jede der beiden Teilstudien erstreckte sich über einen Versuchszeitraum von 34 Tagen. In den Teilstudien wurden jeweils 30 Tiere in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Gruppenzuteilung der Tiere erfolgte randomisiert (Abb.6). Jede Teilstudie gliederte sich in eine siebentägige Akklimatisationsphase (Versuchstag -6 bis 0) und eine sich unmittelbar daran anschließende 28-tägige Versuchsphase (Versuchstag +1 bis +28) (Abb.37).

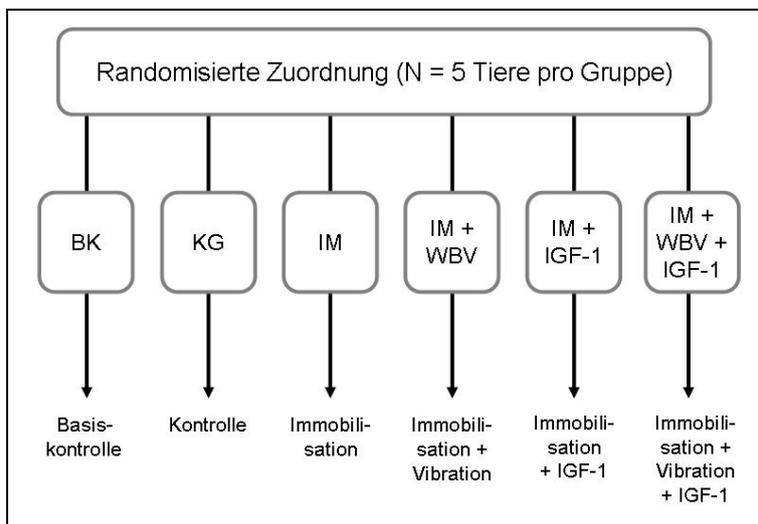


Abb.6: Gruppeneinteilung für die 1./2. Teilstudie (n=5 Tiere pro Gruppe)

In der Auswertung wurden die Tiere der BK, KG, IM und der IM+WBV der 1.Teilstudie berücksichtigt (Abb.7). Die Ergebnisse der IM+IGF-1, der IM+WBV+IGF-1 sowie die Ergebnisse der Vorstudie und der 2.Teilstudie sind nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit (Tab.1).

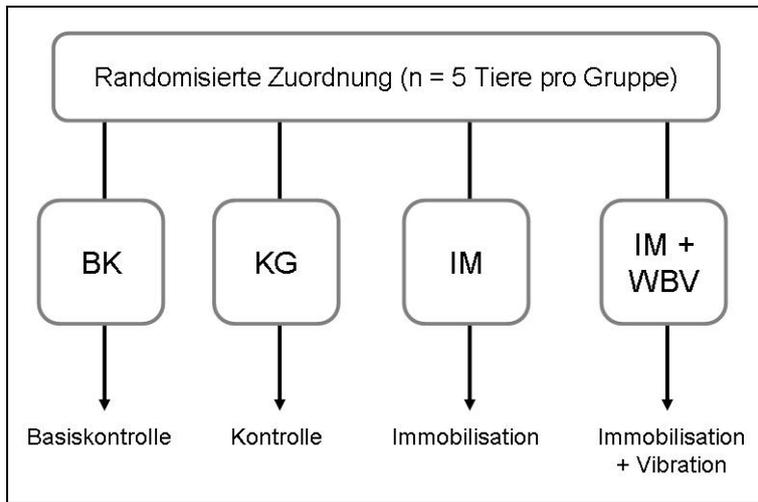


Abb.7: Gruppeneinteilung für die 1. Teilstudie (n=5 Tiere pro Gruppe)

Tab.1: Übersicht Tieranzahl, Gruppenanzahl und ausgewertete Tiere/Gruppen in Vor- und Hauptstudie

	Vorstudie	Hauptstudie (1. Teilstudie)	Hauptstudie (2. Teilstudie)
Anzahl Tiere	10	30	30
Anzahl Gruppen	2	6	6
Gruppen/Tiere ausgewertet in vorliegender Arbeit	-	4/20	-

4 Versuchstiere und Methodik

4.1 Versuchstiere

Die Studie wurde mit weiblichen C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Alle Tiere waren zu Beginn der Untersuchung 16 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 20g. Der C57BL/6 Maus-Typ ist einer der am häufigsten verwendeten Zuchtstämme in der biomedizinischen Forschung (13) und wird in der Muskel-Knochen-Forschung eingesetzt (27, 74, 75, 89, 95). Es wurde ein Antrag auf die Genehmigung des Versuchsvorhabens gemäß § 8 Absatz 1 Tierschutzgesetz gestellt und durch die Tierschutzbehörde genehmigt. Die Tiere wurden mit einem Gesundheitszertifikat durch Charles River Laboratories, Niederlassung Deutschland, Sulzfeld geliefert.

Um die Auswirkungen von Wachstumseffekten auf die Ergebnisse zu minimieren, wurde die Untersuchung an jungen, adulten Mäusen durchgeführt. Von diesen Tieren wird angenommen, dass physiologische Wachstumsprozesse nur noch wenig Einfluss auf Knochen- und Muskelparameter ausüben (44). Es wurde ein Mausmodell gewählt, da Ähnlichkeiten zwischen dem murinen und humanen Genom bestehen (27). Es gibt Hinweise, dass die Adaptationsprozesse von Muskeln, Knochen und Sehnen auf äußere Belastungsreize mit denen beim Menschen vergleichbar sind (32, 100).

4.1.1 Haltung

Die Tiere waren mit Genehmigung und unter Aufsicht des zuständigen Tierstallbeauftragten im Tierstall der Deutschen Sporthochschule Köln untergebracht. Sie lebten in einem kontrollierten 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus (von 7 Uhr bis 19 Uhr beleuchtet). Die Größe der Käfige (14cm×20cm×26cm) und deren Ausstattung entsprach den gesetzlichen Bestimmungen. Jeder Gruppe wurden zwei Ställe zugeordnet, mit jeweils zwei oder drei Mäusen pro Käfig (Abb.8). Alle Tierkäfige wurden mit den Studiendaten gekennzeichnet. Die einzelnen Tiere wurden mit Ohrmarken aus Aluminium markiert.

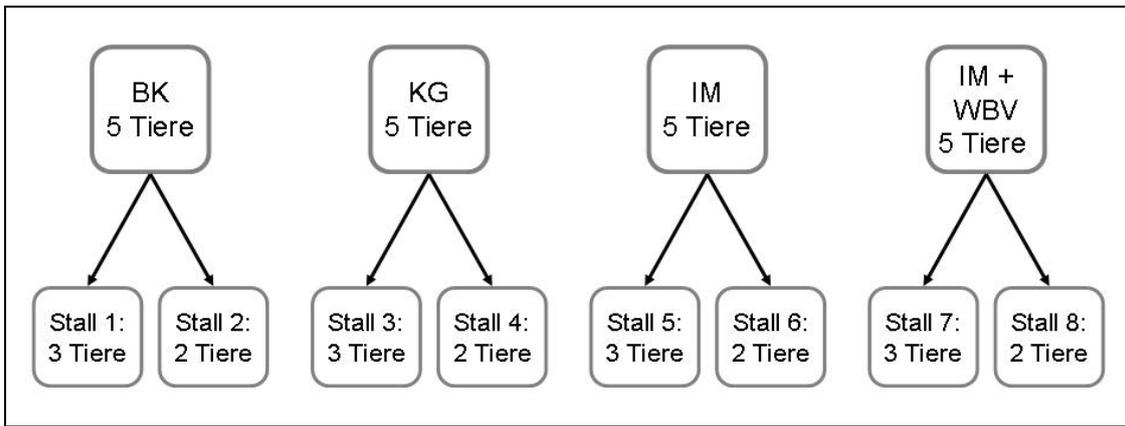


Abb.8: Aufteilung der Tiere in Tierkäfige

Zur Ausstattung der Tierkäfige gehörte ein Standardstreu (Rehofix, ssniff GmbH, Soest, Deutschland) das den Boden des Käfigs vollständig bedeckte (Abb.9). In jedem Käfig befand sich ein Kunststoffhaus, in das sich die Tiere zurückziehen konnten sowie Watte, die von den Mäusen zum Nestbau verwendet wurde. Einmal pro Tag wurden die Tiere hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes kontrolliert und der Käfigzustand inspiziert. Die Reinigung der Tierkäfige wurde zweimal pro Woche durchgeführt. Dabei wurden Wasser, Futter, Streu und Watte erneuert. Die Tiere waren mit einem Standardfutter (RM-H phytoarm, ssniff GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser in ausreichenden Mengen ad libitum versorgt.



Abb.9: Regal mit Tierkäfigen

4.1.2 Gruppen

Dieser Arbeit liegen die Daten von 20 weiblichen C57BL/6 Mäusen zu Grunde. Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn zufällig in die BK, KG, IM oder die IM+WBV eingeteilt. Jeder dieser vier Gruppen wurden fünf Tiere zugeordnet (Abb.10).

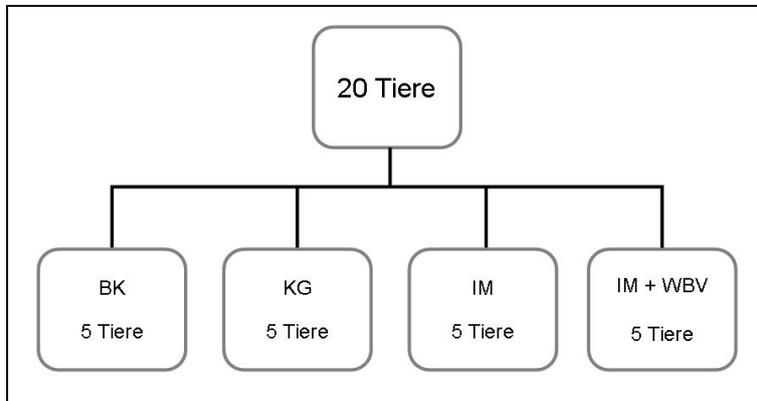


Abb.10: Gruppenzuordnung der Tiere

- **Basiskontrollgruppe**

Die fünf Tiere der BK wurden vor Beginn der Versuchsreihe getötet (Versuchstag 0). Knochen und Muskelgewebe wurden post mortem histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zugeführt.

- **Kontrollgruppe**

Am Versuchstag +1 wurden die fünf Tiere der KG betäubt. Während der Anästhesie wurde NaCl in die rechte hintere Extremität injiziert. Die Mäuse dieser Gruppe wurden nicht immobilisiert und erhielten im Versuchsverlauf keine weitere Intervention. Die Tiere wurden am Versuchstag +28 getötet. Knochen und Muskelgewebe wurden post mortem histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zugeführt.

- **Immobilisations-Gruppe**

Am Versuchstag +1 wurden die fünf Tiere der IM betäubt. Während der Anästhesie wurde BTX in die rechte hintere Extremität injiziert, mit dem Ziel eine Immobilisierung dieser Extremität zu initiieren. Die Tiere wurden am Versuchstag +28 getötet. Knochen und Muskelgewebe wurden post mortem histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zugeführt.

- **Immobilisation+Whole-Body-Vibration-Gruppe**

Am Versuchstag +1 wurden die fünf Tiere der IM+WBV betäubt. Während der Anästhesie wurde BTX in die rechte hintere Extremität injiziert, mit dem Ziel eine Immobilisierung dieser Extremität zu initiieren. Die Tiere wurden dann im weiteren Versuchsverlauf einem WBV unterzogen und am Versuchstag +28 getötet. Knochen und Muskelgewebe wurden post mortem histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zugeführt.

In Tabelle 2 sind alle Versuchsgruppen und die verschiedenen Interventionen dargestellt.

Tab.2: Übersicht der Gruppeneinteilung und Interventionen

Gruppe:	BK	KG	IM	IM+WBV
Intervention				
Betäubung:	✓	✓	✓	✓
Immobilisation:	-	-	✓	✓
WBV:	-	-	-	✓
Tötung:	Tag 0	Tag +28	Tag +28	Tag +28

4.2 Methodik

4.2.1 Betäubung der Tiere

Am Versuchstag +1 wurden alle Mäuse nacheinander mit einer i.p. Injektion Xylazin/Ketamin (Rompun®/Ketanest®) betäubt. Die Zusammensetzung des Betäubungsmittels bestand aus 0,25ml Xylazin (Rompun® 2%) + 0,5ml Ketamin (Ketanest® 10%) + 4,25ml NaCl 0,9%. Zur Injektion des Betäubungsmittels wurden die Tiere im Nacken und am Schwanz fixiert (Abb.11). Anschließend wurden 0,1ml/10g KG i.p. lateral der Mittelbauchlinie in den unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Während der Betäubung wurde dann die Immobilisation mit BTX oder eine äquivalente Injektion mit NaCl durchgeführt. Der Wirkmechanismus von Ketamin (Ketanest®) besteht in einem nicht kompetitiven-Antagonismus am NMDA-Rezeptor, einem Subtyp des Glutamatrezeptors. Zudem wirkt Ketamin agonistisch an Opiatrezeptoren und hat einen Einfluss auf die zentrale und periphere monoaminerge, cholinerge Signalübertragung (35). Ketamin führt zu einer Analgesie und Anästhesie und wird in der Medizin als Kurznarkotikum eingesetzt. Bei Xylazin (Rompun®) handelt es sich um ein α 2-Adrenorezeptor-Agonist, der als Sedativum und Muskelrelaxans wirkt (35).



Abb.11: Intraperitoneale Injektion des Betäubungsmittels (27)

Um Nebenwirkungen der Betäubung zu überwachen, wurden die Tiere anschließend bis zu ihrer vollständigen Regeneration in ihren Käfigen beobachtet. Während der Betäubung atmeten alle Tiere spontan und es traten keine Nebenwirkungen auf. Zur Vermeidung einer Hypothermie waren die Mäuse während dieser Zeit zwischen mit warmem Wasser gefüllten Endstücken eines Einweghandschuhs gelagert (Abb.12). Die Augen wurden nach der Narkose mit einer Augencreme (Bepanten®) bestrichen, um einer Austrocknung entgegenzuwirken. Nach einem Zeitraum von 90 Minuten (± 10 Minuten) bewegten sich alle Tiere wieder aktiv im Käfig.



Abb.12: Lagerung der Tiere nach Betäubung zur Vermeidung einer Hypothermie

4.2.2 Immobilisation und NaCl-Injektionen

Insgesamt zehn Mäusen wurde am Versuchstag 0 unter Narkose BTX (Dysport®, 1 Einheit in 0,1ml; 2 Einheiten/Tier) i.m. in die rechte hintere Extremität injiziert. Die fünf Tiere der KG erhielten äquivalente i.m. Injektionen von NaCl 0,9% (0,1ml NaCl/Injektion) in die rechte hintere Extremität:

- 1 Einheit BTX bzw. NaCl-Lösung: rechter Quadriceps (M. rectus femoris, M. vastus lateralis, M. vastus intermedius, M. vastus medialis), 4mm proximal des Patellasehnenursprungs
- 1 Einheit BTX bzw. NaCl-Lösung: rechtes, posteriores Kompartiment des M.triceps surae (M. gastrocnemius, M. soleus, M. plantaris, M. extensor digitorum longus)

In der Literatur sind unterschiedliche Dosierungen mit unterschiedlichen Präparaten von Botulinumtoxin zur lokalen Immobilisation bei Tieren beschrieben. Sie variieren zwischen 2 Einheiten Botox®/100g Körpergewicht (26) und 3 Einheiten Botox® beziehungsweise Neuronox®/kg Körpergewicht (87). In einer Studie mit 16 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen wurde zur Immobilisation des rechten Hinterbeins eine Dosis von 2 Einheiten Botox®/100g Körpergewicht verwendet (100). Zum wirksamen Anteil des Botulinumtoxin bezogen auf 1 Einheit findet man keine Angaben. Die Dosierung in der vorliegenden Arbeit lag bei 2 x 1 Einheit BTX in jeweils 0,1ml Lösung. In einer Ampulle des Medikaments waren 500 Einheiten enthalten (Abb.13).

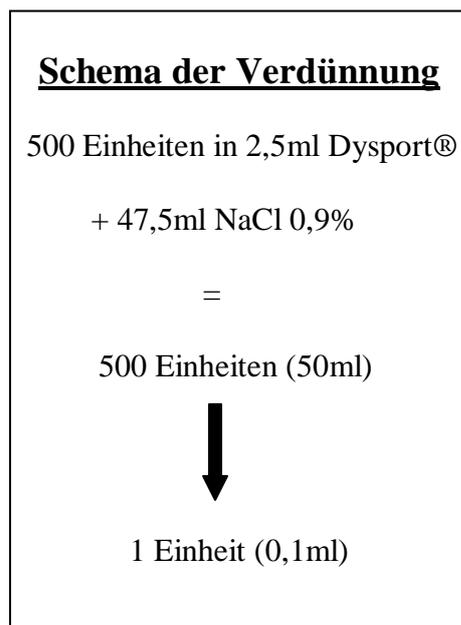


Abb.13: Schema der Verdünnung von Dysport®

4.2.3 Whole-Body-Vibration

Die Mäuse der IM+WBV wurden während der vierwöchigen Versuchsdauer, in jeder Woche an drei bis fünf Tagen einem 30-minütigen WBV unterzogen. In der ersten Serie wurde das WBV der Tiere an drei hintereinander folgenden Tagen (Versuchstag +2 bis +4) durchgeführt, gefolgt von einer zweitägigen Pause (Versuchstag +5 und +6). Im Anschluss daran wurden die Tiere dann immer an fünf aufeinander folgenden Tagen vibriert (Versuchstag +7 bis +11; Versuchstag +14 bis +18; Versuchstag +21 bis +25). Nach jeweils fünf Tagen WBV schloss sich eine zweitägige Pause an, bevor die nächste Serie WBV startete. Das WBV wurde während der Versuchsdauer insgesamt 18mal durchgeführt (Abb.14).

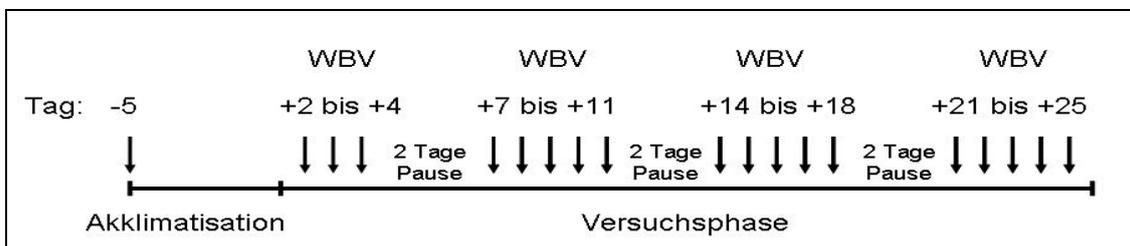


Abb.14: Übersicht WBV und Vibrationspausen im Versuchsverlauf

Am jeweiligen Trainingstag wurden die Tiere aus ihren Tierkäfigen herausgenommen und in einen eigens für dieses Trainingsprogramm entwickelten Käfig auf der Vibrationsplatte gesetzt (Abb.15). Die Fächer, in denen die Tiere sich während der WBV befanden, waren in drei Einzelbereiche unterteilt, so dass jedes Tier während der Vibration einen festen Platz hatte. Der Käfig war auf einer Vibrationsplattform installiert (Galileo2000, Novotec, Pforzheim, Germany). Der Plastikkäfig und die unterteilten Fächer stellten sicher, dass sich die Tiere während dem WBV an derselben Stelle auf der Vibrationsplatte befanden. Es wurden fünf Tiere zeitgleich in insgesamt zehn Vibrationszyklen mit jeweils drei Minuten Dauer vibriert. Die Plattform vibrierte im Bereich des Faches, in dem sich die Mäuse befanden mit einer vertikalen Akzeleration von $a=2,09g$, einer Amplitude von $A=0,83mm$ und einer Frequenz von $f=25$ Hz. Eine Vibrationsdauer von drei Minuten, die Frequenz (25Hz) und die Amplitude (0,83mm) waren im Gerät vorprogrammiert. Nachdem das Gerät von seiner Arbeitsfrequenz von 25Hz auf 0Hz heruntergefahren war, wurde unmittelbar der nächste Vibrationszyklus gestartet. Hatten die Tiere insgesamt zehn Vibrationszyklen absolviert, wurden sie zurück in ihre Käfige gesetzt.



Abb.15: WBV-Trainingsgerät (Galileo2000, Novotec, Pforzheim)

4.2.4 Analyse der Mobilität und Gewichtsmessung

Analyse der Mobilität

In Anlehnung an einen in der Literatur beschriebenen Mobilitäts-Score wurde die Mobilität der Tiere im Versuchsverlauf bewertet (100). Der in der Literatur beschriebene Score beinhaltet fünf Beobachtungskriterien. Diese wurden zunächst in der Vorstudie getestet und zu insgesamt acht Beobachtungskriterien ergänzt. Von diesen acht Kriterien stellten sich fünf als besonders geeignet heraus, den Mobilitätszustand der Tiere abzubilden. Anhand folgender fünf Beobachtungskriterien wurde dann die Mobilität, der Tiere in der vorliegenden Untersuchung bewertet:

- Abduktion der rechten hinteren Extremität während des Anhebens des Körperhinterteils
- Benutzen der rechten hinteren Extremität während dem Lauf
- Benutzen der rechten hinteren Extremität während dem Klettern
- Abgang vom Klettergerüst (Käfigdeckel)
- Haltung im Stand auf den Hinterläufen

An Hand dieser fünf Kriterien wurde die Aktivität der Tiere im Studienverlauf von drei verschiedenen Untersuchern bewertet. Die Beurteilung der Mobilität erfolgte durch ein Punktesystem für jedes der fünf Beobachtungskriterien. Dabei entsprachen:

0 Punkte = komplette Immobilität	}	pro Übung / Untersucher
1 Punkt = partielle Mobilität		
2 Punkte = volle Mobilität		

Die durch die Untersucher vergebenen Einzelpunktwerte wurden im Anschluss zu einem Gesamtpunktwert addiert, so dass sich für jedes Tier eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 Punkten (komplette Immobilität) und 30 Punkten (volle Mobilität) ergab. Der Score wurde an den Versuchstagen -5, +2, +7, +14, +21 und +27 von denselben Untersuchern durchgeführt (Abb.16). Die Punktwerte wurden in einem Dokumentationsbogen festgehalten (Abb.38).

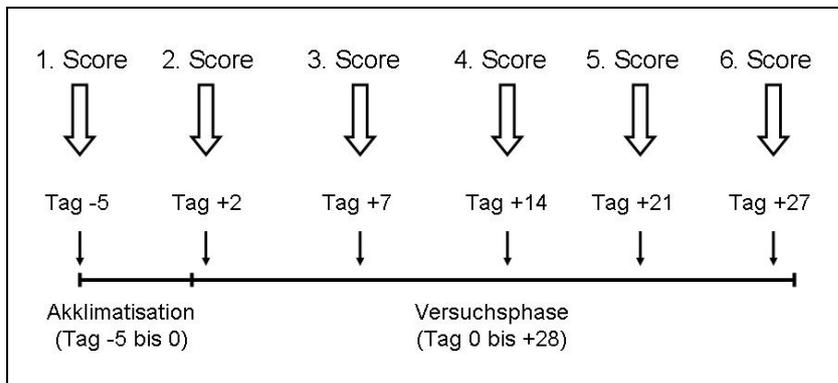


Abb.16: Zeitpunkte der Durchführung des Mobilitäts-Scores im Versuchsverlauf

Während der Durchführung des Mobilitäts-Scores wurden die Tiere einzeln in einen leeren Tierkäfig und auf die Hand des jeweiligen Untersuchers gesetzt. Die Beobauungskriterien wurden dann wie folgt bewertet:

- **Abduktion der rechten hinteren Extremität während des Anhebens des Körperhinterteils**

Der hintere Rumpfteil wurde am Schwanz angehoben und die willkürliche Aktivität der immobilisierten Extremität durch Widerstand mit einem Finger von lateral gegen die Extremität geprüft. Die Hinterbeine hatten während der Untersuchung keinen Kontakt zur Unterfläche. Einer vollen Mobilität (2 Punkte) entsprach, wenn die Maus die Extremität beliebig über den Finger hinweg anheben oder mit Kraft dagegen abduzieren oder flektieren konnte. War vorher schon ohne Widerstandgabe keine willkürliche Aktivität erkennbar wurde das Kriterium mit 0 Punkten gewertet. Eine partielle Aktivität in Form von Bewegungsansätzen oder sich im Seitenvergleich zeigenden abgeschwächten Muskelaktionen wurden mit 1 Punkt bewertet.

- **Benutzen der rechten hinteren Extremität während dem Lauf**

Es wurde beurteilt, inwieweit alle Extremitäten beim Laufen eingesetzt werden konnten. Das Hinterherschleifen eines Beines beim Laufen wurde mit 0 Punkten bewertet. Zeigte

sich eine eingeschränkte Aktivität, ohne vollständigen Abdruck durch die Extremität mit einem eingeschränkten Funktionsgewinn für die eigentliche Laufaktion, erfolgte die Bewertung mit 1 Punkt. Ein seitengleiches Abdruckverhalten und normales Laufverhalten wurde mit 2 Punkten bewertet.

▪ **Benutzen der rechten hinteren Extremität während dem Klettern**

Es wurde die Kletteraktivität der Tiere am Gitter eines geschlossenen Käfigdachs bewertet. Hinsichtlich der Kletteraktivität wurde unterschieden, ob alle Extremitäten mit Greif- und Halteaktivitäten während dem Klettern eingesetzt werden konnten. Bei vollständiger Immobilität einer Extremität, fanden alle Kletteraktionen mit Ausweichen auf die nicht immobilisierte Extremität statt (0 Punkte). Versuchte die Maus alle Extremitäten einzusetzen, rutschte dann aber beim Greifen ab oder konnte ihr Gewicht nicht vollständig übernehmen, erfolgte die Bewertung mit 1 Punkt. Das normale Klettern mit dem Einsatz aller Extremitäten entsprach einer Bewertung mit 2 Punkten.

▪ **Abgang vom Klettergerüst**

Es wurde das Kletterverhalten der Tiere am Gitter eines geschlossenen Käfigdachs bewertet. Es wurde beurteilt, ob die Maus sich beim Abgang vom Käfigdeckel mit allen Extremitäten gleichermaßen herunterlassen konnte. War dies uneingeschränkt möglich, entsprach dies einer Bewertung mit 2 Punkten. Wurde beobachtet, dass ein Abgang zwar mit Beteiligung aller Extremitäten, aber beim Einsatz der rechten hinteren Extremität immer die Unterstützung durch eine zweite Extremität notwendig war, erfolgte die Bewertung mit 1 Punkt. Konnte die Maus sich nur mit der linken hinteren Extremität oder den beiden vorderen Extremitäten herunterlassen, wurde dies mit 0 Punkten bewertet.

▪ **Haltung im Stand auf den Hinterläufen**

War es der Maus nicht möglich ihr Gewicht gleichermaßen auf beide Hinterbeine während dem Stand zu verteilen, sondern setzte sie ausschließlich die linke hintere Extremität ein, wurde das Beobachtungskriterium mit 0 Punkten bewertet. Konnte sie auch mit der rechten hinteren Extremität ihr Körpergewicht übernehmen, war aber trotzdem nicht in der Lage sich auf den Hinterbeinen über ihren Körperschwerpunkt nach vorne, zur Seite oder nach Hinten zu verlagern, entsprach dies einer Bewertung mit 1 Punkt. Bei uneingeschränkter Übernahme des Körpergewichts mit beiden hinteren

Extremitäten und der Möglichkeit sich über den Körperschwerpunkt hinaus in alle Richtungen zu verlagern, wurden 2 Punkte vergeben.

Gewichtsmessung

Das Körpergewicht der Tiere wurde im Versuchsverlauf an den Tagen -5, +1, +3, +7, +14, +21, +27 und +28 gemessen (Abb.17).

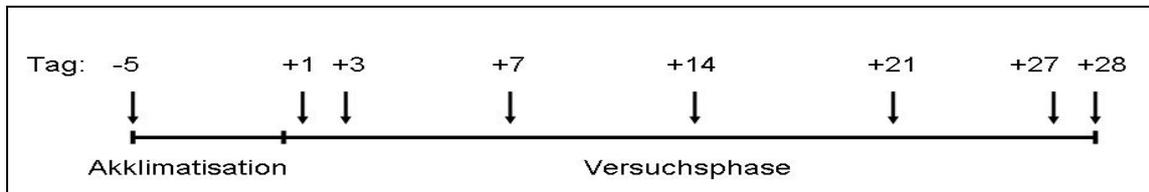


Abb.17: Messzeitpunkte für das Körpergewicht im Versuchsverlauf

Die Tiere wurden für die Messung einzeln in einen leeren Käfig gesetzt und dann gewogen. Die Waage war vorher mit dem Leergewicht des Tierkäfigs kalibriert worden. Die Angabe und Dokumentation des gemessenen Körpergewichts erfolgte auf eine Nachkommastelle (Tab.11).

4.2.5 Entnahme der Knochen

Im Anschluss an die Tötung wurden die Femura der rechten und linken hinteren Extremitäten entnommen. Die Knochen wurden direkt nach der Entnahme in Gaze mit 0,9% NaCl gewickelt und bei -20 Grad eingefroren. Vor der pQCT-Analyse wurden sie in NaCl bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend gemessen.

4.2.6 Skelettparameter gemessen mit peripherer quantitativer Computertomographie

Die pQCT ist ein gängiges Verfahren zur Knochenanalyse (5). Die Technik beruht auf einem Scanner mit hohem Auflösungsvermögen. Als Strahlenquelle wird eine Röntgenröhre benutzt. Die Messungen wurden mit einem Computertomographen XCT Research SA durchgeführt (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany). Am Femur wurden vier Transversalschnitte mittels pQCT gescannt, um morphologische und strukturelle Parameter zu bestimmen. Die Dicke der Schnitte betrug 500µm bei einer Pixelgröße von 70x70µm. Die Schnitte wurden mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software ausgewertet (Version 5.50). Zur Durchführung der pQCT-Analyse wurden die Femora bei Raumtemperatur in 0,9% NaCl-Lösung aufgetaut und anschließend in einer 2ml-Kunststoffspritze gelagert. Die Spritze wurde nach Einlagerung der Knochen mit 0,9% NaCl aufgefüllt und longitudinal im pQCT auf den

Kondylen positioniert. Die identische Ausrichtung der Knochen wurde durch eine graphische Darstellung der Knochenquerschnitte nach den einzelnen Messung nochmals geprüft. Im Anschluss an die Lagerung wurde zunächst ein transversaler Übersichtsscan des Knochens angefertigt auf dessen Basis die Knochenlänge bestimmt wurde. Für die anschließende Messung wurden ausgehend von der Knochenlänge und der distalen Knochengelenklinie der Femora Messpunkte bei 15%, 17,5%, 20% und 50% bestimmt (Abb.18). An diesen Messpunkten wurde Querschnitte jedes Knochens gemessen auf deren Grundlage die computertomographische Knochendichtemessung erfolgte. Durch Mittelung der drei Messungen in Kniegelenknähe wurde ein repräsentativer Wert für die Metaphyse bestimmt. Die Diaphyse wurde durch die Messung bei 50% abgebildet. An der Metaphyse wurden folgende Knochenparameter gemessen:

- Bone Mineral Density
- Bone Mineral Content
- Bone Cross Sectional Area
- Trabecular Bone Mineral Density
- Trabecular Bone Cross Sectional Area
- Trabecular Bone Mineral Content

An der Diaphyse wurden folgende Knochenparameter gemessen:

- Cortical Bone Mineral Content
- Cortical Bone Mineral Density
- Cortical Bone Cross Sectional Area
- Cortical Thickness
- Periosteal Circumference
- Endosteal Circumference

Für die vorliegende Arbeit wurden die Knochenparameter BMC, BMCcor, BMCtrab, BMDcor, BMDtrab, BCSA, Cortical Thickness, Periosteal Circumference und Endosteal Circumference ausgewertet (Tab.3).

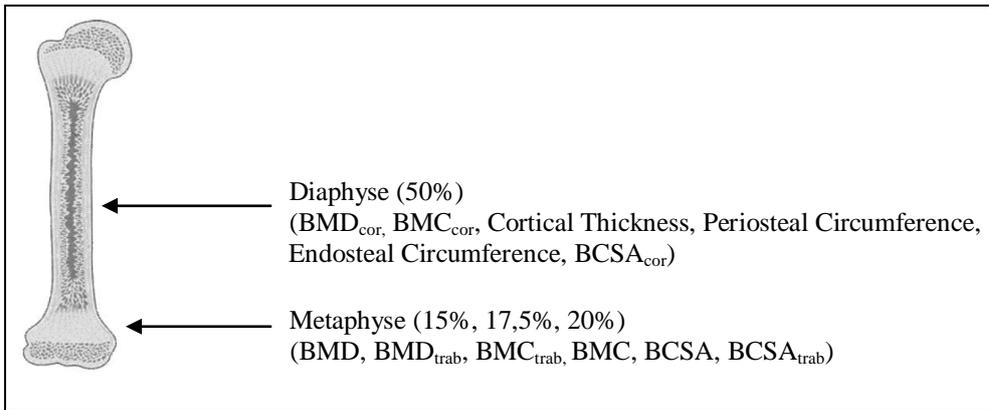


Abb.18: Messorte pQCT am rechten und linken Femur

Tab.3: Gemessene und ausgewertete Knochenparameter der vorliegenden Arbeit. Maßeinheit und biologische Bedeutung (81)

Parameter	Maßeinheit	Bedeutung
BMC	mg	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling, Modelling <u>Abhängig von:</u> Knochengröße, Dicke/Fläche der Kortikalis/Spongiosa, Anzahl Knochen trabekel, Mineralisation
BMC _{cor}	mg	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling, Modelling <u>Abhängig von:</u> Knochengröße, Dicke/Fläche der Kortikalis, Anzahl Knochen trabekel, Mineralisation
BMC _{trab}	mg	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling, Modelling <u>Abhängig von:</u> Knochengröße, Dicke/Fläche der Spongiosa Anzahl Knochen trabekel, Mineralisation
BMD _{cor}	g/cm ³	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling <u>Abhängig von:</u> Knochengröße, Anzahl Knochen trabekel, kortikale Knochenfläche, Mineralisation
BMD _{trab}	g/cm ³	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling, Modelling <u>Abhängig von:</u> Knochengröße, Anzahl Knochen trabekel, trabekuläre Knochenfläche, Mineralisation
BCSA	mm ²	<u>Biologischer Prozess:</u> Modelling periosteal, Remodelling endosteal <u>Abhängig von:</u> Durchmesser Kortikalis/Spongiosa, Knochenan-/abbau
Cortical Thickness	mm	<u>Biologischer Prozess:</u> Modelling periosteal, Remodelling endosteal <u>Abhängig von:</u> periostealer Knochenanbau, endostealer Knochenabbau
Periosteal Circumference	mm	<u>Biologischer Prozess:</u> Modelling <u>Abhängig von:</u> periostealer Knochenanbau
Endosteal Circumference	mm	<u>Biologischer Prozess:</u> Remodelling, Modelling <u>Abhängig von:</u> endostealer Knochenanbau

4.2.7 Muskelvorbereitung und Analyse der Muskelkapillarisation und des Muskelzellquerschnitts

Nach der Tötung wurde allen Tieren der M. vastus lateralis, M. gastrocnemius, M. soleus und M. plantaris entnommen und für die Analyse eingefroren. Die Aufbereitung der entnommenen Muskeln, zur Elektronenmikroskopie, wurde nach standardisierten Schritten durchgeführt. Zunächst fand eine Fixierung in PFA 4% über einen Zeitraum von 8h statt. Daran schloss sich eine OsO₄-Fixierung mit 2% igem OsO₄ an. Die Blockkontrastierung wurde mit Uranylacetat durchgeführt und nach dem Auswaschen der Proben eine Entwässerungsreihe eingeleitet. Im Anschluss wurden die Proben zunächst in Propylenoxid, dann in Araldit und zuletzt in reines Araldit überführt. Schließlich erfolgte über einen Zeitraum von zwei Stunden eine Polymerisation bei 40 Grad. Die angefertigten Blöcke mit den Muskelpräparaten wurden danach drei Tage abgekühlt. Im Anschluss wurden 500nm-Schnitte angefertigt und diese gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte auf Glasobjektträgern getrocknet und dann mit 0,5%-1% Toluidinblau gefärbt. Nach mehrmaligem Überspülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte getrocknet und abgedeckt. Nach der Trocknung wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Muskelpräparate bei 40.000facher Vergrößerung gemacht und mit einer Kamera digitalisiert. Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils 50 Muskelzellen des M. gastrocnemius der linken und rechten hinteren Extremität jeder Gruppe analysiert. Es wurden der Querschnitt (Durchmesser) der Muskelzellen gemessen (in µm) sowie die Anzahl der an eine Muskelzelle angrenzenden Kapillaren ermittelt (in Kapillaren/Zelle) (Abb.19). Es wurden die Mittelwerte für den Muskelzellquerschnitt und die Muskelkapillarisation für jede Gruppe bestimmt.

Tab.4: Gemessene Muskelparameter. Maßeinheit und biologische Bedeutung

Parameter	Maßeinheit	Bedeutung
Muskelzellquerschnitt (Durchmesser)	µm	<u>Biologischer Prozess:</u> Hypertrophie/Atrophie <u>Abhängig von:</u> Training (25, 67, 68), Wachstumsfaktoren (3), Innervation (24)
Muskelzellkapillarisation	Kapillaren/Zelle	<u>Biologischer Prozess:</u> Vaskuläres Remodelling <u>Abhängig von:</u> metabolische Beanspruchung des Muskels (7, 91), Wachstumsfaktoren (52, 91), Muskelkontraktion/Relaxation (7)

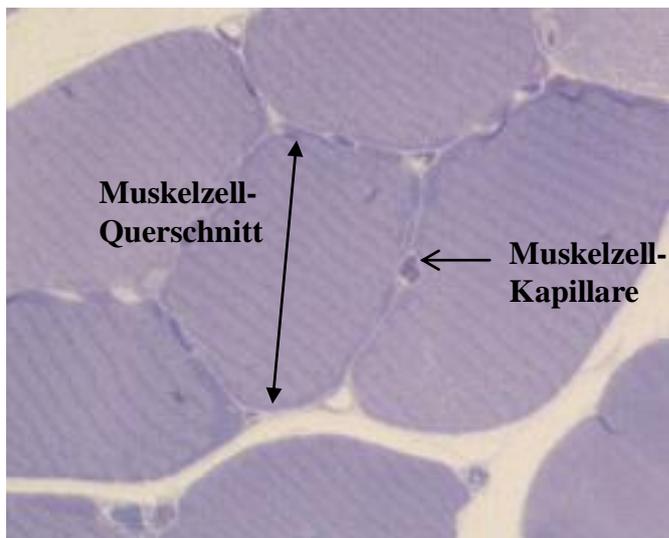


Abb.19: Muskelzelle mit Muskelzellquerschnitt und Muskelkapillare

4.2.8 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS für Windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois) Version 17.0, für Windows benutzt. Mit Methoden der deskriptiven Statistik wurden für jede untersuchte Extremität der Tiere Mittelwert und Standardabweichung für die pQCT-Parameter berechnet. Vergleiche der rechten und linken Beinseite innerhalb der Gruppen wurden mit dem Wilcoxon-Test und Vergleiche der rechten Beinseite zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede geprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen von Knochen und Muskel, sowie der Gewichts- und Mobilitätsverlauf der Tiere dargestellt.

5.1 Ergebnisse des Mobilitäts- und Gewichtsverlaufs

Das Körpergewicht der Tiere wurde an insgesamt acht Tagen im Versuchsverlauf gemessen. Die erhobenen Messwerte sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Mittelwerte sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab.6: Mittelwerte Körpergewicht der BK, KG, IM und IM+WBV im Versuchsverlauf

Versuchstag	BK	KG	IM	IM+WBV
Tag -5	22,8g	22,7g	23,5g	22,1g
Tag +1	22,7g	22,3g	24,6g	22,6g
Tag +3	-	22g	22,9g	21,6g
Tag +7	-	22,2g	22,5g	21,4g
Tag +14	-	22,3g	22,4g	21g
Tag +21	-	22,5g	22,8g	22,1g
Tag +27	-	22,6g	24g	22,5g
Tag +28	-	22,7g	23,9g	22,8g

Zu Beginn der Untersuchung (Versuchstag +1) lag das Gewicht der Tiere zwischen 21,0g und 26,2g. Am Versuchsende (Tag +27) wurde ein Gewicht zwischen 20,8g und 24,6g gemessen.

In Abbildung 20 ist das Körpergewicht der IM, KG und IM+WBV im Versuchsverlauf gegenübergestellt. Die Tiere der IM verloren zunächst bis zum Versuchstag +14 -4,89% ihres Ausgangsgewichts. Danach stieg das mittlere Körpergewicht bis zum Versuchsende wieder an, so dass die Mäuse bis zum Versuchsende annäherungsweise ihr Ausgangsgewicht erreicht hatten. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich in der IM+WBV. Die Tiere hatten bis zum Versuchstag +14 zunächst -5,11% ihres Ausgangsgewichts verloren. Danach erhöhte sich ihr Körpergewicht wieder, so dass sie am Versuchsende wieder ein Gewicht vergleichbar mit ihrem Ausgangsgewicht erreicht hatten. Das Gewicht der Tiere in der KG blieb im Versuchsverlauf weitestgehend konstant.

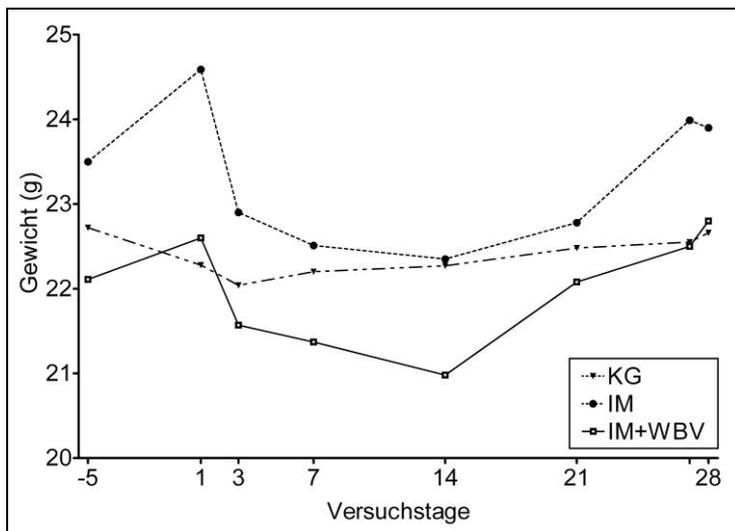


Abb.20: Mittleres Körpergewicht aller Gruppen im Versuchsverlauf

Die Mobilität der Tiere wurde an insgesamt sechs Score-Untersuchungsterminen bestimmt. In Tabelle 7 sind die MW der erreichten Punkte der KG, IM und IM+WBV an den sechs Score-Untersuchungsterminen dargestellt.

Tab.7: Mittelwerte der erreichten Punkte der KG, IM und IM+WBV im Rahmen der sechs Score-Untersuchungen

Gruppe	Tag -5	Tag +2	Tag +7	Tag +14	Tag +21	Tag +27
KG	30 Pkt.					
IM	30 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	9 Pkt.	22 Pkt.	29 Pkt.
IM+WBV	30 Pkt.	7 Pkt.	5 Pkt.	8 Pkt.	26 Pkt.	30 Pkt.

In Abbildung 21 ist die Mobilität der Tiere der IM und der IM+WBV im Versuchsverlauf gegenübergestellt. Abgebildet sind die mittleren Werte der Mobilität an den sechs Score-Untersuchungsterminen. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere beider Gruppen vollständig mobil (30 Punkte). Nach der Immobilisation sank die Mobilität in beiden Gruppen und stieg dann im weiteren Versuchsverlauf wieder an. In der IM+WBV war der Mobilitätsverlust am Versuchstag +2, +7, +21 und +27 weniger stark ausgeprägt, als in der IM. Am Ende hatte die IM eine Mobilität von 29 Punkten und die IM+WBV von 30 Punkten.

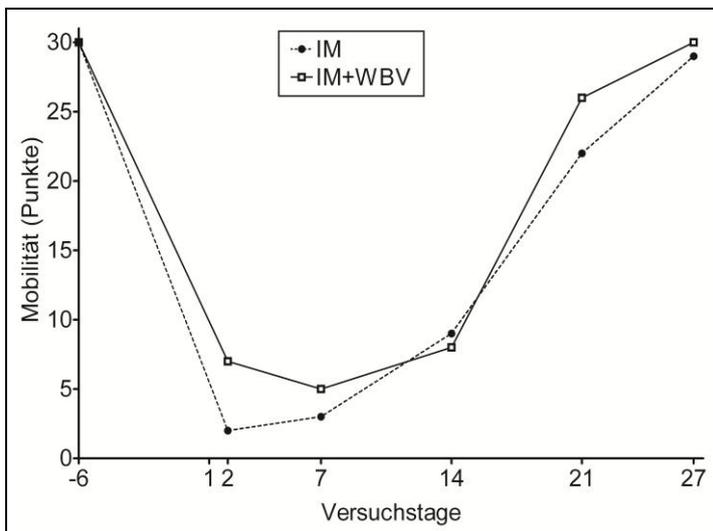


Abb.21: Mobilität der IM- und IM+WBV im Versuchsverlauf

Die Mobilität der Tiere in den einzelnen Gruppen stellte sich wie folgt dar:

- Kontrollgruppe

Die Tiere der KG waren im gesamten Versuchsverlauf vollständig mobil und erreichten bei allen sechs Score-Untersuchungen 30 Punkte.

- Immobilisationsgruppe

Zu Beginn der Versuchsreihe waren die Tiere der IM vollständig mobil (30 Punkte; 100% Ausgangsmobilität). Sie wurden am Versuchstag 0 mit BTX immobilisiert. In der Score-Untersuchung am Versuchstag +2 hatte sich die Mobilität auf einen mittleren Punktwert von 2 Punkten verringert (7% der Ausgangsmobilität). Bis zum Versuchstag +7 war die Mobilität auf 3 Punkte (10% der Ausgangsmobilität) angestiegen. Am Versuchstag +14 wurde die Mobilität der Tiere wieder mit 9 Punkten (30% der Ausgangsmobilität) gemessen. Bis um Versuchstag +21 war sie weiter bis auf 22 Punkte angestiegen (73% der Ausgangsmobilität). Am Versuchstag +27 hatte die IM eine Mobilität von 29 Punkten wiedererlangt (97% der Ausgangsmobilität).

In Abbildung 22 sind die Mobilität und das Gewicht der IM im Versuchsverlauf gegenübergestellt. Während die Mobilität bis zum Versuchstag +2 von 30 Punkten auf 2 Punkte abfiel, stieg das Körpergewicht der Tiere bis zum Versuchstag +1, zunächst von 23,5g auf 24,6g an. Im weiteren Verlauf gewannen die Tiere wieder an Mobilität zurück, hingegen reduzierte sich das Körpergewicht zwischen dem Versuchstag +1 von 24,9g bis auf 22,4g am Versuchstag +14. Erst danach stieg auch das Gewicht der Tiere wieder parallel zum Anstieg der Mobilität an.

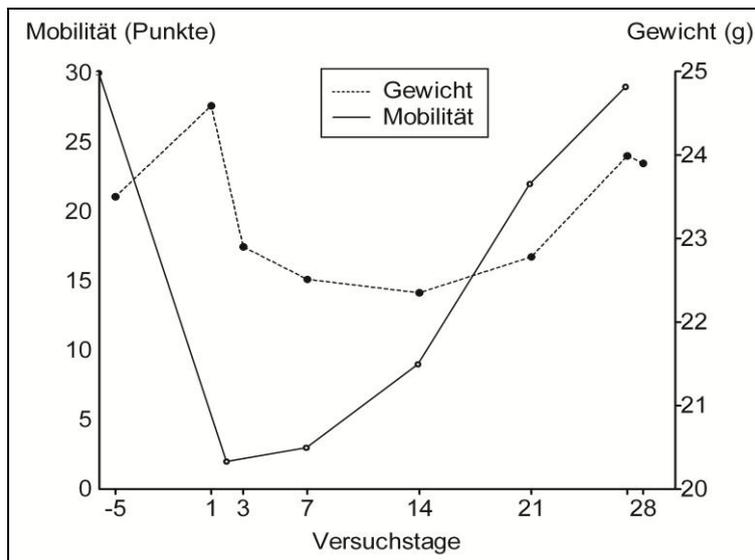


Abb.22: Mobilität und Gewicht der IM im Versuchsverlauf

- Immobilisation+Whole-Body-Vibration-Gruppe

Die Tiere der IM+WBV waren zu Beginn der Versuchsreihe vollständig mobil (30 Punkte). Im Mittel erreichten sie am Versuchstag +2, 7 Punkte (23% der Ausgangsmobilität). Bis zum Versuchstag +7 verringerte sich die Mobilität bis auf 5 Punkte (17% der Ausgangsmobilität). Am Versuchstag +14 erreichten die Tiere 8 Punkte (27% der Ausgangsmobilität) und bis zum Versuchstag +21 wieder 26 Punkte (88% der Ausgangsmobilität). Am Versuchstag +27 hatte die IM+WBV eine Mobilität von 30 Punkten (100% der Ausgangsmobilität) zurückerlangt.

In Abbildung 23 sind die Mobilität und das Gewicht, der IM+WBV im Versuchsverlauf gegenübergestellt. Zusätzlich sind die Tage, an denen das WBV durchgeführt wurde markiert. Die Mobilität der Tiere war initial von 30 Punkten (Versuchstag -6) bis auf 7 Punkte (Versuchstag +2) abgefallen. Hingegen stieg das Körpergewicht von 22,1g (Versuchstag -5) auf 22,6g (Versuchstag +1) an. Bis zum Versuchstag +7 war die Mobilität weiter bis auf 5 Punkte gesunken und auch das Gewicht sank bis auf 22,5g. Im Zeitraum von Versuchstag +2 bis zum Versuchstag +4 wurden die Tiere erstmalig dem WBV unterzogen. Zwischen dem Versuchstag +7 und +14 stieg die Mobilität wieder von 5 auf 8 Punkte an. Das Gewicht reduzierte sich im gleichen Zeitraum von 22,5g auf 22,4g. Vom Versuchstag +7 bis +11 fand das zweite WBV statt. Ab dem Versuchstag +14 bis zum Versuchende stiegen dann Gewicht und Mobilität der Tiere kontinuierlich bis zum Versuchende an.

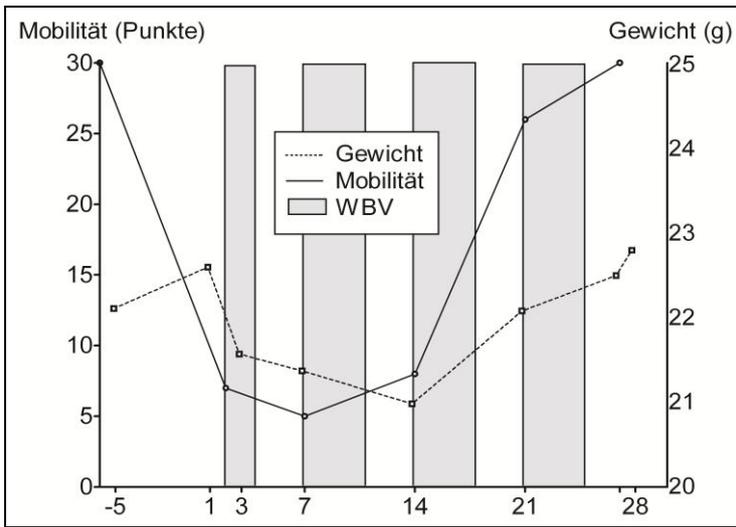


Abb.23: Mobilität und Gewicht und WBV der IM+WBV im Versuchsverlauf

5.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels peripherer quantitativer Computertomographie

In Abbildung 24-32 werden BMC, BMD_{trab} , BMD_{cor} , BMC_{cor} , BMC_{trab} , Cortical Thickness, Periosteal Circumference, Endosteal Circumference und BCSA der BK, KG, IM und der IM+WBV gegenübergestellt. Abgebildet sind die $MW \pm SD$ beider Seiten, die dazugehörigen Zahlenwerte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab.8: Dargestellt sind BMC, BMC_{trab} , BMC_{cor} , BMD_{trab} , BMD_{cor} , BCSA, Cortical Thickness, Periosteal Circumference und Endosteal Circumference des linken und rechten Femurs der BK, KG, IM, IM+WBV; gerundete Werte, $MW \pm SD$

** Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur KG*

° Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur BK

+ Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen linker und rechter Extremität

		BK	KG	IM	IM+WBV
<i>Metaphyse</i>					
BMC (mg)	links	1,7 ± 0,05	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,13
	rechts	1,7 ± 0,09	1,6 ± 0,09	1,5 ± 0,11*+°	1,6 ± 0,11
BMC_{trab} (mg)	links	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02
	rechts	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,02°	0,1 ± 0,02°	0,1 ± 0,01°
BMD_{trab} (mg/cm ³)	links	142,7 ± 14,99	108,2 ± 8,35	112,8 ± 13,29	126,7 ± 19,34
	rechts	150,4 ± 19,16	115,4 ± 13,51°	96,2 ± 11,21*+°	107,4 ± 10,75°
BCSA (mm ²)	links	3,8 ± 0,07	3,8 ± 0,18	3,8 ± 0,18	3,7 ± 0,13
	rechts	3,9 ± 0,15	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,15	3,9 ± 0,14
<i>Diaphyse</i>					
BMD_{cor} (mg/cm ³)	links	1117,8 ± 15,72	1144,4 ± 28,97	1135,4 ± 20,26	1165,7 ± 8,76
	rechts	1126,7 ± 15,04	1156,2 ± 9,84°	1121,4 ± 20,26*	1137,7 ± 31,95
BMC_{cor} (mg)	links	0,9 ± 0,04	1 ± 0,06	1 ± 0,06	1,1 ± 0,03
	rechts	1 ± 0,04	1 ± 0,05	0,9 ± 0,08+	1 ± 0,05
Cortical Thickness (mm)	links	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,005	0,2 ± 0,005
	rechts	0,2 ± 0,005	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,005+	0,2 ± 0,005
Periosteal Circumference (mm)	links	5,1 ± 0,06	5 ± 0,09	5 ± 0,12	5 ± 0,08
	rechts	5,1 ± 0,11	5 ± 0,10	5,1 ± 0,14	5 ± 0,09
Endosteal Circumference (mm)	links	3,9 ± 0,08	3,8 ± 0,09	3,8 ± 0,11	3,7 ± 0,11
	rechts	3,9 ± 0,08	3,8 ± 0,11	3,9 ± 0,11+	3,8 ± 0,09

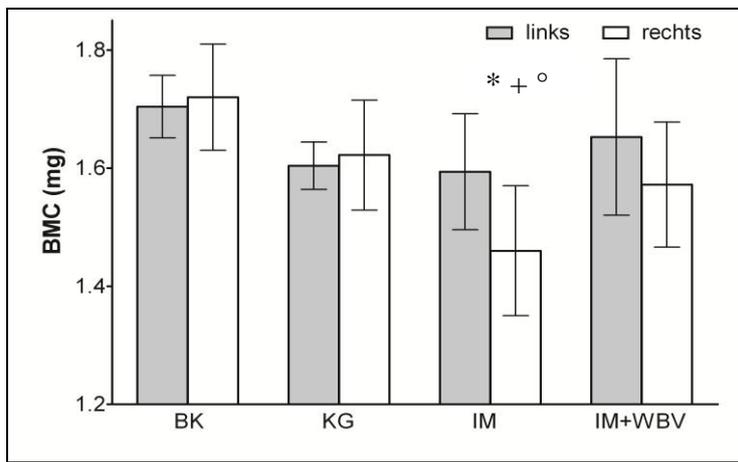


Abb.24: BMC der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

* Statistisch signifikanter Unterschied zur KG ($p=0,047$)

+ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Extremität ($p=0,042$)

° Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,009$)

Der BMC der IM war auf der rechten Seite im Vergleich zur KG, zur BK und zur linken Extremität signifikant erniedrigt. Auf der linken Seite der IM+WBV war der BMC gegenüber der IM erhöht. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

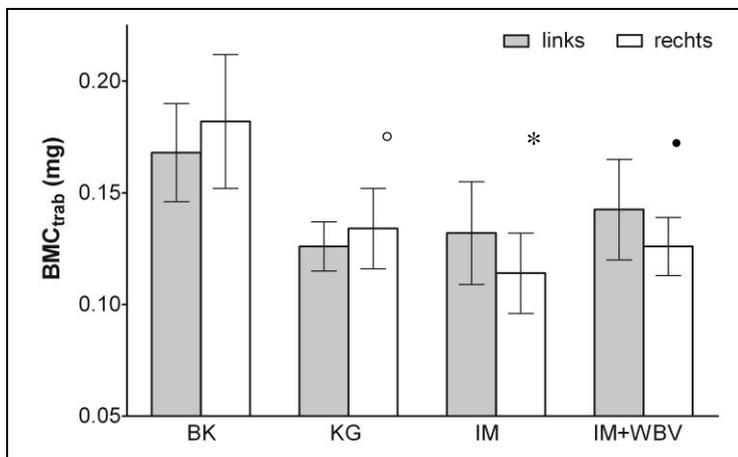


Abb.25: BMC_{trab} der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

° Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,023$)

* Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,008$)

• Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,012$)

Der BMC_{trab} war auf der rechten Seite der Gruppen KG, IM und IM+WBV im Vergleich zur BK signifikant erniedrigt. Auf beiden Seiten war der BMC_{trab} in der IM+WBV größer als in der IM sowie auf der linken Seite in der IM+WBV größer als auf der linken Seite in der KG. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

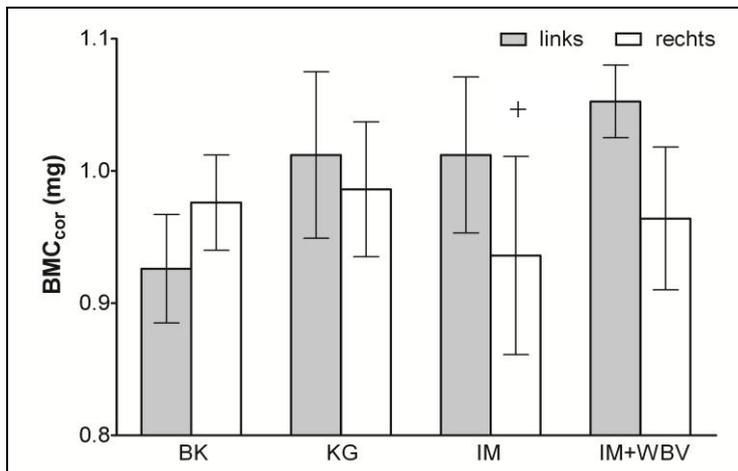


Abb.26: BMC_{cor} BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind die $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

+ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Extremität ($p=0,041$)

Der BMC_{cor} der linken und rechten Extremität fiel in der BK am niedrigsten aus. Die höchsten Werte zeigten sich auf der linken Seite der IM+WBV. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Der geringste BMC_{cor} wurde auf der rechten Seite der IM gemessen. Im Vergleich zur linken Extremität war er signifikant erniedrigt.

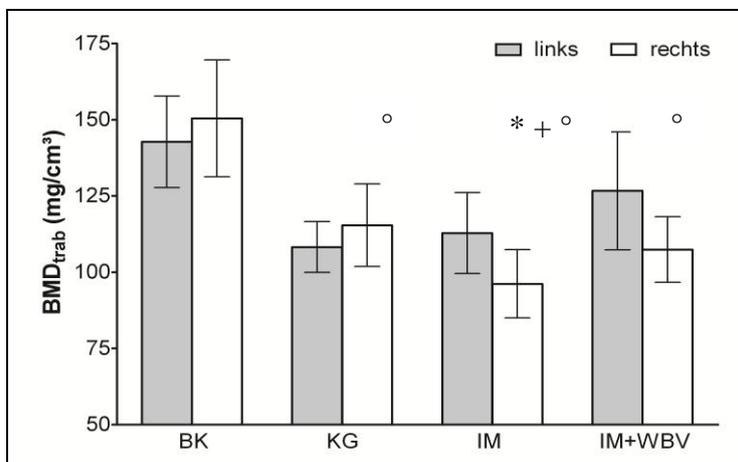


Abb.27: BMD_{trab} der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind die $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

* Statistisch signifikanter Unterschied zur KG ($p=0,047$)

+ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Extremität ($p=0,043$)

° Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,009$)

Die BMD_{trab} der linken und rechten Extremität war in der BK am größten. In der IM war die BMD_{trab} auf der rechten Seite im Vergleich zur rechten Seite der KG signifikant

erniedrigt. Auf beiden Seiten der IM+WBV war die BMD_{trab} im Vergleich zur IM größer. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

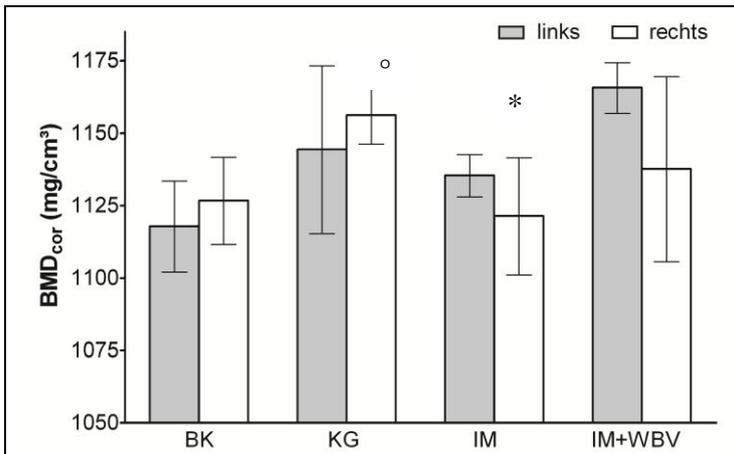


Abb.28: BMD_{cor} der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind die $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

* Statistisch signifikanter Unterschied zur KG ($p=0,047$)

^o Statistisch signifikanter Unterschied zur BK ($p=0,009$)

In der IM war die BMD_{cor} auf der rechten Seite gegenüber der rechten Seite der KG signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). In der KG war die BMD_{cor} auf der rechten Seite gegenüber der rechten Seite der BK signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Auf der rechten Seite war die BMD_{cor} in der IM+WBV im Vergleich zur rechten Seite der KG kleiner. Die höchste BMD_{cor} wurde auf der linken Seite in der IM+WBV gemessen. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

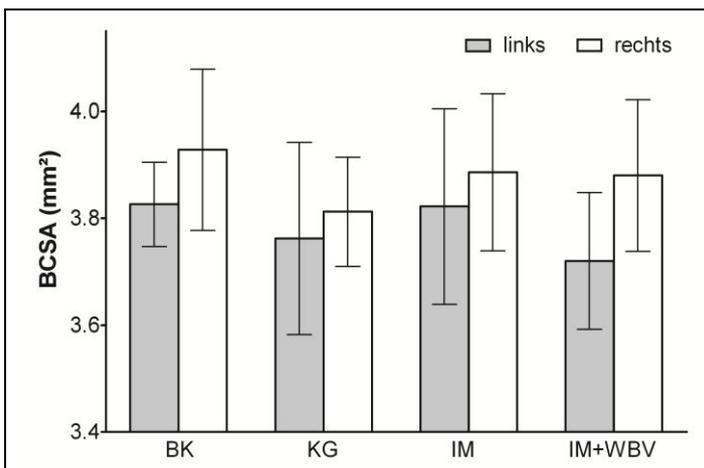


Abb.29: BCSA der BK, KG, IM und IM+WBV; Dargestellt sind die $MW \pm SD$ des linken und rechten Femurs

Die BCSA der linken und rechten Extremität war in der BK am größten und auf der linken Seite der IM+WBV am kleinsten. In der IM war die BCSA auf beiden Seiten

größer als in der KG und als in der IM+WBV. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

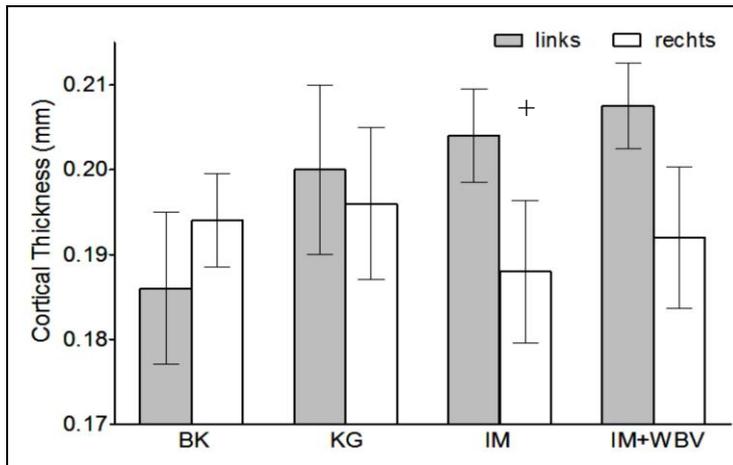


Abb.30: Cortical Thickness der BK, KG, IM und IM+WBV; Dargestellt sind die MW±SD des linken und rechten Femurs
+ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Extremität (p=0,038)

Die kortikale Dicke war auf der rechten Seite im Vergleich zur linken Seite in der IM signifikant verringert (p<0,05). In der IM+WBV war die kortikale Dicke auf der rechten Seite größer als auf der rechten Seite der IM sowie auf der linken Seite im Vergleich zu allen Gruppen am größten. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

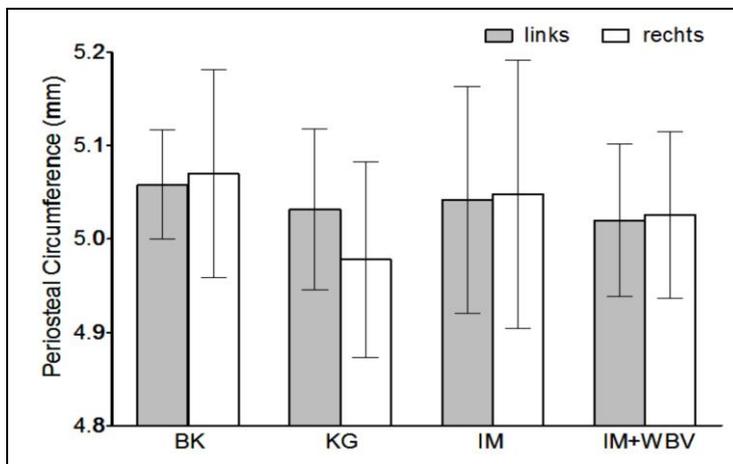


Abb.31: Periosteal Circumference der BK, KG, IM und IM+WBV; Dargestellt sind die MW±SD des linken und rechten Femurs

Der periosteale Umfang der IM war auf beiden Seiten größer als in der KG und der IM+WBV. Bei allen Gruppen war sie auf beiden Seiten im Vergleich zur BK erniedrigt. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

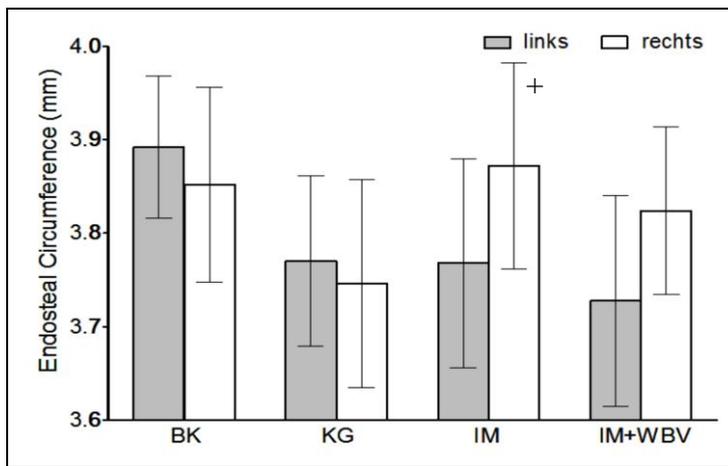


Abb.32: Endosteal Circumference der BK, KG, IM und IM+WBV; Dargestellt sind die MW±SD des linken und rechten Femurs
+ Statistisch signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Extremität ($p=0,042$)

Der endosteale Umfang war auf der linken Seite in der KG, IM und IM+WBV im Vergleich zur BK kleiner. Auf der rechten Seite war der endosteale Umfang in der IM größer als in der IM+WBV und der KG. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Im Vergleich zur linken Seite war der endosteale Umfang auf der rechten Seite in der IM signifikant erhöht. Die Abbildung 33 zeigt pQCT-Aufnahmen von Transversalschnitten (distale 17,5% Knochenlinie) des rechten Femurs der KG der IM und der IM+WBV. Die Aufnahmen geben einen Hinweis darauf, dass sich die Dicke der Kortikalis in der IM im Vergleich zur KG und zur IM+WBV verringert hatte.

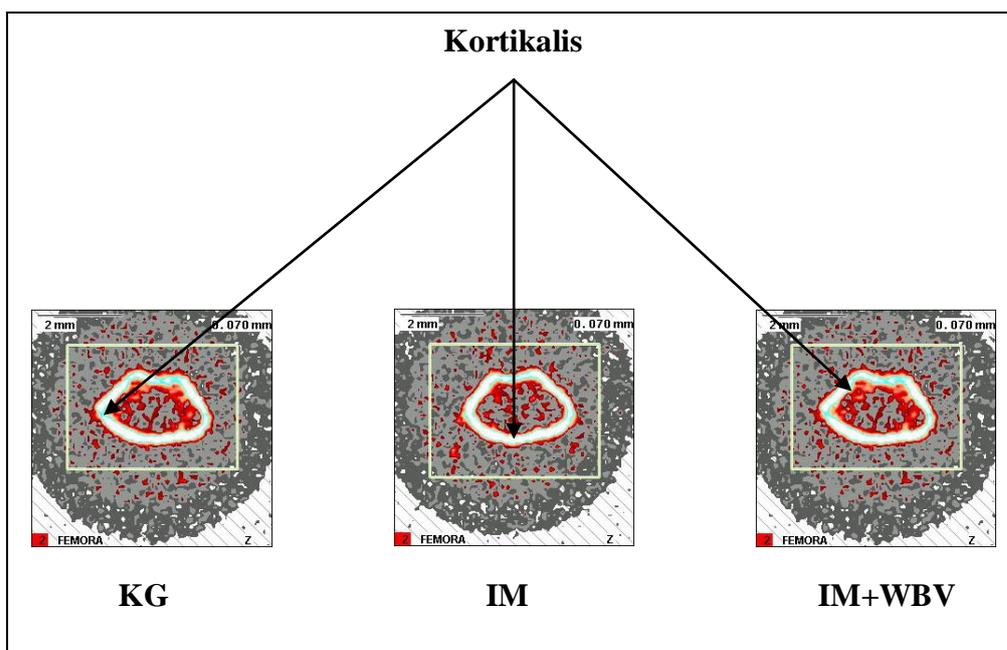


Abb.33: Transversalschnitte des rechten Femurs der hinteren Extremität der KG, IM und IM+WBV; distale Femur 17,5%-Linie

5.3 Ergebnisse der Muskeluntersuchungen

In Abbildung 34 und 35 sind die aus den digitalisierten mikroskopierten Bildern ermittelten Querschnitte der Muskelzellen und die Kapillarisation pro Muskelzelle der BK, KG, IM und der IM+WBV gegenübergestellt. Abgebildet sind die MW von jeweils 50 Muskelzellen des linken und des rechten M. gastrocnemius. Die dazugehörigen Zahlenwerte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab.9: MW der Muskelzellquerschnitte und der Muskelkapillarisation von 50 Muskelzellen des linken und rechten M. gastrocnemius aller Gruppen

		BK	KG	IM	IM+WBV
Muskelkapillarisation (Kapillaren/Zelle)	links	2,5	2,4	2,9	3,2
	rechts	2,5	3,2	2,9	4,0
Muskelzellquerschnitt (μm)	links	32,8	32,6	32,6	35,2
	rechts	32,8	32,5	30,6	30,9

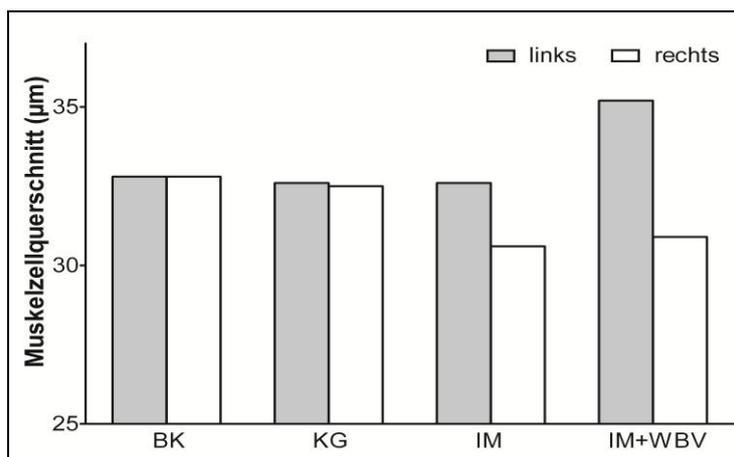


Abb.34: Muskelzellquerschnitte der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind die MW von 50 Muskelzellen des linken und rechten M. gastrocnemius

Die Muskelzellquerschnitte der IM und der IM+WBV hatten im Vergleich zur KG und BK auf der rechten Seite abgenommen. Der größte Muskelzellquerschnitt aller Gruppen wurde in der IM+WBV auf der linken Seite gemessen.

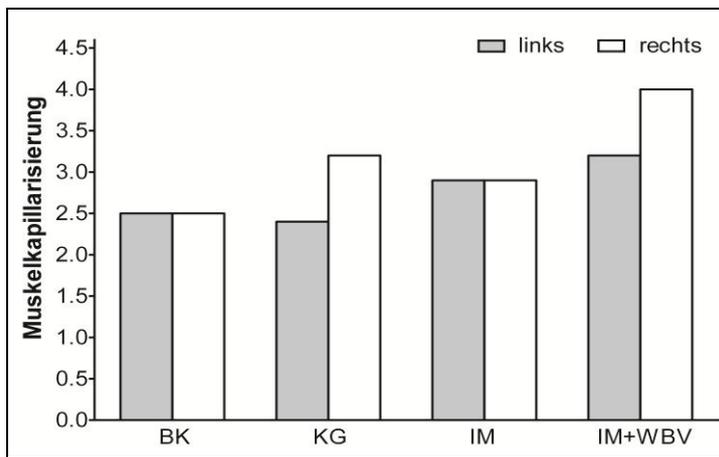


Abb.35: Muskelkapillarisation des *M. gastrocnemius* der BK, KG, IM, IM+WBV; Dargestellt sind die MW der Kapillaranzahl von 50 Muskelzellen des linken und rechten *M. gastrocnemius*

Die Muskelkapillarisation war in der IM+WBV auf der linken und der rechten Seite, im Vergleich zu den anderen Gruppen am größten. Die Kapillarisation der IM war auf der linken Seite im Vergleich zur KG größer und auf der rechten Seite kleiner. In der IM und der BK entsprach die Muskelkapillarisation der rechten Seite der Muskelkapillarisation der gruppeneigenen linken Seite. In der KG und IM+WBV war jeweils die Muskelkapillarisation der rechten Seite größer, als die Muskelkapillarisation der gruppeneigenen linken Seite. In Tabelle 10 sind die prozentualen Veränderungen von Kapillarisation und der Muskelzellquerschnitte der rechten Seite der IM und der IM+WBV im Vergleich zur KG dargestellt. Die Kapillarisation in der IM war um -9,4% geringer als in der KG, hingegen hatte sich die Kapillarisation in der IM+WBV um +25% im Vergleich zur KG erhöht. Die Muskelzellquerschnitte waren in der IM um -5,8% und in der IM+WBV um -4,9% kleiner als in der KG. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab.10: Muskelkapillarisation und Muskelzellquerschnitt der IM und IM+WBV im Vergleich zur KG (rechte hintere Extremität)

Gruppe	Muskelkapillarisation	Muskelzellquerschnitt
IM	- 9,4%	- 5,8%
IM+WBV	+ 25%	- 4,9%

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie ihrer Art, in der in einem Mausmodell die Zusammenhänge von Immobilisation, WBV sowie Knochen- und Muskelparametern untersucht wurden. Die Darstellung der Effekte eines WBV auf Knochen und Muskel bei durch BTX immobilisierten Mäusen erfolgt erstmalig.

In der Vergangenheit sind in der tierexperimentellen Erforschung des muskuloskelettalen Systems Immobilisationsmodelle wie Hindlimb-Suspension, neurale Dissektion und Tenotomie eingesetzt worden. Ein neueres und bislang weniger untersuchtes Verfahren ist die Immobilisation mit Botulinumtoxin. Aufgrund der Tierschutzbestimmungen und der besseren Durchführbarkeit wurde ein Modell mit BTX gewählt.

Hinsichtlich der Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sind verschiedene Limitationen zu beachten. Es handelt sich um eine Studie mit einer nur geringen Anzahl von untersuchten Tieren, so dass die Ergebnisse in erster Linie als Hinweise für potentielle Veränderungen zu verstehen sind. Zwar sind Untersuchungen mit Mäusen ein gängiges Verfahren in der muskuloskelettalen Forschung, dennoch ist nicht klar ob die Ergebnisse aufgrund von Strukturunterschieden gegenüber dem menschlichen Organismus übertragbar sind. So nimmt beispielsweise die Differenzierung und die Komplexität von Knochengewebe erst mit zunehmender Körpergröße und Lebensspanne bei Säugetieren zu (33). Daher ist zu berücksichtigen, dass sich die histologische Knochenstruktur von Mäusen mit der Struktur von menschlichen Röhrenknochen aufgrund der kürzeren Lebensspanne und der geringeren Körpergröße der Tiere nur bedingt miteinander vergleichen lässt, und somit auch die Ergebnisse der Untersuchung nur annäherungsweise auf den Menschen übertragbar sind. Auch berücksichtigt werden muss als technische Einschränkung der pQCT-Untersuchung der partielle Volumeneffekt (64). Voxel die bei der pQCT-Analyse nicht vollständig mit demselben Knochengewebe ausgefüllt sind, beeinflussen die Auswertung eines Knochenanteils. Der partielle Volumeneffekt betrifft vor allem die Untersuchung an kleine Knochenflächen (48).

6.1 Gewichtsverlauf

Es wird vermutet, dass das Körpergewicht von Tieren in einem unmittelbaren Zusammenhang mit ihrem Gesundheitszustand steht. Reduziert sich das Gewicht innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden um mehr als 10%, so könnte dies Zeichen

einer gesundheitlichen Beeinträchtigung sein (45). Weder in der hier vorliegenden Arbeit, noch in den bisher in der Literatur beschriebenen Studien, in denen eine Immobilisierung von Tieren mit Botulinumtoxin erfolgte, wurde ein Verlust des Körpergewichts in einer solchen Größenordnung beobachtet. Im Rahmen einer Untersuchung mit Botulinumtoxin A immobilisierten Mäusen kam es zu einem signifikanten Gewichtsverlust in der Interventionsgruppe. Die Tiere verloren bis zum 14. Versuchstag -5,5% ihres Ausgangsgewichts. Bis zum 21. Versuchstag hatten sie aber wieder ihr ursprüngliches Körpergewicht erreicht (100). Auch in einer Untersuchung mit Hasen, die mit Botulinumtoxin A immobilisiert worden waren, zeigte sich nach anfänglichem Gewichtsverlust im weiteren Verlauf eine vergleichbare Gewichtszunahme in der Interventions- und Kontrollgruppe (60). Manske et al. untersuchten das Körpergewicht von Botulinumtoxin immobilisierten Mäusen und stellten ebenfalls fest, dass die Tiere der Botulinumtoxin-Gruppe zunächst an Gewicht verloren. Der weitere Gewichtsverlauf der Tiere entsprach dann wieder dem der Kontrollgruppe (40). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Ergebnisse in der Literatur. Auch die Tiere der IM und der IM+WBV verloren nach der BTX-Immobilisation zunächst geringfügig an Gewicht (IM: -4,89% ihres Ausgangsgewichts, IM+WBV: -5,11% ihres Ausgangsgewichts). Ab dem 14. Versuchstag erhöhte sich das Gewicht wieder. Am Versuchsende hatten alle Tiere ihr Ausgangsgewicht nahezu wieder erreicht. Eine Immobilisation führt zum Verlust von Muskelmasse bei Mäusen und Menschen (42, 97). Demnach ist es möglich, dass der Grund für die Reduzierung des Körpergewichts der Tiere in den Interventionsgruppen ein immobilisationsbedingter Muskelmassenverlust war. Da das Körpergewicht in der KG im Versuchsverlauf nahezu konstant blieb, scheinen Wachstumseffekte für die Gewichtsschwankungen in den Interventionsgruppen nicht verantwortlich gewesen zu sein. Auch über direkte Effekte von Botulinumtoxin auf das Körpergewicht ist bislang nichts bekannt. Der Hersteller des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Medikaments gibt keine Beeinflussung des Körpergewichts bei einer i.m. Anwendung an. Allerdings beziehen sich diese Angaben auf die Verwendung einer vergleichsweise geringeren Dosierung beim Menschen, die nicht auf die Immobilisation einer Extremität ausgerichtet ist. Ein weiterer Faktor, der im Bezug auf den Gewichtsverlauf der Tiere berücksichtigt werden muss, ist das WBV. Zum Zusammenhang von körperlicher Aktivität und der Veränderung des Körpergewichts bei Tieren finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Es sind Reduzierungen, Erhöhungen oder keine Veränderungen des Gewichts beschrieben. Diese Unterschiede beruhen jedoch häufig auf dem unterschiedlichen Geschlecht und

dem Alter der Tiere, oder in Variationen der Belastungsparameter (49). Ob ein WBV das Körpergewicht beeinflussen kann, ist derzeit noch unklar. Zwar moduliert WBV den Energieverbrauch, inwieweit eine längerfristige Anwendung auch das Körpergewicht beeinflussen kann, ist nicht geklärt (56). In einer Studie mit Ratten zeigte sich, dass WBV zu einer Reduzierung des Körperfettanteils und des Körpergewichts beiträgt (39). Hingegen wurde bei untrainierten Frauen, die 24 Monate regelmäßig an einem WBV teilnahmen, weder die Abnahme des Körpergewichts noch des Körperfettanteils beobachtet (67). Es bleibt daher nicht auszuschließen, dass WBV in dieser Arbeit auch zum anfänglichen Gewichtsverlust der Tiere in der IM+WBV beigetragen hat. Da die Tiere der IM+WBV aber trotz Training ab dem 14. Versuchstag wieder an Gewicht zunahmten, lässt sich vermuten, dass WBV nicht ausschließlich hierfür verantwortlich gewesen ist. Außerdem zeigten auch die Tiere der nicht-vibrierten IM einen vergleichbaren Gewichtsverlauf wie die vibrierten Tiere, was darauf hinweist, dass vor allem die Immobilisation den Gewichtsverlauf beeinflusst hat. Es ist zudem bekannt, dass stressbedingte Gewichtsverluste in tierexperimentellen Untersuchungen auftreten können. Insbesondere dann, wenn den Tieren vor Versuchsbeginn nicht genügend Zeit zur Akklimation gelassen wird (51). Die Akklimationszeit wurde für die vorliegende Studie deshalb in einer Vorstudie unter Beobachtung des Körpergewichts getestet und angepasst. Die Tiere hatten ausreichend Zeit, um sich an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen. Trotzdem kann auch die Immobilisation selbst zur Stresserzeugung bei den Tieren beitragen. In einer Studie mit Hindlimb-Suspension immobilisierten Ratten wurde die Menge von Stresshormonen im Urin der Tiere untersucht. In den ersten drei Tagen nach der Immobilisation wurde eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Corticosteroiden und Katecholaminen gemessen, was darauf hindeutet, dass es durch die Immobilisation zu einer Stressreaktion der Tiere gekommen war (34). Ob die Immobilisation mit Botulinumtoxin einen vergleichbaren Stresseffekt hat, wurde bislang noch nicht untersucht. In den täglichen Routinekontrollen während dieser Studie zeigten die Tiere keine Auffälligkeiten in ihrem Verhalten. Die Gründe für den Gewichtsverlauf in den Interventionsgruppen lassen sich demzufolge nicht eindeutig benennen. So könnten Muskelmassenverlust, BTX, WBV oder Stressfaktoren zur anfänglichen Reduzierung des Körpergewichts beigetragen haben.

6.2 Mobilitätsverlauf

Eine Mobilitätsbeobachtung im Zusammenhang mit einer BTX-Immobilisation und WBV, ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben worden. Auch während tierexperimentellen Untersuchungen mit anderen Immobilisationsverfahren wie Hindlimb-Suspension, Tenotomie oder neuraler Dissektion wurde die Mobilität der Tiere noch nicht untersucht. Dies begründet sich zum Teil in der Invasivität dieser Verfahren, durch die ein Wiedererlangen der Mobilität weitestgehend ausgeschlossen ist (30). Die Tiere der KG waren im gesamten Versuchsverlauf vollständig mobil. Bei den Tieren der IM und der IM+WBV war die Mobilität unmittelbar im Anschluss an die Immobilisation deutlich reduziert. Bis zum Versuchsende hatten beide Gruppen annäherungsweise wieder ihr ursprüngliches Mobilitätsniveau erreicht (IM: erreichten wieder 97% ihrer Ausgangsmobilität, IM+WBV: erreichten 100% ihrer Ausgangsmobilität). Dieser Verlauf entspricht nur zum Teil den bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, bei denen die Tiere allerdings keinem WBV unterzogen wurden. Bei immobilisierten Tieren zeigte sich ebenfalls ein Verlust der Mobilität unmittelbar nach der Anwendung von Botulinumtoxin. Ab dem 14. Versuchstag nach der Immobilisation stieg die Mobilität dieser Tiere langsam wieder an. Im Gegensatz zu den Tieren, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, erreichten sie nur wieder annäherungsweise 60% ihrer Ausgangsmobilität (95). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen liegt in den variierenden Dosierungen des Botulinumtoxins, sowie in Unterschieden im Versuchsaufbau. So wurden in dieser Studie auch einige Kriterien des Mobilitätsscores modifiziert. Es zeigte sich als Trend, dass die Mobilität der IM+WBV am Versuchsanfang weniger stark abfiel und der Funktionsverlust dieser Tiere geringer war als in der IM. Ab dem Versuchstag +14 wiesen die Tiere in der IM+WBV zudem einen schnelleren Zuwachs an Mobilität bis zum Versuchsende auf, wo dann aber beide Gruppen wieder ein vergleichbares Niveau erreicht hatten. Es kann daher vermutet werden, dass das WBV einen positiven Effekt auf den Mobilitätsverlauf hatte. Das WBV die Mobilität bei bestimmten Patientengruppen positiv beeinflussen kann, wurde in der Vergangenheit bereits gezeigt (1, 8). Es ist auch bekannt, dass durch WBV die Propriozeption und die neuromuskuläre Effizienz verbessert werden kann (6). Neben dem WBV könnten physiologische Regenerationsprozesse der Muskulatur und Nebenwirkungen des BTX als weitere Faktoren den Verlauf der Mobilität der Tiere beeinflusst haben. Bei einer Botulinumtoxin-Anwendung wird angenommen, dass es zu einer Blockade der Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte der Muskulatur kommt. In der

Literatur ist beschrieben, dass es in Abhängigkeit der Dosis zur Regeneration und Neubildung von Synapsen kommen kann (18). Dadurch erlangt die zuvor inhibierte Muskulatur ihre Funktion zurück. Diese Regenerationsprozesse können dann wiederum schon frühzeitig einen Einfluss auf die Mobilität haben. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie kam es auch in den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen bereits zwei Wochen nach der Immobilisation wieder zu einer Steigerung der Mobilität. Nach vier Wochen hatten die Tiere wieder einen Großteil ihrer Ausgangsmobilität zurückerlangt (26, 95). So lässt sich vermuten, dass auch physiologische Regenerationsprozesse neben dem WBV den Mobilitätsverlauf mitbeeinflusst haben.

6.3 Veränderung der Knochenparameter durch Immobilisation und Whole-Body-Vibration

6.3.1 Vergleich der Kontrollgruppe mit der Basiskontrollgruppe und der Immobilisationsgruppe

Abgesehen von der kortikalen Dicke, BMC_{cor} und BMD_{cor} waren die übrigen Knochenparameter erwartungsgemäß in der BK am größten. Da sich diese kortikalen Parameter nicht nur gegenüber den Interventionsgruppen sondern auch im Vergleich zur KG kleiner darstellten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass physiologische Wachstumsprozesse der Tiere in der KG, IM und IM+WBV hierfür die Ursache waren. So kommt es im Rahmen der Knochenlängenentwicklung zu einer Vergrößerung der Hebelkräfte (77). In Folge nimmt im weiteren Entwicklungsverlauf auch die auf den Knochen einwirkende Muskelkraft zu wodurch wiederum die Knochenfestigkeit steigt (59). Mit Ausnahme der BCSA fielen in der IM alle anderen Knochenparameter niedriger aus, als in der KG. Der BMC sowie die BMD_{trab} und die BMD_{cor} waren dabei in der IM signifikant kleiner, als in der KG. Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch eine Immobilisation mit BTX zum Knochenabbau kommt. Die Beobachtungen entsprachen denen, wie man sie auch bei osteoporotischen Knochenveränderungen findet. Ein gesteigerter periostealer Anbau führt zu einer Zunahme der Knochenquerschnittsfläche. Gleichzeitig ist das endosteale Remodelling derart verändert, dass der Abbau überwiegt und es kommt so zu einer Negativbilanz hinsichtlich des Knochenan-/abbaus - die endosteale Knochenstruktur ist reduziert (85). Durch einen gesteigerten periostealen Knochenanbau und die Vergrößerung der BCSA versucht der Knochen seine Festigkeit und seine Stabilität, die durch den endostealen Abbau abnehmen, zu erhalten (84). Dieselben Veränderungen wurden bei den Tieren der IM beobachtet. Auf der rechten

Seite kam es durch die Immobilisierung zur Abnahme von BMC, BMC_{trab} , BMC_{cor} und BMD_{trab} . Das Modelling und Remodelling des Knochens waren durch die Immobilisierung gestört. Hingegen waren die Periosteal Circumference und die BCSA, als Ausdruck der Kompensation des endostealen Knochenabbaus, durch einen periostealen Knochenanbau auf der rechten Seite größer als in der KG und der IM+WBV. Die Cortical Thickness war verringert, was ebenfalls häufig im Rahmen von osteoporotischen Knochenveränderungen vorkommt (85). Der Zusammenhang einer Botulinumtoxin-Immobilisation, dem Knochenmineralgehalt und dem Knochendichteverlust wurde bislang bei Mäusen und Hasen untersucht (29, 66, 100). Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden durch die BTX-Immobilisation, die auf den Knochen einwirkenden Muskelkräfte inhibiert und so die funktionelle Beanspruchung des Knochens reduziert. Die Mobilität der Tiere fiel unmittelbar nach der Injektion von BTX deutlich ab. Das Alltagsverhalten der Tiere war stark beeinträchtigt. Aktivitäten wie Klettern, Laufen und Stehen waren nicht mehr möglich, oder sie fielen den Tieren sehr schwer. Die Rückkoppelungsschleife zwischen mechanischer Verformung des Knochens durch die einwirkende Muskelkraft und die daraus resultierende Adaptation der Knochenfestigkeit war bei den Tieren in den Interventionsgruppen gestört. Der Knochenmineralgehalt und die Knochendichte verringerten sich. Andere tierexperimentelle Studien konnten den Verlust der Knochenfestigkeit durch eine Immobilisation bereits nachweisen (14, 30, 74). Allerdings wurden in diesen Arbeiten Immobilisationsmodelle wie Hindlimb-Suspension, Tenotomie oder neurale Dissektion eingesetzt. Bei dem häufig durchgeführten Hindlimb-Suspension-Immobilisationsmodell wird das Hinterteil der Tiere so angehoben, dass der vordere Körperanteil in eine 30° Kopftief-Position gelangt. Das Tier wird in dieser Position dauerhaft fixiert, so dass eine Gewichtsbelastung der hinteren Extremität nicht mehr möglich ist (45). Dieses Immobilisationsverfahren unterscheidet sich im Aufbau zu dem in dieser Studie angewandten BTX-Modell, bei dem sich die Tiere trotz der Immobilisation weiterhin frei in ihrem Stall bewegen konnten. Die Immobilisation mit BTX im Tiermodell ist eine Methode zur Untersuchung von Inaktivitätsprozessen an Knochen und Muskulatur. Obwohl die Tiere, in der vorliegenden Arbeit, im Versuchsverlauf nicht durchgehend vollständig immobil waren, sondern wieder an Mobilität hinzugewannen, zeigten sich in der IM deutliche Unterschiede in der Knochenstruktur im Vergleich zu den Tieren der KG. Dies spricht dafür, dass die gewählte Dosierung des BTX ausreichend war, um eine das muskuloskelettale System beeinflussende Inaktivität zu simulieren ohne die Tiere

der Gefahr einer systemischen Überdosierung auszusetzen. Die Tiere beider Interventionsgruppen wurden im Versuchsverlauf wieder zunehmend mobiler und ihre Muskelfunktion wurde besser. Es wird vermutet, dass es dosisabhängig zu einer Regeneration des Muskels nach einer Botulinumtoxin-Injektion kommen kann (18). So stellte sich im Tiermodell die Muskelgröße 8 bis 18 Wochen nach Botulinumtoxin-Injektion wieder als normal dar (21, 30). Besteht eine längere Immobilisierung durch Hindlimb-Suspension und wird diese dann aufgehoben, regenerieren der Knochen und die Muskulatur der Tiere ebenfalls wieder (2). Physiologische Regenerationsmechanismen scheinen somit auch bei den Tieren der IM und IM+WBV in der vorliegenden Untersuchung eine Rolle gespielt zu haben. Auch in den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen wurden die Tiere im Versuchsverlauf wieder zunehmend mobiler (95). Im Gegensatz zur Steigerung der Mobilität beanspruchen die regenerativen Prozesse von Muskeln und Knochen nach einer Botulinumtoxin-Immobilisation allerdings weitaus mehr Zeit (26). Über die Hintergründe dieser Regenerationsvorgänge im Zusammenhang mit einer Botulinumtoxin-Immobilisation ist bislang noch wenig bekannt.

6.3.2 Vergleich der Kontrollgruppe mit der Immobilisations+Whole-Body-Vibration-Gruppe

Die Analyse der Knochenparameter der IM+WBV zeigte, dass es in dieser Gruppe keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur KG gab. Weder der Knochenmineralgehalt noch die Knochendichte waren in der IM+WBV signifikant verringert. Die IM+WBV wurde, anders als die IM, einem regelmäßigen WBV unterzogen. In der IM+WBV wurde durch das WBV ein wie in der IM zu beobachtender Knochenabbau kompensiert. In der Vergangenheit wurden tierexperimentelle Studien zur Untersuchung der Effekte eines WBV und einer Immobilisation vor allem im Hindlimb-Suspension Tiermodell durchgeführt. So wurde an adulten Mäusen untersucht, ob Vibrationsreize dem Knochenabbau während einer Hindlimb-Suspension entgegenwirken können (54). Im Vergleich zur immobilisierten und nicht-vibrierten Kontrollseite war die Knochenfestigkeit auf der vibrierten Seite der Tiere größer. Gegenüber einer nicht-immobilisierten und nicht-vibrierten Kontrollgruppe zeigte sich, dass insbesondere der trabekuläre Knochenanteil durch die Vibrationsreize stabiler wurde. Rubin et al. untersuchten Hindlimb-Suspension-immobilisierte Ratten, die ein Vibrationstraining durchführten und stellten fest, dass die Knochenmineralisationsrate durch die Vibrationsreize erhöht werden konnte (72). Allerdings deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass Vibrationsreize bei nicht-

immobilisierten Tieren keinen Effekt auf die Knochenfestigkeit haben. Gesunde Tiere, die außer einer Vibration keiner anderen Intervention ausgesetzt waren, zeigten nach einer fünfwöchigen Versuchsdauer keine Veränderungen am Knochen (11, 38). Diese Ergebnisse entsprechen auch den Untersuchungen mit humanen Probanden. So ist in der Literatur beschrieben, dass nur bestimmte Gruppen, wie beispielsweise ältere Menschen oder aktivitätseingeschränkte Patienten von einem Vibrationstraining profitieren (56, 58). Das Tiermodell in der vorliegenden Arbeit sollte einen Inaktivitätszustand simulieren, um zu untersuchen, ob WBV dem Knochenabbau bei krankheitsbedingter Inaktivität entgegenwirken kann, wie man ihn beispielsweise auch bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta oder Cerebralpareesen findet. Bei den immobilisierten Tieren in der vorliegenden Arbeit spielte dabei WBV zur Verbesserung der Knochenstruktur eine entscheidende Rolle. Die genaue Wirkungsweise der Vibrationsreize wird derzeit weiter diskutiert (56). Es ist bekannt, dass die durch Muskelaktivität ausgelösten Verformungen einen wichtigen Stimulus zur Adaptation des Knochens darstellen (79). In der IM+WBV war der Mobilitätsverlust der Tiere bis zum Versuchstag +14 weniger stark ausgeprägt, als in der IM, so dass weiterhin eine Stimulation des Knochens durch Bewegung stattfinden konnte. Durch Botulinumtoxin wird die Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte unterbrochen und die Muskelfunktion gehemmt (18). Die funktionelle Belastung des Knochens war reduziert und so kam es bei den Tieren der IM, die keinem WBV ausgesetzt wurden, zum Knochenabbau. Das WBV hatte trotz der Hemmung der Muskelfunktion einen positiven Einfluss auf die Mobilität und die Knochengometrie der Tiere der IM+WBV. Auch die Schwerkraft, die trotz der BTX-Immobilisation weiterhin auf die Tiere einwirkte, kann eine Rolle bei der Knochenadaptation und der Verhinderung des Knochenverlustes gespielt haben. Da aber beide Interventionsgruppen dieser gleichermaßen ausgesetzt waren und der Knochenabbau nur bei den Tieren in der IM+WBV gemindert werden konnte, scheint WBV der wichtigere Faktor für den Knochenhalt gewesen zu sein. Wäre die Schwerkraft alleinige Ursache, dann wäre zu erwarten gewesen, dass sich die IM und die IM+WBV gleichermaßen im Hinblick auf die Knochenstruktur entwickelt hätten.

Es lässt sich sagen, dass der immobilisationsbedingte Knochenverlust durch WBV in der IM+WBV gemindert werden konnte. Bei krankheitsbedingten Mobilitätsverlusten im Erwachsenen-, Kindes- und Jugendalter scheint ein Training mit WBV demnach eine sinnvolle Therapieergänzung zu sein, um einem inaktivitätsbedingten Knochenabbau entgegenzuwirken.

6.3.3 Vergleich der Immobilisationsgruppe mit der Immobilisation+Whole-Body-Vibration-Gruppe

Die Tiere der IM hatten mit Ausnahme der BCSA, im Vergleich zur IM+WBV, niedrigere Werte in allen übrigen Knochenparametern. Am deutlichsten waren die Unterschiede von BMC, BMC_{trab} und BMD_{trab} . Die Verringerung der trabekulären Knochenparameter äußerte sich in der Reduzierung des BMC. Auch der BMC_{cor} und die BMD_{cor} waren in der IM verringert, allerdings fielen diese Unterschiede kleiner aus. Die BCSA war in beiden Gruppen ähnlich und größer als in der KG. Durch den Vergleich der beiden Gruppen wird einerseits die Auswirkung von Inaktivität auf den Knochen und andererseits die Kompensationsmöglichkeit der Inaktivitätsfolgen durch WBV deutlich. Bei den in der Literatur beschriebenen Immobilisationsmodellen sind die Prozesse, die zu einem Knochenverlust führen nicht in jedem Modell gleich. So kommt es beispielsweise bei der Hindlimb-Suspension zu einer Kombination aus einer verminderten Osteoblasten- und einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität am Knochen. Hingegen führt eine Immobilisation durch Neurotomie in erster Linie zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität und einem weitaus schwerwiegenderem Knochenabbau (55). Die Literaturergebnisse bezüglich einer Botulinumtoxin-Immobilisation und den Veränderungen am Knochen sind unterschiedlich. So ist beschrieben, dass es zur Reduzierung endostaler Knochenflächen und der trabekulären Knochenstruktur kommt, während der kortikale Knochen nur wenig beeinflusst wird (95). Rauch et al. beobachteten hingegen, dass der Knochenverlust primär aus einer Abnahme der periostalen Knochenanlagerung resultiert (60). Poliachik et al. stellten nach einer Botulinumtoxin A Immobilisation von Mäusen sowohl einen kortikalen als auch einen trabekulären Knochenverlust fest. Der trabekuläre Knochenverlust vollzog sich schneller und war am 12. Tag nach Injektion am größten (55). Bedingt durch Unterschiede in der Botulinumtoxin-Dosierung, dem Studiendesign oder anderer Faktoren variiert das Ausmaß des Knochenabbaus in den in der Literatur beschriebenen Arbeiten. In der vorliegenden Arbeit betraf der Knochenabbau bei den Tieren der IM insbesondere den trabekulären Knochenanteil, wenngleich auch die kortikale Knochendichte, der kortikale Knochenmineralgehalt und die Cortical Thickness des Knochens reduziert waren. Die IM+WBV hatte im Gegensatz zur IM deutlich höhere trabekuläre Knochenwerte sowie einen größeren BMC und eine größere kortikale Dicke. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Knochen auf die Stimulation mit Vibrationsreizen mit einer Zunahme der trabekulären Dichte und des trabekulären

Volumens adaptiert. Dabei spielen individuelle Faktoren wie Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand eine wichtige Rolle hinsichtlich der Effektivität des Vibrationstrainings (63, 65, 76). Man weiß, dass eine verringerte Knochendichte zu einem erniedrigten Knochenmineralgehalt führt und dass die Knochenfestigkeit abhängig von der Knochendichte, dem Knochenmineralgehalt und von der Knochengeometrie ist (79). Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit ist dies ein Hinweis darauf, dass die Knochenfestigkeit der Tiere in der IM insgesamt geringer war, als die der Tiere in der IM+WBV. Die Stabilität eines Knochens erhöht sich bekanntermaßen durch einen größeren Knochenquerschnitt (79). Die BCSA war in der IM auf der rechten Seite minimal größer als in der IM+WBV und deutlich größer als in der KG. Da gleichzeitig aber die kortikale Dicke kleiner und der peri-/endosteale Umfang größer waren als in der IM+WBV, ist dies ein Hinweis darauf, dass die erhöhte BCSA der IM Ausdruck eines periostealen Knochenanbaus war, um die Knochenstabilität durch eine Vergrößerung des Knochenquerschnitts zu erhalten. Körperliches Training und Vibrationstraining können ebenfalls dazu beitragen den Knochenquerschnitt zu erhöhen (34, 105). In der IM+WBV war die BCSA auf der rechten Seite größer als in der KG. Auch die kortikale Dicke war im Vergleich zur IM größer. Ein Training mit Vibrationsreizen kann zu einer Vergrößerung der kortikalen Dicke führen (23). Der endosteale Umfang war in der IM+WBV kleiner als in der IM. In der Literatur ist beschrieben, dass es durch ein Training zu einer Erhöhung der kortikalen Dicke mit gleichzeitiger Abnahme des endostealen Umfangs kommen kann (96). Neben dem größeren BMC, BMC_{trab} und BMC_{cor} sowie der größeren BMD_{trab} und BMD_{cor} sind auch eine erhöhte kortikale Dicke, bei gleichzeitiger Abnahme des endostealen Umfangs, als ein wichtiger Hinweis auf die vermehrte Knochenfestigkeit in der IM+WBV gegenüber der IM zu werten.

6.4 Muskelparameter

Vergleicht man den Muskelzellquerschnitt der IM und der IM+WBV mit dem der KG, so stellt man fest, dass der Querschnitt auf der mit BTX behandelten Seite der Interventionsgruppen kleiner war. Die Ergebnisse zeigen, dass die Immobilisation zu einer Verringerung des Muskelzellquerschnitts geführt hat. Das WBV konnte den Muskelzellquerschnitt auf der nicht immobilisierten Seite steigern, jedoch auf der immobilisierten Seite die Abnahme nicht verhindern. Bekannt ist, dass die Muskelzellenquerschnittsfläche und die Muskelkraft durch WBV und Training vergrößert werden können (28, 72, 73). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

bestätigen die bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen, bei denen das Vibrationstraining einen positiven Effekt auf gesunde Muskulatur hatte. So reagiert die Muskulatur der Tiere in der IM+WBV auf der nicht-immobilisierten Seite mit einer Zunahme des Muskelzellquerschnitts. Da es durch die Anwendung von BTX zu einer Störung der neuronalen Erregungsübertragung am Muskel kommt, ist zu vermuten, dass es dadurch bedingt, trotz eines Trainings mit WBV nicht zu einer Vergrößerung des Muskelzellquerschnitts kommen konnte. Auf der nicht-immobilisierten Seite hingegen wurde in der IM+WBV der größte Muskelzellquerschnitt festgestellt. Hier war die Erregungsübertragung an der Muskulatur ungestört und das WBV konnte so eine Vergrößerung des Muskelzellquerschnitts erwirken. Möglicherweise hat die Immobilisation mit BTX auch noch einen direkten abbauenden Effekt auf die Muskulatur. So ist beschrieben, dass es infolge einer i.m. Botulinumtoxin-Injektion bei Mäusen und bei gesunden Erwachsenen zu einer Abnahme der Muskelquerschnittsfläche kommen kann (40, 83). Die Kapillarisation der Muskulatur hatte in der IM+WBV im Vergleich zur KG und IM auf beiden Seiten zugenommen. Körperliches Training erhöht die Kapillarisation an einem aktiven Muskel. Bedingt durch eine vaskuläre Adaptation kommt es zur Zunahme des Blutflusses und durch die Erhöhung der Sauerstoffaustauschkapazität kann die Leistungsfähigkeit der Muskulatur gesteigert werden (62). Über den Zusammenhang vom Vibrationstraining und Muskelkapillarisation lassen sich in der Literatur nur wenige Untersuchungen finden, und die Ergebnisse sind unterschiedlich. So werden sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Kapillarisation beschrieben (46, 88). Entgegen den Beobachtungen von Murfee et al., die eine signifikante Abnahme der Muskelkapillarisation nach einem Vibrationstraining feststellten (46), führte das WBV in der vorliegenden Studie zu einer Steigerung der Kapillarisation auf der immobilisierten und auf der nicht-immobilisierten Seite. Es wird diskutiert, ob die gesteigerte Kapillarisation der durch WBV beanspruchten Muskeln, gleichermaßen eine Adaptation auf die vermehrte Beanspruchung darstellt (88). Inwieweit eine i.m. Injektion von Botulinumtoxin einen direkten Einfluss auf die Kapillarisation der Muskulatur hat, wurde bislang noch nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass die Kapillarisation durch BTX nicht beeinflusst wird, denn sie bleibt bei den Tieren der IM auf beiden Seiten gleich und entspricht der Kapillarisation der KG. Denkbar wäre zudem, dass es durch physiologische Regenerationsmechanismen in Folge der BTX-Immobilisation zu einem erhöhten Sauerstoff- und Perfusionsbedarf der Muskulatur kommt, mit daraus resultierender gesteigerter Kapillarisation. In dieser Hinsicht wäre

dann aber auch eine erhöhte Kapillarisation in der IM zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war.

6.5 Muskel-Knochen Interaktion

Das WBV konnte in dieser Studie trotz der inhibierten Muskelfunktion einen immobilisationsbedingten Knochenabbau verhindern. Judex et al. untersuchten Mäuse, die lokalen Vibrationsreizen unterzogen wurden. Die Tiere wurden dafür in eine spezielle Vorrichtung eingespannt und mit 45 Hz (bei einer Akzeleration von 0,3g oder 0,6g) jeweils zehn Minuten pro Tag vibriert. Während der Durchführung des WBV wurden die Mäuse anästhesiert, so dass keine Muskelaktivität möglich war. Nach einem Zeitraum von drei Wochen war die trabekuläre Knochenneuf ormation auf der vibrierten Seite 88% größer als auf der nicht vibrierten Seite (32). Die Autoren folgerten daraus, dass Vibrationsreize unabhängig von der muskulären Knochenstimulation auch direkt auf den Knochen wirken können. Christiansen et al. untersuchten in einem ähnlichen Versuchsaufbau die Effekte von Vibrationsreizen auf das muskuloskelettale System von Mäusen. Sie konnten aber im Gegensatz zu Judex et al. keine anabole Wirkung der Vibration auf den Knochen bei den anästhesierten Tieren feststellen (11). Osteozyten können auf Vibrationsreize direkt reagieren (90). In erster Linie führen Vibrationsreize mit Akzelerationen von mehr als 1g zu Knochenverformungen und begünstigen damit die Adaptation des Knochens. Im Gegensatz dazu lassen sich durch geringer dosierte Vibrationsreize (<1g) keine Knochenverformungen auslösen (32). Es lässt sich demnach vermuten, dass die Vibration nicht nur durch die Knochenverformung zur Knochenadaptation beitragen kann, sondern auch durch andere bislang noch ungeklärte Mechanismen. Würde die Muskulatur keine Rolle bei der Adaptation des Knochens auf die Vibrationsreize spielen, wäre zu erwarten gewesen, dass in dieser Studie zwischen linker und rechter Seite der IM+WBV keine Unterschiede bei den Knochenparametern bestehen, was jedoch nicht der Fall war. Es zeigten sich auf der nicht-immobilisierten Seite ein größerer BMC, BMC_{cor} und BMC_{trab} . Auch die BMD_{trab} und BMD_{cor} waren auf der nicht-immobilisierten Seite größer als auf immobilisierten Seite, wo die Muskelfunktion gehemmt war. Ein direkt hemmender Effekt von Botulinumtoxin auf Osteozyten ist nicht bekannt. Möglicherweise kommt es infolge der Vibrationsreize deshalb durch die ungestörte Muskel-Knochen-Interaktion auf der nicht-immobilisierten Seite der IM+WBV zu den größten Veränderungen von BMC, BMC_{cor} , BMC_{trab} und der kortikalen Dicke im Vergleich zur IM und KG. Es ist zudem ein Trainingsphänomen beschrieben - das sogenannte „Overflow“-Phänomen. Im Rahmen eines Trainings

lassen sich hierbei Trainingseffekte auch an der Muskulatur anderer, nicht unmittelbar trainierter Extremitäten und Körperteile, feststellen. Dies wird als Overflow bezeichnet (43, 51). Bezogen auf die Tiere der IM+WBV bedeutet dies, dass ein WBV möglicherweise durch Overflow auch auf der immobilisierten Seite einen Trainingseffekt induziert hat, der dazu beigetragen hat den Abbau von Knochen und Muskulatur zu mindern. Falls es eine direkte und muskelunabhängige Reaktion der Osteozyten auf die Vibrationsreize geben sollte, so scheint diese durch eine intakte Muskelfunktion zusätzlich verstärkt zu werden. Die nicht-immobilisierte, vibrierte Seite der IM+WBV zeigte, ausgenommen vom BCSA, die höchsten Werte bei den Knochenparametern im Vergleich zur IM und zur KG. In der Vergangenheit wurde beobachtet, dass es nach Botulinumtoxin-Immobilisation wieder zur Regeneration von Muskulatur und Knochen kommen kann. Dabei regenerieren Knochen und Muskulatur von Beginn an parallel. Das heißt, es bedarf nicht zunächst einer muskulären Regeneration, damit auch der Knochen wieder regenerieren kann (40). Die Autoren vermuten, dass einige Muskelanteile (Low-Twitch Fasern) schneller regenerieren und diese Partialfunktion der Muskulatur bereits ausreicht, um den Knochen zu stimulieren. Auch bei den Tieren in der vorliegenden Arbeit, die mit BTX immobilisiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ähnliche muskuläre Mechanismen als Folge der Regeneration dazu beigetragen haben den Knochenabbau zu vermindern. Möglicherweise wurden diese physiologischen Regenerationsprozesse durch das WBV noch zusätzlich begünstigt. Dass die Muskulatur durch WBV beeinflusst wurde, zeigte die erhöhte Kapillarisation in der IM+WBV. Auf der immobilisierten Seite war die Kapillarisation am größten. Dies könnte zum einen Ausdruck der Regenerationsmechanismen in Folge der BTX-Immobilisation sein. Zum anderen reagierte auch die nicht immobilisierte, vibrierte Muskulatur mit einer Zunahme der Kapillarisation, so dass dies ein WBV-bedingter Effekt zu sein scheint.

7 Zusammenfassung

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass die Muskelfunktion und die Knochengometrie in einer engen Beziehung zueinander stehen. Funktionelle Belastungen des Bewegungsapparates stellen einen wichtigen Stimulus für Wachstum und Entwicklung des muskuloskelettalen Systems dar. Verschiedene Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter gehen mit einer eingeschränkten Mobilität und einem sekundären Knochen- und Muskelabbau einher. Ziel der Arbeit war es Adaptationsmechanismen von Knochen, Muskulatur und Mobilität in einem Tier-Immobilisationsmodell während eines Trainings mit Whole-Body-Vibration zu untersuchen. Hierfür wurden die morphologischen und strukturellen Veränderungen verschiedener Knochenparameter des Femurs bei Clostridium botulinum Toxin Typ A-immobilisierten Mäusen mittels peripherer quantitativer Computertomographie analysiert sowie der Muskelzellquerschnitt und die Muskelzellapillarisation des M.gastrocnemius bestimmt. Die Mobilität der Tiere, die mit Hilfe eines Scores beurteilt wurde, war bei den Tieren in den Interventionsgruppen nach der Immobilisation stark vermindert. Bei den Tieren, die dem Whole-Body-Vibration-Training unterzogen wurden, zeigte sich im Versuchsverlauf ein weniger stark ausgeprägter Mobilitätsverlust als bei den Tieren in der immobilisierten aber nicht-vibrierten Gruppe. Die Immobilisierung führte in der nicht-vibrierten Immobilisationsgruppe zum Knochenabbau, zu einer Vergrößerung der Knochenquerschnittsfläche, zur Verringerung der Mobilität und zur Reduzierung des Muskelzellquerschnitts. In der Immobilisations+Whole-Body-Vibration-Gruppe waren Knochendichte und Knochenmineralgehalt gegenüber der Immobilisationsgruppe größer und im Vergleich zur Kontrollgruppe fand kein signifikanter Knochenabbau statt. Das Whole-Body-Vibration-Training führte darüberhinaus zu einer gesteigerten Kapillarisation der Muskulatur auf beiden Seiten sowie zu einer Zunahme des Muskelzellquerschnitts auf der nicht-immobilisierten Seite. Die größten Effekte durch Whole-Body-Vibration auf Muskel und Knochen wurden auf der nicht-immobilisierten Seite erzielt.

Mit dieser Arbeit konnte das Adaptationspotential des muskuloskelettalen Systems auf mechanische Vibrationsreize bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der Prävention von sekundären Knochenerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen ein Whole-Body-Vibration-Training eine sinnvolle Therapieergänzung zur Verbesserung von Mobilität und Knochengometrie sowie zur Verhinderung eines sekundären Knochenabbaus darstellen kann.

8 Literaturverzeichnis

1. Ahlborg L, Andersson C, Julin P. Whole-body vibration training compared with resistance training: effect on spasticity, muscle strength and motor performance in adults with cerebral palsy. *J Rehabil Med* 38 (5): 302-8, 2006.
2. Allen MR, Hogan HA, Bloomfield SA. Differential bone and muscle recovery following hindlimb unloading in skeletally mature male rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6 (3): 217-25, 2006.
3. Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, McLafferty CL, Jr., Urban RJ. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (3): E383-90, 2001.
4. Berg Fvd. *Angewandte Physiologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 1999.
5. Binkley TL, Berry R, Specker BL. Methods for measurement of pediatric bone. *Rev Endocr Metab Disord* 9 (2): 95-106, 2008.
6. Bosco C, Iacovelli M, Tsarpela O, Cardinale M, Bonifazi M, Tihanyi J, Viru M, De Lorenzo A, Viru A. Hormonal responses to whole-body vibration in men. *Eur J Appl Physiol* 81 (6): 449-54, 2000.
7. Brown MD, Hudlicka O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6 (1): 1-14, 2003.
8. Bruyere O, Wuidart MA, Di Palma E, Gourlay M, Ethgen O, Richey F, Reginster JY. Controlled whole body vibration to decrease fall risk and improve health-related quality of life of nursing home residents. *Arch Phys Med Rehabil* 86 (2): 303-7, 2005.
9. Cardinale M, Soiza RL, Leiper JB, Gibson A, Primrose WR. Hormonal responses to a single session of whole body vibration exercise in elderly individuals. *British journal of sports medicine*, 2008.
10. Chilibeck PD, Sale DG, Webber CE. Exercise and bone mineral density. *Sports Med* 19 (2): 103-22, 1995.
11. Christiansen BA, Kotiya AA, Silva MJ. Constrained tibial vibration does not produce an anabolic bone response in adult mice. *Bone* 45 (4): 750-9, 2009.
12. Christiansen BA, Silva MJ. The effect of varying magnitudes of whole-body vibration on several skeletal sites in mice. *Ann Biomed Eng* 34 (7): 1149-56, 2006.
13. Deacon RMJ, Thomas CL, Rawlins JNP, Morley BJ. A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice. *Behavioural brain research* 179 (2): 239-247, 2007.
14. Dehority W, Halloran BP, Bikle DD, Curren T, Kostenuik PJ, Wronski TJ, Shen Y, Rabkin B, Bouraoui A, Morey-Holton E. Bone and hormonal changes induced by skeletal unloading in the mature male rat. *Am J Physiol* 276 (1 Pt 1): E62-9, 1999.
15. Diekmann D. Einfluß horizontaler mechanischer Schwingungen auf den Menschen. *Internationale Zeitschrift für angewandte Physiologie* (17): 83-100, 1957.
16. Diekmann D. Einfluß vertikaler mechanischer Schwingungen auf den Menschen. *Internationale Zeitschrift für angewandte Physiologie* (16): 519-564, 1957.
17. Dressler D. *Botulinum-Toxin-Therapie ; 12 Tabellen*. Stuttgart: Thieme, p. 116, 1995.
18. Dressler D. Pharmakologische Aspekte therapeutischer Botulinum-Toxin-Präparationen. *Der Nervenarzt* 77 (8): 912-921, 2006.

19. Eklund G, Hagbarth KE. Normal variability of tonic vibration reflexes in man. *Experimental neurology* 16 (1): 80-92, 1966.
20. Frost HM. The laws of bone structure. Springfield, Ill.,: C.C. Thomas, p. xiii, 167 p., 1964.
21. Frost HM, Ferretti JL, Jee WS. Perspectives: some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanostat in skeletal physiology, disease, and research. *Calcif Tissue Int* 62 (1): 1-7, 1998.
22. Garman R, Gaudette G, Donahue L-R, Rubin C, Judex S. Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (6): 732-740, 2007.
23. Garman R, Gaudette G, Donahue LR, Rubin C, Judex S. Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation. *J Orthop Res* 25 (6): 732-40, 2007.
24. Gordon T, Tyreman N, Raji MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci* 31 (14): 5325-34.
25. Goto K, Nagasawa M, Yanagisawa O, Kizuka T, Ishii N, Takamatsu K. Muscular adaptations to combinations of high- and low-intensity resistance exercises. *J Strength Cond Res* 18 (4): 730-7, 2004.
26. Grimston SK, Silva MJ, Civitelli R. Bone loss after temporarily induced muscle paralysis by Botox is not fully recovered after 12 weeks. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 444-60, 2007.
27. Hedrich HJ, Bullock G. The laboratory mouse. Reprinted. ed. Amsterdam [u.a.]: Elsevier, Acad. Press, p. XVI, 600 S., 2008.
28. Huppelsberg J, Walter K, Huckstorf C, Gusta M, Gusta P. *Kurzlehrbuch Physiologie : 42 Tabellen ; [Medi-Learn Gütesiegel]. 3., überarb. Aufl.* ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme, p. XIV, 404 S., 2009.
29. Jankovic J, Brin MF. Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle & nerve. Supplement* 6: S129-45, 1997.
30. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (3): 193-207, 2001.
31. Jones G. Growth, children, and fractures. *Curr Osteoporos Rep* 2 (3): 75-8, 2004.
32. Judex S, Rubin CT. Is bone formation induced by high-frequency mechanical signals modulated by muscle activity? *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10 (1): 3-11.
33. K.Hoerner KL, M.Holtzmann. Vergleich der histologischen Struktur der Kompakta der langen Röhrenknochen bei Maus, Hamster, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund während der Altersentwicklung. *Anatomia, Histologia, Embryologia* (26): 289-295, 1997.
34. Kanda K, Omori S, Yamamoto C, Miyamoto N, Kawano S, Murata Y, Matsui N, Seo H. Urinary excretion of stress hormones of rats in tail-suspension. *Environ Med* 37 (1): 39-41, 1993.
35. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2009 ; [für Studium und Praxis ; Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2008, Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, umfassende Dosierungen]. 17. Aufl.* ed. Pulheim: [Selbstverl.], p. 1293 S., 2009.
36. Klinker R, Silbernagl S, Bauer C. *Lehrbuch der Physiologie : 55 Tabellen. 4., korrigierte Aufl.* ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme, p. XIII, 842 S., 2003.
37. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl.* ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme, p. XVII, 644 S., 2009.

38. Lynch MA, Brodt MD, Silva MJ. Skeletal effects of whole-body vibration in adult and aged mice. *J Orthop Res* 28 (2): 241-7.
39. Maddalozzo GF, Iwaniec UT, Turner RT, Rosen CJ, Widrick JJ. Whole-body vibration slows the acquisition of fat in mature female rats. *Int J Obes (Lond)* 32 (9): 1348-54, 2008.
40. Manske SL, Boyd SK, Zernicke RF. Muscle and bone follow similar temporal patterns of recovery from muscle-induced disuse due to botulinum toxin injection. *Bone* 46 (1): 24-31.
41. Maquet P. Friedrich Pauwels (1885-1980). *Int Orthop* 4 (3): 237-8, 1980.
42. Marimuthu K, Murton AJ, Greenhaff PL. Mechanisms regulating muscle mass during disuse atrophy and rehabilitation in humans. *J Appl Physiol* 110 (2): 555-60.
43. McLain RF, Weinstein JN. Ultrastructural changes in the dorsal root ganglion associated with whole body vibration. *J Spinal Disord* 4 (2): 142-8, 1991.
44. Miller RA, Nadon NL. Principles of animal use for gerontological research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55 (3): B117-23, 2000.
45. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92 (4): 1367-77, 2002.
46. Murfee WL, Hammett LA, Evans C, Xie L, Squire M, Rubin C, Judex S, Skalak TC. High-frequency, low-magnitude vibrations suppress the number of blood vessels per muscle fiber in mouse soleus muscle. *J Appl Physiol* 98 (6): 2376-80, 2005.
47. Neu CM, Manz F, Rauch F, Merkel A, Schoenau E. Bone densities and bone size at the distal radius in healthy children and adolescents: a study using peripheral quantitative computed tomography. *Bone* 28 (2): 227-32, 2001.
48. Neu CM, Rauch F, Manz F, Schoenau E. Modeling of cross-sectional bone size, mass and geometry at the proximal radius: a study of normal bone development using peripheral quantitative computed tomography. *Osteoporos Int* 12 (7): 538-47, 2001.
49. Niehoff A. *Belastung und Adaptation der epiphysenfuge*. 1. Auflage ed. Köln: Sport&Buch Strauß, 2003.
50. Nordlund MM, Thorstensson A. Strength training effects of whole-body vibration? *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17 (1): 12-17, 2007.
51. Obernier JA, Baldwin RL. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR J* 47 (4): 364-9, 2006.
52. Olfert IM, Howlett RA, Tang K, Dalton ND, Gu Y, Peterson KL, Wagner PD, Breen EC. Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. *J Physiol* 587 (Pt 8): 1755-67, 2009.
53. Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H. Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone* 32 (1): 69-77, 2003.
54. Ozcivici E, Garman R, Judex S. High-frequency oscillatory motions enhance the simulated mechanical properties of non-weight bearing trabecular bone. *Journal of biomechanics* 40 (15): 3404-3411, 2007.
55. Poliachik SL, Bain SD, Threet D, Huber P, Gross TS. Transient muscle paralysis disrupts bone homeostasis by rapid degradation of bone morphology. *Bone* 46 (1): 18-23.
56. Prisby RD, Lafage-Proust MH, Malaval L, Belli A, Vico L. Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know. *Ageing Res Rev* 7 (4): 319-29, 2008.

57. Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5 (3): 194-201, 2005.
58. Rauch F. Vibration therapy. *Dev Med Child Neurol* 51 Suppl 4: 166-8, 2009.
59. Rauch F, Bailey DA, Baxter-Jones A, Mirwald R, Faulkner R. The 'muscle-bone unit' during the pubertal growth spurt. *Bone* 34 (5): 771-5, 2004.
60. Rauch F, Hamdy R. Effect of a single botulinum toxin injection on bone development in growing rabbits. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6 (3): 264-8, 2006.
61. Rehn B, Lidström J, Skoglund J, Lindström B. Effects on leg muscular performance from whole-body vibration exercise: a systematic review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17 (1): 2-11, 2007.
62. Rittweger J, Beller G, Armbrrecht G, Mulder E, Buehring B, Gast U, Dimeo F, Schubert H, de Haan A, Stegeman DF, Schiessl H, Felsenberg D. Prevention of bone loss during 56 days of strict bed rest by side-alternating resistive vibration exercise. *Bone*, 2009.
63. Rittweger J, Beller G, Felsenberg D. Acute physiological effects of exhaustive whole-body vibration exercise in man. *Clinical physiology (Oxford, England)* 20 (2): 134-142, 2000.
64. Rittweger J, Michaelis I, Giehl M, Wusecke P, Felsenberg D. Adjusting for the partial volume effect in cortical bone analyses of pQCT images. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4 (4): 436-41, 2004.
65. Rittweger J, Mutschelknauss M, Felsenberg D. Acute changes in neuromuscular excitability after exhaustive whole body vibration exercise as compared to exhaustion by squatting exercise. *Clinical physiology and functional imaging* 23 (2): 81-86, 2003.
66. Rittweger J, Winwood K, Seynnes O, de Boer M, Wilks D, Lea R, Rennie M, Narici M. Bone loss from the human distal tibia epiphysis during 24 days of unilateral lower limb suspension. *J Physiol* 577 (Pt 1): 331-7, 2006.
67. Roelants M, Delecluse C, Goris M, Verschueren S. Effects of 24 weeks of whole body vibration training on body composition and muscle strength in untrained females. *Int J Sports Med* 25 (1): 1-5, 2004.
68. Ronnestad BR, Hansen EA, Raastad T. Effect of heavy strength training on thigh muscle cross-sectional area, performance determinants, and performance in well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol* 108 (5): 965-75.
69. Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 13 Suppl 1: 2-10, 2006.
70. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* 19 (3): 343-51, 2004.
71. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 412 (6847): 603-4, 2001.
72. Rubin C, Xu G, Judex S. The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (12): 2225-2229, 2001.
73. Runge M, Rehfeld G, Resniecek E. Balance training and exercise in geriatric patients. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (1): 61-5, 2000.
74. Sakai A, Nakamura T. Changes in trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 1 (4): 387-392, 2001.

75. Sakata T, Sakai A, Tsurukami H, Okimoto N, Okazaki Y, Ikeda S, Norimura T, Nakamura T. Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (9): 1596-1604, 1999.
76. Schmalbruch H. [Types of fibers in the leg musculature of the mouse]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 79 (1): 64-75, 1967.
77. Schoenau E. From mechanostat theory to development of the "Functional Muscle-Bone-Unit". *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5 (3): 232-8, 2005.
78. Schoenau E. The "functional muscle-bone unit": a two-step diagnostic algorithm in pediatric bone disease. *Pediatr Nephrol* 20 (3): 356-9, 2005.
79. Schoenau E, Fricke O. Mechanical influences on bone development in children. *Eur J Endocrinol* 159 Suppl 1: S27-31, 2008.
80. Schoenau E, Neu CM, Beck B, Manz F, Rauch F. Bone mineral content per muscle cross-sectional area as an index of the functional muscle-bone unit. *J Bone Miner Res* 17 (6): 1095-101, 2002.
81. Schoenau E, Saggese G, Peter F, Baroncelli GI, Shaw NJ, Crabtree NJ, Zadik Z, Neu CM, Noordam C, Radetti G, Hochberg Z. From bone biology to bone analysis. *Horm Res* 61 (6): 257-69, 2004.
82. Schonau E, Werhahn E, Schiedermaier U, Mokow E, Schiessl H, Scheidhauer K, Michalk D. Influence of muscle strength on bone strength during childhood and adolescence. *Horm Res* 45 Suppl 1: 63-6, 1996.
83. Schroeder AS, Ertl-Wagner B, Britsch S, Schroder JM, Nikolin S, Weis J, Muller-Felber W, Koerte I, Stehr M, Berweck S, Borggraefe I, Heinen F. Muscle biopsy substantiates long-term MRI alterations one year after a single dose of botulinum toxin injected into the lateral gastrocnemius muscle of healthy volunteers. *Mov Disord* 24 (10): 1494-503, 2009.
84. Seeman E. Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol* 95 (5): 2142-51, 2003.
85. Seeman E. Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3: S2-8, 2003.
86. Semler O, Fricke O, Vezyroglou K, Stark C, Stabrey A, Schoenau E. Results of a prospective pilot trial on mobility after whole body vibration in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *Clinical rehabilitation* 22 (5): 387-394, 2008.
87. Stone AV, Ma J, Whitlock PW, Koman LA, Smith TL, Smith BP, Callahan MF. Effects of Botox and Neuronox on muscle force generation in mice. *J Orthop Res* 25 (12): 1658-64, 2007.
88. Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, Dullin C, Stuermer KM. Musculoskeletal Response to Whole-Body Vibration During Fracture Healing in Intact and Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int*.
89. Tanaka S, Sakai A, Tanaka M, Otomo H, Okimoto N, Sakata T, Nakamura T. Skeletal unloading alleviates the anabolic action of intermittent PTH(1-34) in mouse tibia in association with inhibition of PTH-induced increase in c-fos mRNA in bone marrow cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (11): 1813-1820, 2004.
90. Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 36 (1): 73-80, 2003.
91. Tang K, Breen EC, Gerber HP, Ferrara NM, Wagner PD. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics* 18 (1): 63-9, 2004.

92. Vorobieva VV, Shabanov PD. Vibration model for hypoxic type of cell metabolism evaluated on rabbit cardiomyocytes. *Bull Exp Biol Med* 147 (6): 768-71, 2009.
93. Wakeling JM, Nigg BM. Modification of soft tissue vibrations in the leg by muscular activity. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 90 (2): 412-420, 2001.
94. Ward K, Alsop C, Caulton J, Rubin C, Adams J, Mughal Z. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. *J Bone Miner Res* 19 (3): 360-9, 2004.
95. Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 38 (2): 257-264, 2006.
96. Welch JM, Turner CH, Devareddy L, Arjmandi BH, Weaver CM. High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. *Bone* 42 (4): 660-8, 2008.
97. Wenke JC, Warren GL, Rathbone CR, Armstrong RB. Mouse plantar flexor muscle size and strength after inactivity and training. *Aviat Space Environ Med* 81 (7): 632-8.
98. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1. Aufl. ed. Berlin: Pro Business, p. [304] S. in getr. Zählung.
99. Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, Rubin CT, Judex S. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* 39 (5): 1059-66, 2006.
100. Xie L, Rubin C, Judex S. Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol* 104 (4): 1056-62, 2008.

9 Anhang

Versuchsplan 1. Teilstudie mit 30 Tieren (5 Tiere pro Gruppe)

Wochentag:	Donnerstag		Freitag		Samstag		Sonntag		Montag		Dienstag		Mittwoch		Donnerstag		Freitag		Samstag		Sonntag																		
	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			
Datum:	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28				
Tag:																																							
Gruppen																																							
Aktivitäten																																							
Akklimatisierung	X	X	X	X	X	X	X	X																															
Füttern / Ställe reinigen									X					X																									
Betäubung (p.)								X																															
Dysport (m.)																																							
Kochsalzlösung (m.)																																							
Beobachtung																																							
Inorelex (sc.)									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Körpergewicht																																							
Mobilität																																							
Vibration																																							
Tötung / Präparation / Fixierung																																							
Definition der Gruppen:																																							

1 Basiskontrollgruppe (BK)
 2 Kontrollgruppe (KG)
 3 Immobilisierte Gruppe (IM)
 4 Immobilisierte Gruppe + Vibrationstraining (M+IM/BV)
 5 Immobilisierte Gruppe + IGF-1 (IM+IGF-1)
 6 Immobilisierte Gruppe + Vibrationstraining+IGF-1 (IM+IM/BV+IGF-1)

Abb.36: Versuchsplan der 1. Teilstudie (Versuchsplan für die 2. Teilstudie war analog aufgebaut)

Immobilitäts-/Mobilitäts-Score

Gruppe 2 (KG)

Datum:	Käfignr.	Tiernr.	Untersucher (Name)			Gesamtpunktzahl
			0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	
Übung 1: Abd. d. hinteren Beine während des Anhebens des Körperhinterteils	3	M102				
		M152				
	4	M154				
		M105				
Übung 2: Zehenextension während des Sitzens	3	M199				
		M102				
	4	M152				
		M154				
Übung 3: Benutzen re. Hinterbein während Lauf	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				
Übung 4: Benutzen re. Hinterbein während beids. Stand	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				
Übung 5: Benutzen re. Hinterbein während Klettern	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				
Übung 6: Abgang vom Klettergerüst	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				
Übung 7: Pfötchenstellung (Vergl. hinten li / hinten re)	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				
Übung 8 Haltung im Stand auf den Hinterläufen	3	M105				
		M199				
	4	M102				
		M154				

16 Punkte: uneingeschränkte Mobilität
0 Punkte: komplette Immobilität

Abb.37: Dokumentationsbogen Immobilitäts-/Mobilitäts-Score (Beispiel KG für einen Beobachter; ausgewertet wurden in der vorliegenden Arbeit die Übungen 1,3,4,5 und 6)