

DISSERTATION

Der Einfluss der Osteoarthritis auf die
Oberschenkelmuskulatur und *whole body vibration* als
Therapieoption – Untersuchungen im Mausmodell

Impact of osteoarthritis on femoral muscles and whole body
vibration as a therapeutic option – studies in a mouse model
of osteoarthritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Derya Larissa Rostowski

Erstbetreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	4
2.1 OSTEOARTHROSE.....	4
2.2 MUSKULATUR	6
2.3 WHOLE BODY VIBRATION (WBV).....	7
2.4 MAUSMODELLE DER OSTEOARTHROSE	8
2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
3 MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 MATERIAL	11
3.1.1 Versuchstiere.....	11
3.1.2 Chemikalien.....	11
3.1.3 Angefertigte Lösungen.....	11
3.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe.....	12
3.1.5 Primersequenzen.....	12
3.1.6 Kits	12
3.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	12
3.1.8 Geräte	13
3.1.9 Software.....	14
3.2 METHODEN	15
3.2.1 Versuchsaufbau.....	15
3.2.2 OA-Modell der Destabilisierung des medialen Meniskus.....	17
3.2.3 Whole Body Vibration (WBV) Training.....	18
3.2.4 Histologie	19
3.2.5 Methoden zur Untersuchung der Genexpression im M. quadriceps femoris (QF) mittels Real Time Detection PCR (RTD-PCR).....	23
3.2.6 Statistik	26
4 ERGEBNISSE	28
4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTE	28
4.2 EFFEKT DER ARTHROSE AUF DIE OBERSCHENKELMUSKULATUR	30
4.2.1 Auswertung der Muskelfaserquerschnittsfläche (CSA) im OA-Verlauf über 12 Wochen.....	30
4.2.2 Auswertung der Genexpression im OA-Verlauf über 12 Wochen.....	32
4.3 EFFEKT DES VIBRATIONSTRAININGS AUF DIE OBERSCHENKELMUSKULATUR.....	35
4.3.1 Auswertung der Muskelfaserquerschnittsfläche (CSA) nach Vibrationstraining in OA- und kontralateralen Beinen.....	35
4.3.2 Einfluss des WBV-Trainings auf die Genexpression.....	38
5 DISKUSSION	42
5.1 ZUSAMMENFASSUNG DER HAUPTERGEBNISSE.....	42
5.1.1 Interaktionen zwischen Arthrose und Muskel.....	42
5.1.2 WBV-Training in der Arthrose	43
5.2 DISKUSSION DER METHODEN	45
5.2.1 Operation zur Destabilisierung des medialen Meniskus und Vibrationstraining	45
5.2.2 Die Methode der CSA-Auswertung.....	47
5.2.3 Die Genexpressionsanalyse.....	48
5.3 LIMITATIONEN.....	48

5.4	AUSBlick	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	51
7	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	57
8	LEBENSlauf	58
9	DANKSAGUNG.....	60
10	BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	11
Tabelle 2: Angefertigte Lösungen	11
Tabelle 3: Fluoreszenzfarbstoffe.....	12
Tabelle 4: Primersequenzen der untersuchten Gene für die RTD-PCR	12
Tabelle 5: Kits	12
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 7: Geräte	13
Tabelle 8: Software	14
Tabelle 9: Thermalsequenz für die RTD-PCR (Quelle: in Anlehnung an das StepOnePlus Real-Time PCR System Handbuch)	25
Tabelle 10: Darstellung der statistischen Analyse	27
Tabelle 11: Kurzbeschreibung der Funktion der mittels RTD-PCR untersuchten Gene	29

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsteil 1-Untersuchung der Oberschenkelmuskulatur in der OA in einem Zeitraum zwischen 2 und 12 Wochen (Wo) nach OA-Induktion.	15
Abb. 2: Versuchsteil 2-Einfluss des WBV-Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur in der OA.....	16
Abb. 3: Fließschema zur Darstellung des Versuchsaufbaus.	16
Abb. 4: Anatomische Strukturen des Kniegelenks mit blau hervorgehobenem medialem meniskotibialen Ligament (MMTL), LMTL=laterale meniskotibiale Ligament, F=Femur, ACL=vorderes Kreuzband, MM=medialer Meniskus, T=Tibia (Quelle: Glasson et.al., 2007).	17
Abb. 5: Vibrationsplatte für das WBV-Training der Mäuse.	19
Abb. 6: Fluoreszenzscan (555 nm Anregung) eines WGA 555 gefärbten Querschnitts durch die Oberschenkelmuskulatur der Maus.	21
Abb. 7: Untersuchte Bereiche des Musculus vastus intermedius.	22
Abb. 8: Bildbearbeitung und halb-automatisierte Auswertung der CSA (Quelle: Rostowski, 2018).	23
Abb. 9: Formel zur Berechnung der mittleren normalisierten Expression (MNE), (Quelle: Simon, 2003)	26
Abb. 10: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Gewichtsentwicklung von den sham- vs. DMM-Mäusen über 12 Wochen (W).....	28
Abb. 11: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Gewichtsentwicklung von den sham-WBV- vs. WBV-Mäusen über 8 Wochen (W).....	29
Abb. 12: Darstellung des Mittelwertes und Standardabweichung der CSA in den sham- und DMM-Mäusen im Vergleich zu den Naivmäusen über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen (W) in vier verschiedenen Regionen des VIM. a) Pars anterior b) Pars lateralis c) Pars medialis d) Pars posterior. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$ angegeben.	31
Abb. 13: Vergleich der CSA in den Bereichen Pars anterior, Pars lateralis, Pars medialis und Pars posterior in unbehandelten Mäusen (naiv).	32

Abb. 14: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter anabol-wirkender Gene im M. quadriceps femoris der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) Ppargc1a b) Igf1 c) Bmp4 d) Bmp6 e) Axl f) Myh1. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$ angegeben.	33
Abb. 15: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter katabol-wirkender Gene im M. quadriceps femoris der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) Mstn b) Fbxo32 c) Trim63. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ angegeben.....	34
Abb. 16: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter Muskelaktivität regulierender Gene im M- quadriceps femoris der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) Atp2a1 b)Atp2a2. ...	35
Abb. 17: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der CSA der unbehandelten (naiven) Mäuse im Vergleich zu kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) sham-WBV- und WBV-Mäusen im a) Pars anterior, b) Pars lateralis, c) Pars medialis und d) Pars posterior des VIM nach 8 Wochen. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$ angegeben.	36
Abb. 18: Histogramm der CSA-Größenverteilung in kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) sham-WBV- und WBV-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten (naiven) Mäusen im a) Pars anterior, b) Pars lateralis, c) Pars medialis und d) Pars posterior des VIM nach 8 Wochen.....	37
Abb. 19: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter anabol-wirkender Gene im M. quadriceps femoris der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich. a) Ppargc1a b) Igf1 c) Bmp4 d) Bmp6 e) Axl f) Myh1.....	39
Abb. 20: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter katabol-wirkender Gene im M. quadriceps femoris der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich. a) Mstn b) Fbxo32 c) Trim63.....	40
Abb. 21: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter Muskelaktivität regulierender Gene im M. quadriceps femoris der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich a) Atp2a1 b) Atp2a2.....	41

Abkürzungsverzeichnis

β -MCE.....	β -Mercaptoethanol
<i>Atp2a1</i>	Sarcoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase 1
<i>Atp2a2</i>	Sarcoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase 2

<i>Axl</i>	AXL Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>Bmp4</i>	Knochenmorphogenetisches Protein 4
<i>Bmp6</i>	Knochenmorphogenetisches Protein 6
cDNA.....	komplementäre DNA
CO.....	kontralateral
CSA.....	Cross Sectional Area (Muskelfaserquerschnittsfläche)
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMM	Destabilisierung des medialen Meniskus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
<i>Fbxo32</i>	F-Box Protein 32
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>Igf1</i>	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6.....	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
<i>MCP1</i>	Monozyt chemotaktisches Protein 1
MMTL.....	Mediale meniskotibiale Ligament
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
<i>Mstn</i>	Myostatin
<i>Myh1</i>	Myoglobin 1
OA.....	Osteoarthrose
OP	Operation
PBS.....	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>Ppargc1a</i>	Peroxisome Proliferator-Aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator-1-alpha
QF	Musculus quadriceps femoris
RNA	Ribonukleinsäure
RTD-PCR.....	Real-Time Detection Polymerase Chain Reaction
SD	Standardabweichung
sham-WBV	sham-vibriert
<i>TNFA</i>	Tumornekrosefaktor alpha
<i>Trim63</i>	Tripartite Motif Containing 63
VIM.....	Musculus vastus intermedius

WBV Whole Body Vibration
WGA Wheat Germ Agglutinin

1 Zusammenfassung

Die OA zählt weltweit zu den am häufigsten auftretenden degenerativen Gelenkerkrankungen. Bisherige Therapieoptionen beschränken sich auf die symptomorientierte Versorgung der Patienten, da bis zum heutigen Zeitpunkt eine nicht-invasive, kurative Therapie noch nicht etabliert wurde. Eine Muskelhypotrophie kann Ursache als auch Folge einer OA sein, weshalb die Betrachtung der Muskulatur in diesem Krankheitsbild von Bedeutung ist. Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit der Untersuchung potentieller Effekte der Osteoarthrose (OA) im Kniegelenk auf die Beinmuskulatur im Mausmodell. Darüber hinaus wurde der Effekt eines Vibrationstrainings in Form der *Whole Body Vibration* (WBV) auf die Oberschenkelmuskulatur eines arthrotischen Knies in diesem Modell erforscht. Um den Effekt der OA und des WBV-Trainings auf die Muskulatur messen zu können, wurden aus den von den Mäusen entnommenen Oberschenkeln histologische Querschnitte angefertigt und gefärbt. Mithilfe eines in Kooperation mit dem Zuse-Institut der Freien Universität Berlin speziell entwickelten Programms, wurde die Querschnittsfläche (*cross sectional area* [CSA]) der einzelnen Muskelfasern in vier exemplarischen Regionen des *Musculus vastus intermedius* (VIM) halb-automatisiert ausgewertet. Darüber hinaus wurden mit der aus dem *Musculus quadriceps femoris* isolierten RNA die Genexpression mittels einer *Real Time Detection PCR* (RTD-PCR) untersucht. In den Experimenten des OA-Verlaufs wurden OA-induzierte DMM-Mäuse mit sham-operierten Mäusen verglichen. Für die Beurteilung des WBV-Trainings wurden die OA-induzierten und kontralateralen Beine vibrierter (WBV) und sham-vibrierter (sham-WBV) Mäuse verglichen. Obwohl zu vereinzelt Zeitpunkten im OA-Verlauf signifikante Unterschiede zwischen sham-Mäusen und OA-Mäusen auftraten, hatte die OA-Induktion im Gesamtbild keinen ersichtlichen Einfluss auf den Muskel. Auch das WBV-Training hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Muskulatur gezeigt.

Da der zugrundeliegende physiologische Mechanismus des WBV-Trainings nicht bekannt ist und es verschiedene unbekannte Variablen zu geben scheint, ist es schwierig, den Effekt der WBV zu untersuchen oder effiziente WBV-Trainingsprotokolle zu erstellen.

In Zusammenschau mit Ergebnissen aus der Fachliteratur scheinen unbeeinflussbare individuelle Variablen während des WBV-Trainings innerhalb von Testpersonen und

Versuchstieren eine Objektivierung des Effekts der WBV zu erschweren. Aus diesem Grund bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um den Effekt der OA und des WBV-Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur genauer zu erforschen.

Abstract (English)

OA is one of the most common degenerative joint diseases worldwide. Current treatment options are limited to symptom-oriented care of patients, as a non-invasive, curative therapy has not yet been established. Since muscle hypotrophy can be a cause as well as a consequence of OA, leg musculature plays a pivotal role in the disease. The present study analyzed the interaction between osteoarthritis (OA) in the knee joint and leg musculature in a mouse model. It focuses on the effect of OA on thigh muscles in a preclinical mouse model of gonarthrosis in which the medial meniscus was destabilized (destabilization of the medial meniscus [DMM]) over an observation period of twelve weeks. Additionally, in order to investigate a potential non-invasive therapy option, the effect of vibration training in the form of Whole-Body Vibration (WBV) on the thigh muscles of an arthritic knee was explored in this model. Potential effects of the DMM model (OA progression) and WBV training on the muscles were analyzed on histological cross-sections using a specifically developed program for unbiased, semi-automatic evaluation of muscle fiber cross sectional area. Furthermore, RNA isolated from the quadriceps femoris was used to examine muscular gene expression patterns using real-time detection PCR (RTD-PCR). To analyze the effect of OA progression on the thigh muscle, OA-induced DMM mice were compared with sham-operated mice. For assessment of the effect of WBV training, the OA-induced and contralateral legs of vibrated (WBV) and sham-vibrated (sham-WBV) mice were compared. Although significant differences between sham-operated mice and OA mice occurred at isolated time points during the course of OA progression, OA induction had no apparent long-term or directional effect on the muscle. Moreover, the WBV training showed no apparent effect on the muscle. Since the physiological mechanism of the WBV training is unknown and there seem to be multiple unknown variables, it is difficult to investigate the effects of WBV or establish efficient WBV training regimes. For this reason, further research is needed to explore the effect of OA and WBV training on thigh muscles.

2 Einleitung

2.1 Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA) ist die häufigste Form muskuloskelettaler Erkrankungen weltweit. Auf Grund der fehlenden Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels stellt sie eine progressive Erkrankung dar, die mit Schmerzen und zunehmender Funktionseinschränkung einhergeht (Cross *et al.*, 2014; Pereira, Ramos & Branco, 2015). Diese hochprävalente Erkrankung betrifft 10-20% der adulten Bevölkerung, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Hunter, Schofield & Callander, 2014; Pereira, Ramos & Branco, 2015). Die Gonarthrose (Arthrose des Kniegelenks) ist mit einer Prävalenz von 6% die häufigste Form dieser Erkrankung, gefolgt von der Coxarthrose (Arthrose des Hüftgelenks) und der Herberden-Arthrose (Arthrose der Fingerendgelenke), (Michael, Schluter-Brust & Eysel, 2010; Nelson, 2018). Die Wahrscheinlichkeit an einer Arthrose zu erkranken nimmt mit dem Alter zu (Nelson, 2018). Darüber hinaus zeigten Zwillingsforschungen, dass der Osteoarthrose genetische Ursachen zugrunde liegen können, wobei die genauen genetischen Varianten noch unbekannt sind (Nelson, 2018). Ebenfalls stellt Übergewicht einen relevanten Risikofaktor für die Ausbildung einer Osteoarthrose dar (Nelson, 2018). Weiterhin zeigten Studien, dass der radiologische Nachweis typischer Zeichen einer Gonarthrose nicht mit der Häufigkeit klinischer Beschwerden korreliert. Nur etwa 15% der Patient*innen mit einer radiologisch gesicherten Gonarthrose klagen über Knieschmerzen (Michael, Schluter-Brust & Eysel, 2010).

Die OA beginnt charakteristisch mit einer gestörten Gelenkhomeostase, die zu einem Missverhältnis von auf- und abbauenden Prozessen der Knorpelmatrix führt. Begleitet von Entzündungsreaktionen führt dies zu einem fortschreitenden Verlust des Gelenkknorpels und im weiteren Verlauf zu strukturellen Veränderungen der subchondralen Knochenstruktur und Deformierung des gesamten Gelenkes. Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass von den Prozessen der OA alle am Gelenk beteiligten und auch benachbarten Gewebe betroffen sind und eine distinkte Rolle in der Pathologie spielen (Alcaraz *et al.*, 2010).

Die aktuellen Therapien fokussieren sich vor allem auf die symptomatische Behandlung, da es keine bekannte effiziente Verhinderung der Progression der OA gibt. Durch den daraus folgenden Funktionsverlust wird eine

Bewegungseinschränkung ausgelöst und demzufolge kommt es zu einer Minderung der Lebensqualität der Patient*innen (Bennell, Hunter & Hinman, 2012). Die Therapie der Wahl nach erfolgloser konservativer Therapie ist die Endoprothese, welche im Durchschnitt eine Lebensdauer von 15 Jahre hat und danach einmalig, mit einer kürzeren Einsatzdauer, ausgetauscht werden kann (Bennell, Hunter & Hinman, 2012). Darüber hinaus wird auch an kurativen Ansätzen in Form einer direkten Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in das Gelenk geforscht, wodurch eine Regeneration des degenerierten Knorpels ermöglicht werden soll (Xu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Um die Symptome der Gonarthrose zu mildern, wird zunächst eine Lebensstiländerung mit Bewegung und Gewichtsverlust angestrebt (Nelson, 2018). Weiterhin werden Therapien mittels lokaler Injektionen von intraartikulären Kortikosteroiden und intraartikulärer Hyaluronsäure in das betroffene Gelenk erforscht, welche in Studien eine kurzzeitige Linderung der Symptome bewirkten (Nelson, 2018; Billesberger *et al.*, 2020). Um die Therapieoptionen optimieren zu können, wird momentan an dem Pathomechanismus geforscht, der zur Ausbildung einer OA führt, welcher bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollends bekannt ist (Alcaraz *et al.*, 2010; Nelson, 2018; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Darüber hinaus zeigten Forschungsergebnisse, dass ein weiterer Risikofaktor, der die Ausbildung einer OA begünstigt, eine reduzierte Muskelkraft ist (Roos *et al.*, 2011; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Die OA ist vor allem mit der Atrophie und verminderten Muskelkraft der periartikulären Muskulatur assoziiert (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Die Muskeln der Extensorenloge (Kniestreckung und Hüftbeugung) des Oberschenkels dienen der Schockabsorption und Gelenkstabilität. Somit führt die Degeneration dieser Muskelgruppe zu einem veränderten mechanischen Stress im Gelenk und kann Ursache der Ausbildung einer Gonarthrose sein (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Folglich ist die Stärkung der Muskeln ein wichtiger Teil der Rehabilitationsprozesse, welche Schmerzen reduzieren und die Beweglichkeit des betroffenen Gelenks fördern und somit die Lebensqualität der Patient*innen verbessern sollen (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Durch dieses Training wird außerdem die Gelenkinstabilität, die durch die geschwächte periartikuläre Muskulatur ausgelöst wird und die Fortschreitung der OA begünstigt, vermindert. Somit könnte die Progression der OA durch ein Muskeltraining verhindert werden (Terracciano *et al.*, 2013; Palmieri, Lodi & Capone, 2010; Roos *et al.*, 2011; Rehan Youssef *et al.*, 2009; Herzog & Longino, 2007; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Jedoch beschränken

Schmerzen und Versteifungen des Gelenks, die durch die OA ausgelöst werden, größtenteils die Anwendung vom herkömmlichen physiotherapeutischen Krafttraining (Vaz *et al.*, 2013; Valderrabano *et al.*, 2006; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Um dieses Problem zu umgehen, wird an einem gelenkschonenden Training der Muskulatur geforscht. Das Vibrationstraining, auch *Whole Body Vibration* (WBV) genannt, ist eines dieser Forschungsgebiete.

2.2 Muskulatur

Die Skelettmuskulatur besteht aus langsam zuckenden Typ I-Fasern und schnell zuckenden Typ IIa-, IIb- und IIx-Fasern, wobei in den meisten Menschen nur Typ I-, IIa- und IIx-Fasern vorhanden sind (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Langsam zuckende Muskelfasern sind bei lang andauernden Bewegungen mit geringer Kraftaufwendung aktiv, während die Subtypen der schnell zuckenden Muskelfasern für Bewegungen mit einer großen Kraftaufwendung optimiert sind (Schiaffino, Reggiani & Murgia, 2020). Eine reduzierte Anzahl an Muskelfasern und eine Veränderung der Zusammensetzung der Muskelfasertypen scheinen einen Einfluss auf die Muskelschwäche des *M. quadriceps femoris* und Knieschmerzen bei Patient*innen mit Gonarthrose zu haben (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Die an einer Gonarthrose erkrankten Patient*innen haben eine signifikant geringere Anzahl an langsam zuckenden Typ I-Fasern und eine höhere Anzahl an hybriden schnell zuckenden IIa/x-Fasern (Noehren *et al.*, 2018). Zusätzlich zeigten Studien, dass der Muskelfaserquerschnitt (CSA) einen Einfluss auf den Verlauf der OA hat (Yamauchi, Kato & Kato, 2019). Eine erhöhte CSA im *Musculus vastus medialis* korrelierte mit einer größeren tibialen Knorpeldicke, mit einer Schmerzreduktion und einer verbesserten Funktion des Gelenks (Berezovskaya *et al.*, 2021). Folglich führt eine erhöhte CSA des *Musculus quadriceps femoris* (QF) zu einer Verbesserung der Symptome der OA. Therapieoptionen, welche den QF stärken, können den Krankheitsverlauf der OA somit positiv beeinflussen (Berezovskaya *et al.*, 2021). Darüber hinaus wurde der Muskel als sekretorisches Organ identifiziert (Pedersen & Febbraio, 2012). Zytokine, Peptide und Wachstumsfaktoren, die von Muskelfasern exprimiert und ausgeschüttet werden, bezeichnet man als Myokine (So *et al.*, 2014; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Diese werden durch Bewegung und Kontraktion reguliert und ausgeschüttet. Sie haben einen Einfluss auf die autokrine, parakrine und

endokrine Kommunikation der Muskelzellen lokal beziehungsweise mit verschiedenen Organen, beispielsweise Leber, Pankreas, Knochen und Gehirn (So *et al.*, 2014; Pedersen & Febbraio, 2012; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Außerdem wird vermutet, dass Myokine mit umliegenden Strukturen wie der Synovialis, Fettgewebe, Knorpel und Knochen auf molekularer Ebene interagieren (Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Aber auch im Muskel selbst haben Myokine wie Myostatin, IL-6 und IL-7 Einfluss auf die Muskelhypertrophie (Pedersen & Febbraio, 2012). Viele dieser von der Skelettmuskulatur produzierten Proteine sind abhängig von Muskelkontraktionen, somit kann Inaktivität zu einer veränderten Myokin-Antwort und dementsprechend zu chronischen Erkrankungen führen. Ein angemessenes physisches Training kann dem somit entgegenwirken (Pedersen & Febbraio, 2012). Weiterhin zeigten Forschungsergebnisse, dass durch die OA die Expression verschiedener Gene im periartikulären Muskel beeinflusst wird (Silva *et al.*, 2018). Im Vergleich zu sham-Mäusen, wurde bei OA-Mäusen eine erhöhte Expression von Myostatin und eine geringere Expression von Myogenin im *Musculus gastrocnemicus* gemessen (Silva *et al.*, 2018). Auch proinflammatorische Myokine wie IL-1 β wurden in den OA-Mäusen vermehrt exprimiert (Silva *et al.*, 2018). Dies wurde auch in einer Studie im menschlichen Gewebe gezeigt. Im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe zeigten die an OA erkrankten Patient*innen eine erhöhte Expression von den proinflammatorischen Genen TNFA und MCP1 (Levinger *et al.*, 2010). Durch diese Veränderungen in der Genexpression wird durch die OA eine Muskelatrophie begünstigt (Levinger *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2018).

2.3 Whole Body Vibration (WBV)

Die WBV induziert mithilfe einer Vibrationsplatte Muskelkontraktionen, welche eine Reflexantwort in den Muskeln induziert, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt wurde (Cakar *et al.*, 2015). Bekannt ist, dass die durch die WBV ausgelösten Kontraktionen die Muskelfunktion verbessern, die Muskelkraft erhöhen, die Knochenstruktur verdichten und die Körperhaltung der Patient*innen positiv beeinflussen (Cakar *et al.*, 2015; Rogan *et al.*, 2011). Darüber hinaus eignet sich die Anwendung der WBV vor allem bei Patient*innen mit eingeschränktem Bewegungsausmaß (Zazula *et al.*, 2020). Klinische Studien zeigten bereits Hinweise auf positive Effekte der WBV im Krankheitsbild der Osteoporose, in der Rehabilitation

älterer Patient*innen und in der Behandlung der Muskelatrophie (Cakar *et al.*, 2015; Sitja-Rabert *et al.*, 2012; Gomez-Cabello *et al.*, 2012). Die untersuchten positiven Effekte wurden ebenfalls bei Patient*innen mit einer Gonarthrose festgestellt. Durch ein acht- und zwölfwöchiges WBV-Training wurde der 6-Minuten-Geh-Test und die Balance der Patient*innen verbessert (Wang *et al.*, 2015). Aufgrund fehlender Standardisierung der WBV und uneinheitlicher Studiendesigns sind jedoch eindeutige Aussagen zum Therapieerfolg dieser Methode derzeit nur schwer möglich (Rogan *et al.*, 2011).

2.4 Mausmodelle der Osteoarthrose

Mausmodelle sind ein wichtiger Bestandteil, um Krankheiten wie die Osteoarthrose näher zu untersuchen. Das zur Erforschung der OA verwendete humane Gewebe wird meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium der OA entnommen, wodurch eine Untersuchung der Ätiologie unmöglich ist (McCoy, 2015). Die kurze Lebenszeit der Maus ermöglicht die nähere Erforschung der Progression der OA vom Anfangsstadium bis zu vorangeschrittenen, degenerativen Stadien innerhalb einer kurzen Zeitspanne (Staines *et al.*, 2017). Zusätzlich kann durch die kleine Größe des Mausgelenks das gesamte Gelenk histologisch untersucht werden (Cope *et al.*, 2019). Die OA kann operativ, mechanisch und enzymatisch induziert werden. Sie kann sich aber auch spontan idiopathisch in hierfür spezifisch ausgewählten Versuchstierstämmen, welche eine besonders hohe Inzidenz einer Entwicklung einer OA vorweisen, ausbilden (Staines *et al.*, 2017; McCoy, 2015). Operativ wird die OA durch eine Destabilisierung des Gelenks mittels Transsektion verschiedener Bänder, oder durch eine Menishektomie induziert (Staines *et al.*, 2017). Während die operativen Mausmodelle sich zur Untersuchung der durch ein Trauma induzierten sekundären OA eignen, wird mit Versuchstiermodellen, welche spontan eine OA entwickeln, die primäre OA erforscht (Staines *et al.*, 2017). Die spontanen Mausmodelle profitieren von einer langsam voranschreitenden OA, welche der Progression der menschlichen Arthrose sehr ähnelt. Jedoch ist die Ausprägung der OA in spontanen Modellen schwer vorhersagbar beziehungsweise reproduzierbar, was die Verwendung als Modell erschwert (Samvelyan *et al.*, 2021). Für die Erforschung von Therapiemethoden eignen sich vor allem operative Mausmodelle, da sich im Vergleich zu den spontanen Modellen eine OA schnell entwickelt (Samvelyan *et al.*, 2021). Durch verschiedene

operative Methoden können unterschiedlich stark ausgeprägte OAs induziert werden (Samvelyan *et al.*, 2021). Die in dieser Dissertation gewählte DMM-Methode induziert im Vergleich zu anderen Mausmodellen (ACLT [Durchtrennung des anterioren Kreuzbandes], MMx [mediale Meniskektomie], MMT [Durchtrennung des medialen Meniskus]) einen milden Verlauf der OA (Cope *et al.*, 2019).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel des vorgestellten Versuchsvorhabens war es, im Krankheitsbild der Gonarthrose den Effekt der OA und des Vibrationstrainings auf die Oberschenkelmuskulatur zu untersuchen. Die Untersuchungen erfolgten dabei in einem präklinischen Mausmodell, bei dem durch chirurgische Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) eine Gonarthrose induziert wurde. In einem Versuchsteil wurden OA-induzierte Mäuse über einen Zeitraum von zwölf Wochen beobachtet und der Krankheitsverlauf mit einer sham-operierten Gruppe und unbehandelten „naiven“ Tieren verglichen. In einem zweiten Versuchsteil wurden OA-induzierte Mäuse mittels Vibrationstraining in Form der *Whole Body Vibration* behandelt.

Das Ziel des ersten Teils war es, mögliche Effekte der OA-Progression auf die Oberschenkelmuskulatur zu untersuchen. Dabei wurden durch die Messung der Querschnittsfläche der Muskelfasern des *Musculus quadriceps femoris* mechanische und durch Genexpressionsanalysen mittels *Real Time Detection PCR* biochemische Faktoren untersucht.

Die Erforschung dieser Zusammenhänge soll ein besseres Verständnis des Einflusses des DMM-Mausmodells auf die periartikuläre Muskulatur ermöglichen. Da das DMM-Modell eine milde Form der Arthrose induziert, begünstigt dies eine gezielte Erforschung von Therapiemöglichkeiten früher Stadien der Gonarthrose, wodurch ein Fortschreiten der Erkrankung bis zu einem Behinderungsgrad verlangsamt oder verhindert werden könnte. Darüber hinaus ist bekannt, dass die muskuläre Instabilität ein erheblicher Risikofaktor für die Entwicklung einer Gonarthrose darstellt. Somit ermöglicht die Erforschung der periartikulären Muskulatur die Therapieoption zur Kräftigung der Muskulatur und die dadurch bedingte Stabilisierung des Kniegelenks zu optimieren. Die Erforschung einer nicht-invasiven Therapieoption, welche den Einsatz eines künstlichen Gelenkeinsatzes hinauszögert, oder sogar verhindert, würde mit

einer Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen einhergehen, da somit operationsbedingte Risiken und Komplikationen vermieden werden könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

- 10-11 Wochen alte, männliche C57BL/6J (Charles River) Mäuse
- Tierversuchsantrag: Aktenzeichen G 0303/15, genehmigt am 22.03.2016

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum Charité
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Carprofen (Rimadyl) 50 mg/mL ad us. vet.	Zoetis, Parsippany, NJ, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA 14 %	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol (EtOH) 100 %	Apotheke Universitätsklinikum Charité
Ethanol (EtOH) 96 % vergällt	Apotheke Universitätsklinikum Charité
Ethanol (EtOH) 80 % vergällt	Apotheke Universitätsklinikum Charité
Ethanol (EtOH) 70 % vergällt	Apotheke Universitätsklinikum Charité
Fluoromount G	Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA
Flüssiger Stickstoff	Linde, Dublin, Irland
Isofluran (Forene)	Baxter International, Deerfield, IL, USA
Medizinischer Sauerstoff (100 %)	Linde, Dublin, Irland
Natriumchlorid	B. Braun SE, Melsungen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Normales Eselserum	Abcam, Cambridge, UK
Paraffin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Gibco, Waltham, MA, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
2X SYBR Green PCR-Mastermix	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Triton X-100 10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Apotheke Universitätsklinikum Charité

3.1.3 Angefertigte Lösungen

Tabelle 2: Angefertigte Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Analgesie	5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) \rightarrow 0,15 mg/30 g Maus (Stock [50 mg/mL] in NaCl 1:33 auf 1,5 mg/mL verdünnt \rightarrow pro Maus 100 μ L subkutan)
Blocklösung	10 % normales Eselserum (95 mg/mL) + 0,1 % Triton X-100 (4,5 ml PBS + 500 μ L Eselserum + 50 μ L 10 % Triton X-100)

Citratpuffer	10 mM Natriumcitrat + 0,05 % Tween 20, pH 6,0
--------------	--

3.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 3: Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Hersteller
WGA 555 1 mg/mL (Alexa Fluor 555)	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
DAPI 1 mg/mL	Roche Holding AG, Basel, Schweiz

3.1.5 Primersequenzen

Tabelle 4: Primersequenzen der untersuchten Gene für die RTD-PCR

Gen	Orientierung	Sequenz (5` zu 3`)
Gapdh	<i>forward</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	<i>reverse</i>	GGGGTCGTTGATGGCAACA
Ppargc1a	<i>forward</i>	CCCTGCCATTGTTAAGACC
	<i>reverse</i>	TGCTGCTGTTCCCTGTTTTTC
Igf1	<i>forward</i>	GTGGATGCTCTTCAGTTCGTGTG
	<i>reverse</i>	TCCAGTCTCCTCAGATCACAGC
Bmp4	<i>forward</i>	CCATACCTTGACCCGCAGAA
	<i>reverse</i>	AATGGCGACGGCAGTTCTTA
Bmp6	<i>forward</i>	CTTTCCTCAACGACGCGGACAT
	<i>reverse</i>	CCTCAGGAATCTGGGATAGGTTG
Axl	<i>forward</i>	TCCTTCCTCACACCCCGTAT
	<i>reverse</i>	GCTAACGTTCTCAGGGGGAC
Myh1	<i>forward</i>	ACA ACTCTTCCCGCTTTGGT
	<i>reverse</i>	CAGGAGCATTTCGATTAGATCCG
Mstn	<i>forward</i>	GGCCATGATCTTGCTGTAAC
	<i>reverse</i>	TTGGGTGCGATAATCCAGTC
Fbxo32	<i>forward</i>	GCAGAGAGTCGGCAAGTC
	<i>reverse</i>	CAGGTCGGTGATCGTGAG
Trim63	<i>forward</i>	GAAGTGATCATGGACCGGCA
	<i>reverse</i>	CGTCTTCGTGTTCCCTTGAC
Atp2a1	<i>forward</i>	GAAGAACGCCATCGTGAGGA
	<i>reverse</i>	GCCAGTGATGGAGAACTCGT
Atp2a2	<i>forward</i>	TCCGTTACCTGGCTATTGGC
	<i>reverse</i>	CGAAGTCTGGGTTGTCCTCC

3.1.6 Kits

Tabelle 5: Kits

Bezeichnung	Hersteller
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
-------------	------------

1 ml Spritze + 22G Kanüle	B. Braun SE, Melsungen
11'er Klinge	Feather, Osaka, Japan
96-Well-Platte	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Asid-med Enthaarungscreme	Asid Bonz GmbH, Herrenberg
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen
Dichtungshaffolie für PCR-Platten	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Durapore Kunstseidenpflaster	3M, Saint Paul, MN, USA
Einmalhandschuhe	B. Braun SE, Melsungen
Eppendorfbehälter	Eppendorf, Hamburg
Fadenhalter	Aesculap AG, Melsungen
Glasobjektträger	Fisher Scientific, Hampton, VA, USA
Grüne Tücher	Tork, Mannheim
Kältespray	Henry Schein, Melville, NY, USA
Kryoröhrchen	Fisher Scientific, Hampton, VA, USA
LSM speziell markierte Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Pap Pen Fettstift	Plano GmbH, Wetzlar
Pinzette	Aesculap AG, Melsungen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
RNase Away	Fisher Scientific, Hampton, VA, USA
Schere	Aesculap AG, Melsungen
Skalpell	B. Braun SE, Melsungen
Softasept Desinfektionsmittel	B. Braun SE, Melsungen
Vicryl 6-0, Prolene 8-0	Ethicon, Raritan, NJ, USA

3.1.8 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Einbettkassette	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Denver Instruments, Göttingen
Fluovac Absaugsystem	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Induktionskammer für Narkose (Nagetiere)	RWD Life Science, San Diego, CA, USA
Isofluran-Verdampfer	MS Schippers, Kerken
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Sharp Corporation, Osaka, Japan
NanoDrop 1000 UV/VIS-Spektralphotometer	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
NanoZoomer HT 2.0 Objektträger-Scanner	Hamamatsu, Shizuoka, Japan
PCR Cooler	Eppendorf, Hamburg
Perfect Spin P für PCR-Platten	Peqlab Biotechnologie GmbH, Radnor, PA, USA
Spectrum Bessman Gewebepulverisierer	Fisher Scientific, Hampton, VA, USA
Speziell angefertigte Vibrationsplatte	Novotec Medical, Pforzheim
StepOnePlus Real-Time PCR System Thermocycler	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Stereo-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Thermo Microm HM 325	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlbehälter	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wasserbad	Kunz Instruments, Stockholm, Schweden

 Zentrifuge und Vortexer

 Neolab Line, Heidelberg

3.1.9 Software

Tabelle 8: Software

Bezeichnung	Hersteller
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office Paket	Microsoft, Redmond, WA, USA
NDP.view 2 Version 2.6.8.0	Hamamatsu, Shizuoka, Japan
Spyder Version 3	MIT License, Cambridge, MA, USA
StepOne Real-Time PCR System Software Version 2.3	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zur Untersuchung der Oberschenkelmuskulatur im Krankheitsbild der Arthrose Experimente im Mausmodell durchgeführt, für die ein genehmigter Tierversuchsantrag (Aktenzeichen: G 0303/15, genehmigt am 22.03.2016) vorliegt. Bei 10-11 Wochen alten, männlichen C57BL/6J (Charles River) Mäusen wurde eine Gonarthrose durch eine chirurgische Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) mittels Durchtrennung des meniskotibialen Bandes (Abb. 4) induziert. Die durchgeführten Experimente befassten sich einerseits mit dem Einfluss der OA auf die Oberschenkelmuskulatur (Versuchsteil 1, Abb. 1) und andererseits mit dem Effekt eines siebenwöchigen *Whole Body Vibration* (WBV) Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur der Mäuse im DMM-Modell (Versuchsteil 2, Abb. 2). Um den Verlauf der Arthrose-induzierten Muskulatur zu beurteilen, wurden Beobachtungszeitpunkte von 2, 4, 6, 8 und 12 Wochen gewählt. Untersuchungen an den Kniegelenken zeigten, dass sich nach DMM OP eine OA mit progressivem Verlauf über 12 Wochen ausbildet (Haase *et al.*, 2019).

OP	2 Wo	4 Wo	6 Wo	8 Wo	12 Wo
DMM	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
sham-OP	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel	Muskel

Abb. 1: Versuchsteil 1-Untersuchung der Oberschenkelmuskulatur in der OA in einem Zeitraum zwischen 2 und 12 Wochen (Wo) nach OA-Induktion.

Mäuse für die Versuche des WBV-Trainings wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt: vibriert (WBV) und sham-vibriert (sham-WBV).

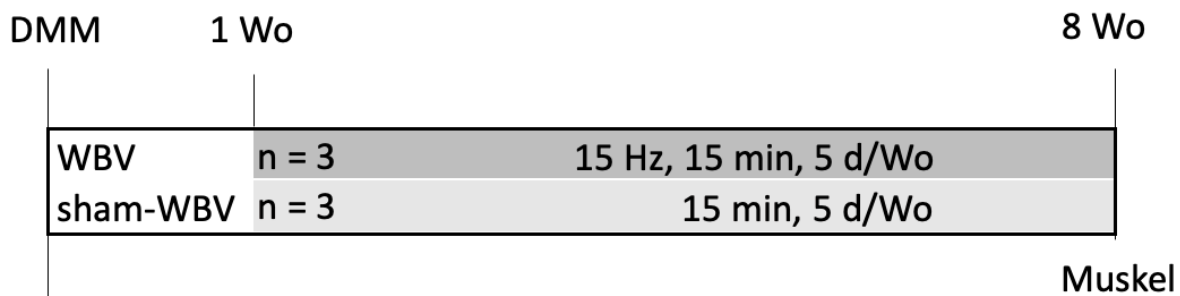


Abb. 2: Versuchsteil 2-Einfluss des WBV-Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur in der OA.

Die Effekte der OA bzw. des WBV-Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur wurden zum einen auf der Ebene der Muskelfasern (Querschnittsfläche) und zum anderen auf Expressionsebene untersucht (Abb. 3).

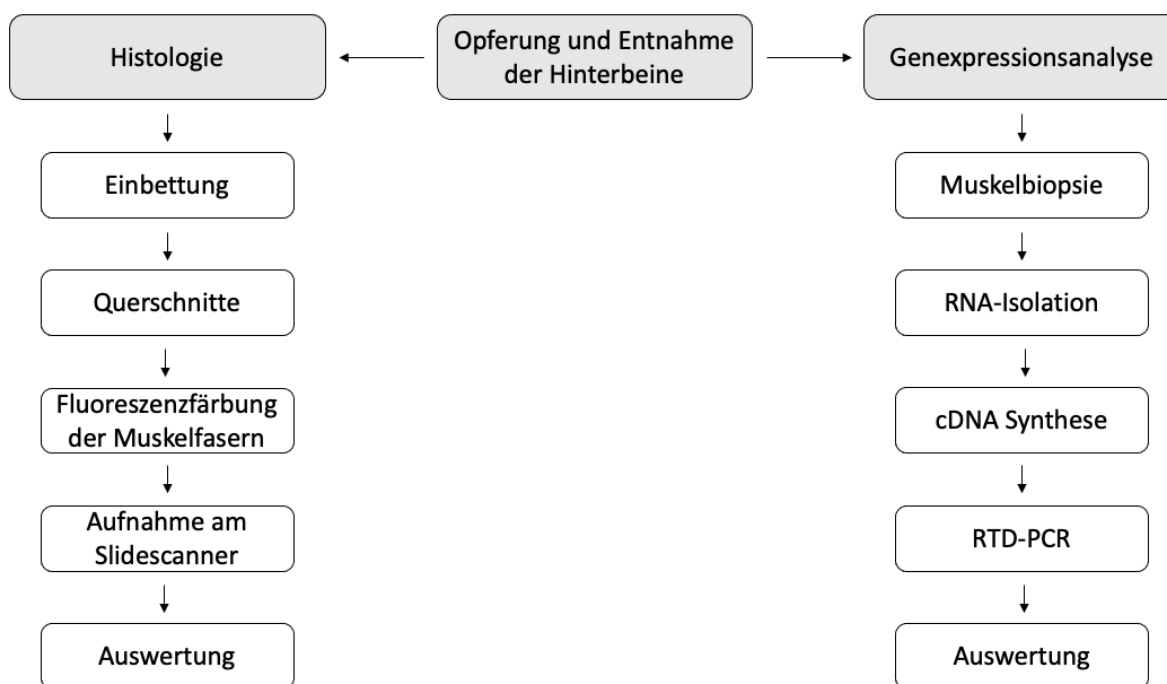


Abb. 3: Fließschema zur Darstellung des Versuchsaufbaus.

3.2.2 OA-Modell der Destabilisierung des medialen Meniskus

Für die Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) wurden zunächst der Isofluran-Verdampfer (MS Schippers, Kerken), das Absaugsystem Fluovac (Mundstück M1: Operationsplatz, Mundstück M2: Vorbereitungsplatz), (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) und die Induktionskammer (RWD Life Science, San Diego, CA, USA) in Betrieb genommen. Der Isofluran-Verdampfer wurde auf 5 % Isofluran und 0,5 L/min Sauerstoff eingestellt. Nach fünf Minuten war das System inklusive Induktionskammer gesättigt.

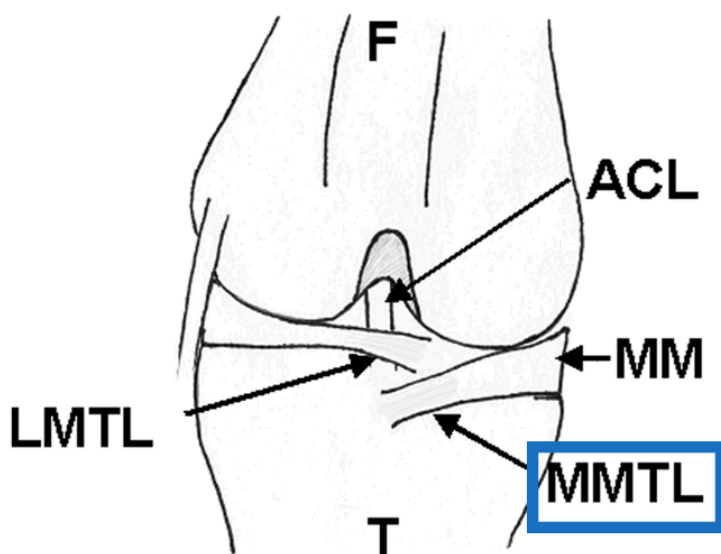


Abb. 4: Anatomische Strukturen des Kniegelenks mit blau hervorgehobenem medialem meniskotibialen Ligament (MMTL), LMTL=laterale meniskotibiale Ligament, F=Femur, ACL=vorderes Kreuzband, MM=medialer Meniskus, T=Tibia (Quelle: Glasson et.al., 2007).

Die Maus wurde zunächst gewogen. Anschließend wurde die Maus initial in der Induktionskammer narkotisiert und anschließend in Rückenlage an das Mundstück M2 des Fluovac-Absaugsystems gelegt. Als nächster Schritt wurde das rechte Bein der Maus enthaart. Danach wurde die Maus zum Operationsplatz in Rückenlage an Mundstück M1 des Fluovac-Absaugsystems gelegt und das Bein desinfiziert. Es wurde wie folgt bei den entsprechenden DMM- und sham-Tieren fortgefahren:

Ein 5 mm langer Hautschnitt wurde nahe der Patella mittels einer Schere gesetzt. Daraufhin wurden die Muskeln und Faszien nahe der Patella mit einem Skalpell und Stereo-Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) präpariert und ein Prolene 8-0 (Ethicon, Raritan, NJ, USA) Faden unter der Sehne hindurch gezogen, um die Patella

und das Fatpad lateral zu luxieren und den Gelenkspalt sichtbar zu machen. Mittels eines Skalpells wurde unter der Patella entlang in tibialer Richtung das mediale meniskotibiale Band (MMTL) durchtrennt (Abb. 4). Bei erfolgreicher Durchtrennung war der gesamte Meniskus beweglich. Als nächster Schritt wurde die Gelenkkapsel und die Wunde verschlossen. Bevor das Tier aus der Narkose erwachte, erfolgte die postoperative Analgesie mittels Carprofen (5 mg/kg), (Zoetis, Parsippany, NJ, USA). Die postoperative Analgesie mittels Carprofen wurde noch für zwei Tage nach der OP fortgesetzt. Der Eingriff dauerte 15 Minuten.

Die sham-Operation (sham-OP) erfolgte identisch, jedoch wurde nach Öffnung des Gelenkspaltes keine Durchtrennung des MMTL durchgeführt. Der Eingriff dauerte fünf Minuten.

3.2.3 Whole Body Vibration (WBV) Training

Die WBV-Mäuse wurden eine Woche nach der Operation über einen Zeitraum von sieben Wochen fünf Mal pro Woche 15 Minuten am Tag auf einer speziell hierfür angefertigten Vibrationsplatte (Novotec Medical, Pforzheim) bei 15 Hz (Krafteinwirkung: 0,3 g, Amplitude (0,33 mm) vibriert (Abb. 5). Die sham-WBV-Mäuse wurden für die gleiche Zeit auf die Vibrationsplatte gestellt, ohne der Vibration ausgesetzt zu sein (sham-Behandlung). Als Vergleichsgruppe dienten unbehandelte Mäuse (Naivmäuse) zum Startzeitpunkt (0 Wochen). Nach den Beobachtungszeiträumen wurden die Versuchstiere durch eine finale Blutentnahme aus dem Herzen getötet und die Hinterbeine für weitere Untersuchungen entnommen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Oberschenkelmuskulatur der Hinterbeine untersucht. Die Region von Interesse befindet sich im Bereich distal oberhalb des Knies bis proximal kurz vor dem Femurkopf.



Abb. 5: Vibrationsplatte für das WBV-Training der Mäuse.

3.2.4 Histologie

3.2.4.1 Einbettung der Oberschenkelmuskulatur in Paraffin

Die Oberschenkelmuskulatur der Hinterbeine wurde zunächst in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C für 24 Stunden fixiert. Danach wurde das Gewebe mit destilliertem Wasser gespült und in 14 % EDTA bei 4 °C für 9 Tage entkalkifiziert, wobei alle zwei Tage das EDTA gewechselt wurde. Nach anschließender Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte die Entwässerung des Gewebes durch eine aufsteigenden Alkoholreihe. Nach der Behandlung des Gewebes mit Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe) wurde das Gewebe in einer Einbettkassette (Carl Roth, Karlsruhe) in Paraffin eingebettet.

3.2.4.2 Anfertigung der histologischen Schnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten Oberschenkeln der Mäuse wurden 5 µm dünne histologische Schnitte angefertigt. Pro Oberschenkel wurden fünfzig serielle Querschnitte angefertigt. Aus diesen 50 Querschnitten wurden jeweils die mit der maximalen Fläche des VIM (gut sichtbare Abgrenzung zu benachbarten Muskelgruppen, Abb. 6) ausgewählt, um zu gewährleisten, dass in allen Proben der Muskelbauch ausgewertet wird.

3.2.4.3 WGA-Fluoreszenzfärbung

Die Querschnitte der Oberschenkelmuskulatur wurden mit Alexa Fluor 555 konjugiertem WGA in einer 1:400 Verdünnung (2,5 µg/mL), (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI in einer Verdünnung von 1:200 (5 µg/mL), (Roche Holding AG, Basel, Schweiz). WGA

bindet mit hoher Affinität an Kohlenhydratketten, wodurch die einzelnen Zellmembranen der Muskeln und Muskelfasern voneinander abgrenzbar waren. DAPI interkaliert mit der DNA, somit konnten die Zellkerne dargestellt werden. Die Färbung mit DAPI erfolgte zur Kontrolle und Orientierung auf den Schnitten. Für die Auswertung der CSA wurden die Schnittbilder in WGA-Färbung verwendet.

Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst bei 60 °C eine Stunde lang inkubiert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate für 15 Minuten in einem Citratpuffer demaskiert. Danach wurde eine Blocklösung (PBS + 10 % normales Eselserum + 0,1 % Triton X-100) aufgetragen und die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde aufbewahrt. Die Schnitte wurden mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und anschließend 2 Stunden mit WGA und DAPI bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem Waschen mit PBS wurden die gefärbten Schnitte mit Fluoromount G (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die gefärbten Oberschenkelquerschnitte wurden durch die Zentrale Biomaterialbank der Charité (ZeBanC), Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin mithilfe eines NanoZoomer HT 2.0 Objektträger-Scanners (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) im Ganzen digitalisiert (Fluoreszenz Modus; Anregung bei 555 nm), (Abb. 6).

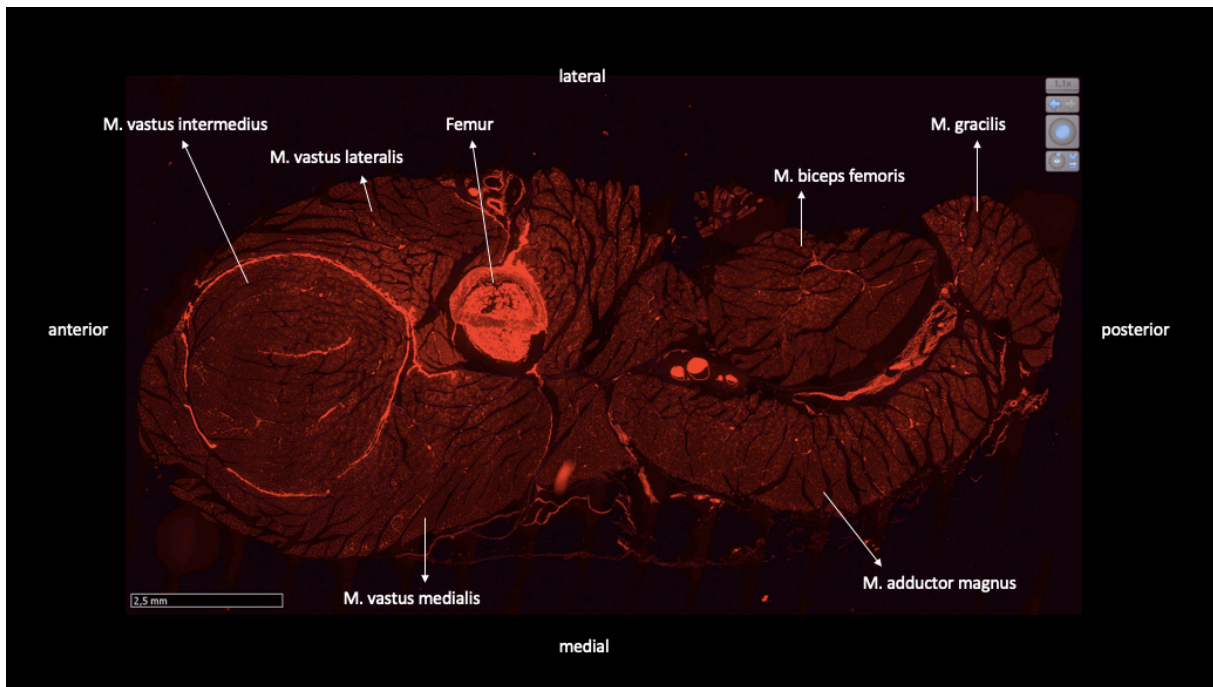


Abb. 6: Fluoreszenzscan (555 nm Anregung) eines WGA 555 gefärbten Querschnitts durch die Oberschenkelmuskulatur der Maus.

3.2.4.4 Automatisierte Auswertung der CSA

Um den Effekt des Vibrationstrainings beurteilen zu können, wurden vier verschiedene Regionen des VIM, *Pars anterior*, *posterior*, *lateralis* und *medialis* (Abb. 7), ausgewertet.

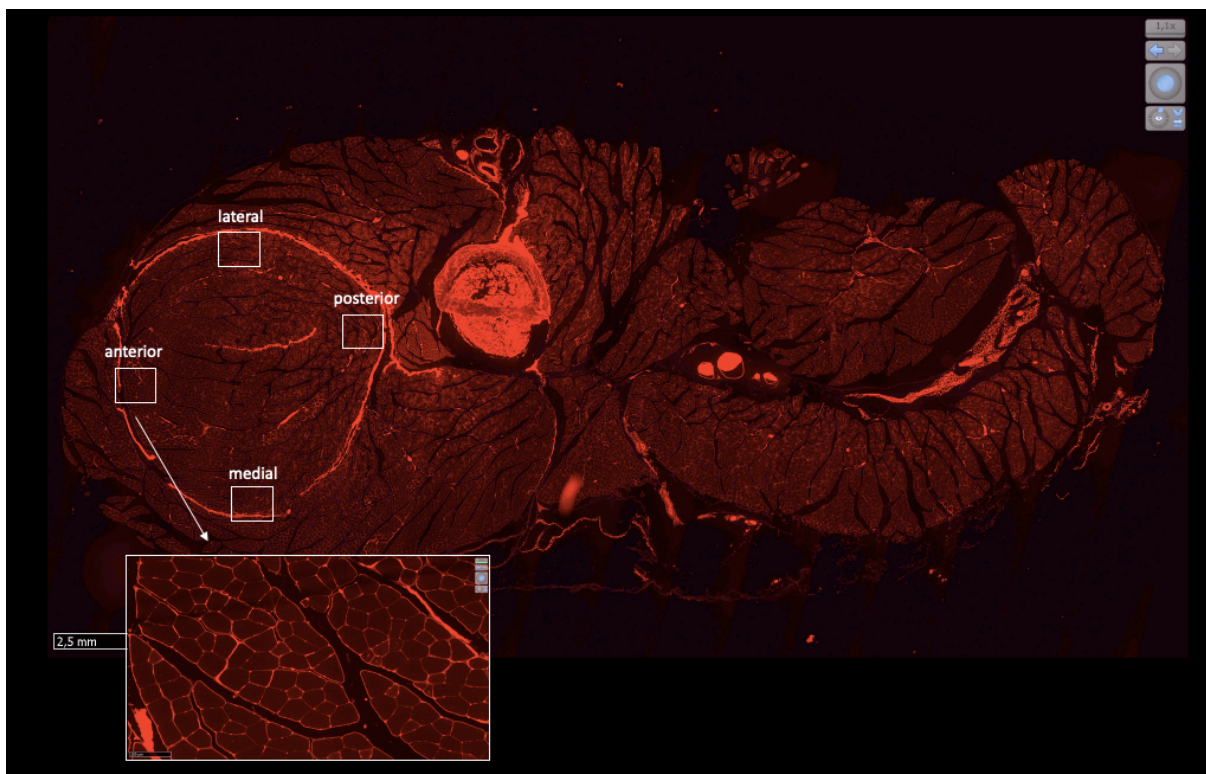


Abb. 7: Untersuchte Bereiche des Musculus vastus intermedius.

Die Regionen wurden mittels des Programms NDP.view 2 Version 2.6.8.0 (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) in 20-facher Vergrößerung exportiert und dann mit dem Programm ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) manuell, wie im Folgenden beschrieben, für die Auswertung bearbeitet.

Zur automatisierten Auswertung der Querschnittsfläche der Muskelfasern (*cross sectional area* [CSA]), wurde in Kooperation mit dem Zuse Institut/Computational Systems Biology der Freien Universität Berlin von Dr. Vikram Sunkara ein spezieller Python-Code (Abb. 8) entwickelt (Rettig *et al.*, 2019). Das Programm detektiert und errechnet abgegrenzte Flächen in einem schwarz-weiß Bild. Es waren folgende Bildbearbeitungsschritte notwendig:

In ImageJ wurde das NDP.view 2 exportierte Bild in ein 8-bit, schwarz-weißes Bild umgewandelt. Bei der Umwandlung in ein schwarz-weißes Bild waren die einzelnen Membranen teilweise nicht deutlich voneinander abzugrenzen. Der Python-Code benötigt zur automatisierten Auswertung eine weiße Fläche, welche die Faser darstellt, die komplett von einer schwarzen Linie umrandet wird. Um dies zu gewährleisten, mussten manuell undeutliche Membranen mit einer schwarzen Linie nachgezogen werden. Um dies originalgetreu tun zu können, wurde stets das Originalbild, das in

NDP.view 2 erzeugt wurde, zum Vergleich hinzugezogen. Darüber hinaus wurden ebenfalls Artefakte aus dem Bild entfernt, um keine falschen Faserflächen zu erfassen.

Im letzten Schritt wurde das mit ImageJ bearbeitete Bild mittels der Python Entwicklungsumgebung Spyder Version 3 (MIT License, Cambridge, MA, USA) in den Python-Code implementiert (Abb. 8). Die Pixelzahl einer Muskelfaser wurde mithilfe einer Skalierung in Microsoft Excel zu einer Fläche in μm^2 umgerechnet.

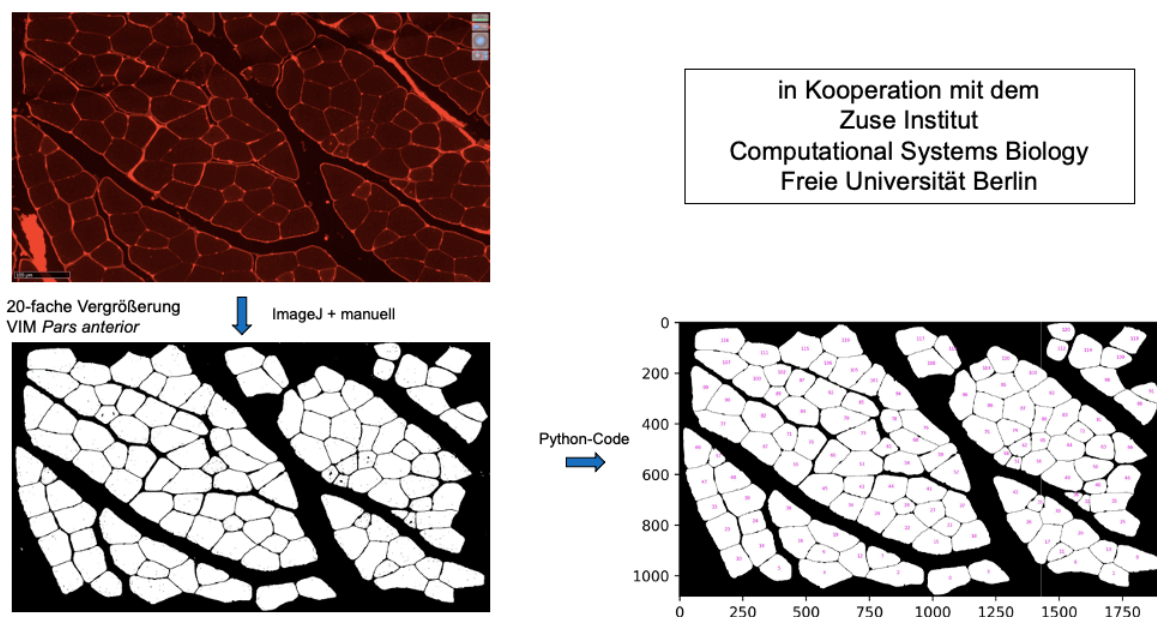


Abb. 8: Bildbearbeitung und halb-automatisierte Auswertung der CSA (Quelle: Rostowski, 2018).

3.2.5 Methoden zur Untersuchung der Genexpression im *M. quadriceps femoris* (QF) mittels *Real Time Detection PCR* (RTD-PCR)

3.2.5.1 RNA-Isolation aus dem *M. quadriceps femoris* (QF)

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme erfolgte die Tötung durch eine finale Blutentnahme aus dem Herzen unter Isoflurannarkose. Es wurden zunächst die gesamten Hinterbeine entnommen und anschließend Muskelbiopsien in flüssigem Stickstoff gefroren.

Für die RNA-Isolierung aus den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Mausmuskeltgeweben wurden die Muskelgewebestücke zunächst im gefrorenen Zustand gewogen. Pro Isolation wurden nicht mehr als 30 mg Gewebe eingesetzt. Als erster Schritt wurde das tiefgefrorene Gewebe unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Gewebepulverisierer (Fisher Scientific, Hampton, VA, USA) pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde mit einem Gemisch aus RLT-Puffer und β -

Mercaptoethanol (β -MCE) überschichtet (Verhältnis von 1 mL RLT-Puffer zu 10 μ L β -MCE). Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert und mit einer Spritze und Kanüle (22G) homogenisiert. Anschließend wurde RNase-freies Wasser und Proteinase K Lösung (20 mg/mL, >600 mAU/mL), (Qiagen, Hilden) zu dem Homogenat hinzugefügt. Das Homogenat wurde bei 55 °C für 30 Minuten inkubiert. Das Homogenat wurde 3 Minuten zentrifugiert (10.000 x g). Der Überstand wurde abgenommen und mit einem Volumen-Äquivalent EtOH 100 % vermischt. Im Anschluss erfolgte die RNA Isolierung mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers. Mit einem NanoDrop ND1000 Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA bei 260 nm gemessen und die Proben anschließend bei -80 °C bis zur Umschreibung in cDNA gelagert.

3.2.5.2 cDNA-Synthese

Die Proben wurden während der Bearbeitung bei 4 °C gekühlt. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die Handschuhe, Utensilien und Arbeitsflächen mit *RNase-Away* (Fisher Scientific, Hampton, VA, USA) behandelt. Für die cDNA-Synthese wurde das Protokoll des Herstellers des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) befolgt. Es wurden jeweils 2000 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Zur Entfernung der genomischen DNA wurden gDNA Wipeout Buffer, RNase freies Wasser und Template-RNA vermischt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 min abgekühlt. Danach wurde der RT-Mastermix (5x Quatiscript RT-Buffer, RT-Primer Mix, Quantiscript Reverse Transcriptase) hergestellt. Im Anschluss wurde der RT-Mastermix zur Template-RNA hinzugefügt und die Proben 15 Minuten bei 42 °C, 3 Minuten bei 95 °C und schließlich bei 4 °C inkubiert. Die cDNA-Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.5.3 Durchführung der RTD-PCR

Die Quantifizierung der in den Muskelzellen vorhandenen Gentranskripte (mRNA) erfolgte mittels RTD-PCR. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde der Arbeitsplatz zusätzlich zu den weiter oben genannten Maßnahmen mit einer UV-Lampe für 10 Minuten bestrahlt. Zunächst wurde die bei -20 °C gelagerte cDNA aufgetaut. Anschließend wurde die cDNA mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/ μ L verdünnt und mit 2X SYBR Green PCR Mastermix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) vermischt. Für den Primer-Mix wurden der Forward Primer (2 μ M) und Reverse Primer (2 μ M) der zu untersuchenden Gensequenz miteinander vermischt. Für einen 10 μ L PCR-Ansatz wurde eine Konzentration von 1 ng/ μ L cDNA

verwendet. Die Messung erfolgte in einer 96-well PCR-Platte. Diese enthielt Triplikate des Haushaltsgens (*Gapdh*), des zu untersuchenden Gens und der Negativkontrolle ohne cDNA. Unter Kühlung der PCR-Platte wurden 4 μL Primer-Mix mit jeweils 6 μL cDNA/SYBR Green PCR Mastermix in die Kavitäten der PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde die PCR-Platte mit einer Dichtungshafffolie für PCR-Platten abgedeckt. Nachdem die PCR-Platte zentrifugiert wurde, wurde diese in dem StepOnePlus Real-Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) platziert. Die Datenerfassung erfolgte mittels der StepOne Real-Time PCR System Software Version 2.3 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Die verwendete Thermalsequenz für die RTD-PCR ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Thermalsequenz für die RTD-PCR (Quelle: in Anlehnung an das StepOnePlus Real-Time PCR System Handbuch)

Step	AmpliTaq Gold Polymerase Activation	PCR	
	HOLD	CYCLE (36 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Temperature	95.0 °C	95.0 °C	60.0 °C
Time	10 min	15 sec	1 min
Volume	10 μl		

3.2.5.4 Methode zur Berechnung der mittleren normalisierten Expression

Zur Berechnung der mittleren normalisierten Expression (MNE) wurde die delta-delta CT-Methode (ddCT-Methode) verwendet. Zunächst wurde für jeden Primer die Primereffizienz mit der Verdünnungsreihenmethode bestimmt. Die Primereffizienzen für das Zielgen (E_{target}) und das Haushaltsgen ($E_{\text{reference}}$) wurden bei der Berechnung der MNE berücksichtigt (Simon, 2003). Der Mittelwert und Standardabweichung aus den Triplikaten des *Cycle Threshold* (CT) wurde für das Zielgen ($CT_{\text{target,mean}}$ und $SE_{CT_{\text{target,mean}}}$) und Haushaltsgen ($CT_{\text{reference,mean}}$ und $SE_{CT_{\text{reference,mean}}}$) bestimmt. Ausreißer wurden entfernt und von der Auswertung ausgeschlossen, wenn die Standardabweichung größer als 0,5 war. Anschließend wurde die MNE mithilfe der nachfolgenden Formel (Abb. 9) berechnet (Simon, 2003).

$$\text{MNE} = \frac{(E_{\text{reference}})^{C_{\text{Treference,mean}}}}{(E_{\text{target}})^{C_{\text{Ttarget,mean}}}}$$

Abb. 9: Formel zur Berechnung der mittleren normalisierten Expression (MNE), (Quelle: Simon, 2003)

3.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité (iBikE). Die Expression der Gene in den Proben des OA-Verlaufs und der WBV-Versuche wurden auf das Haushaltsgen *Gapdh* normalisiert. Die CSA-Mittelwerte und die mittlere normalisierte Expression (MNE) wurden zunächst auf Ausreißer mittels Grubbs-Test hin überprüft. Der Kolmogorov-Smirnov-Test konnte die Normalität der Werte aus den histologischen (OA-Verlauf und WBV) und den genetischen Analysen des OA-Verlaufs nicht widerlegen. Für die Werte aus der genetischen Analyse der WBV-Versuche konnte die Normalität mittels KS-Test widerlegt werden. Da wir vor allem den Einfluss der operativen Eingriffe (sham-OP und DMM-OP) innerhalb der Versuchsgruppen (DMM vs. DMM, sham vs. sham, DMM vs. sham, naiv vs. sham, naiv vs. DMM) testen wollten, haben wir uns bei dem statistischen Vergleich des OA-Verlaufs für die histologische und genetische Analyse für eine zweifaktorielle ANOVA und anschließend ein Holm-Sidak Test mit adjustierten p-Werten entschieden. Da wir bei der Auswertung der WBV-Versuche (histologisch) vor allem den Einfluss der OA (sham-WBV [CO] vs. sham-WBV [OA]) und der WBV als Intervention (sham-WBV [OA] vs. WBV [OA]) messen wollten, wurde zunächst eine einfaktorielle ANOVA und anschließend ein multipler t-Test mit adjustierten p-Werten durchgeführt. Die Auswertung der WBV-Versuche (genetisch) erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Der statistische Vergleich der unbehandelten Mäuse (naiv, histologisch) erfolgte mit einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Tukey-Test mit adjustierten p-Werten, da die Unterschiede der CSA zwischen den vier exemplarischen Regionen des VIM dargestellt werden sollte. Der statistische Vergleich der Gewichtsentwicklung (OA vs. sham, sowie WBV vs. sham-WBV) erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, um Unterschiede in der Gewichtsentwicklung innerhalb der Gruppen über den Versuchszeitraum darzustellen.

Tabelle 10: Darstellung der statistischen Analyse

Testgruppe	Varianzanalyse	Post-hoc-Test
OA-Verlauf (histologisch)	Zweifaktorielle ANOVA	Holm-Sidak Test
OA-Verlauf (genetisch)	Zweifaktorielle ANOVA	Holm-Sidak-Test
WBV (histologisch)	Einfaktorielle ANOVA	Multipler t-Test
WBV (genetisch)	Kruskal-Wallis-Test	
Unbehandelte Mäuse CSA	Einfaktorielle ANOVA	Tukey-Test
Gewichtsentwicklung	Zweifaktorielle ANOVA	

4 Ergebnisse

4.1 Zusammenfassung der Experimente

Die Experimente betrachteten die Oberschenkelmuskulatur in einem Mausmodell, bei dem durch Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) eine Arthrose im Kniegelenk induziert wurde. Darüber hinaus wurde der Effekt der WBV auf die Oberschenkelmuskulatur in DMM-Mäusen in einem siebenwöchigen Training erprobt. Die für die Versuche verwendeten Mäuse haben alle bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme überlebt. Sowohl die induzierte OA als auch das WBV-Training hatten keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraumes gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren (sham OP bzw. sham-WBV, Abb. 10, Abb. 11).

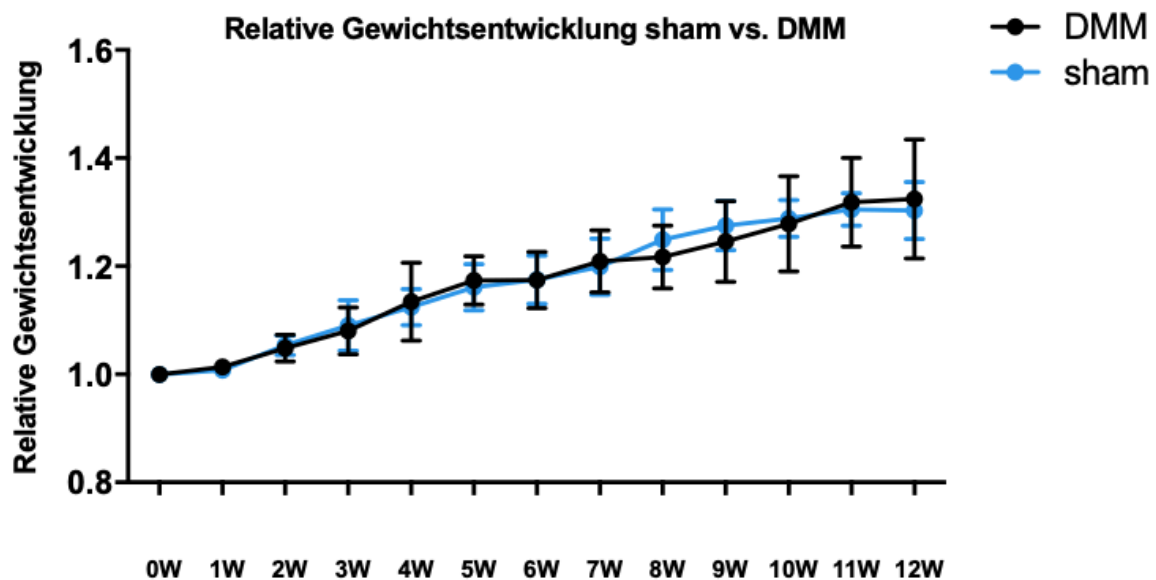


Abb. 10: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Gewichtsentwicklung von den sham- vs. DMM-Mäusen über 12 Wochen (W).

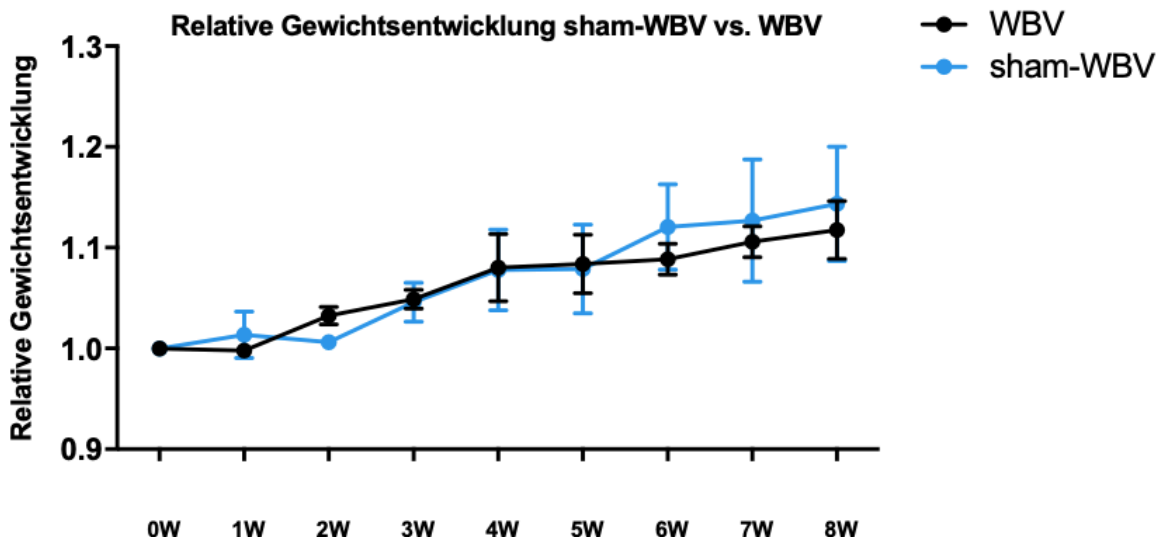


Abb. 11: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Gewichtsentwicklung von den sham-WBV- vs. WBV-Mäusen über 8 Wochen (W).

In den Experimenten wurden nach der Probenentnahme zunächst histologische Schnittbilder der Oberschenkelmuskulatur angefertigt und die *cross sectional area* (CSA) des *M. vastus intermedius* (VIM) ausgewertet. Die computergestützte CSA Auswertung erlaubte die semi-automatische Analyse ohne menschliche Einflussnahme von 250-800 Muskelfasern pro Probe.

Im Anschluss wurde mittels RTD-PCR die Transkription ausgewählter Gene in den Muskelfasern des *M. quadriceps femoris* gemessen.

Tabelle 11: Kurzbeschreibung der Funktion der mittels RTD-PCR untersuchten Gene

Untersuchtes Gen		Funktion
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	<ul style="list-style-type: none"> • Haushaltsgen
Ppargc1a	Peroxisome Proliferator-Aktivierter Rezeptor gamma Coactivator-1-alpha	<ul style="list-style-type: none"> • Festlegung des Muskelfasertyps • Transkriptionscoaktivator für an Energiestoffwechsel beteiligten Gene • Beteiligt an Biogenese von Mitochondrien
Igf1	Insulinartiger Wachstumsfaktor 1	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstumsfaktor
Bmp4	Knochenmorphogenetisches Protein 4	<ul style="list-style-type: none"> • Liganden für TGF-β-Rezeptor • Fördert Adipogenese
Bmp6	Knochenmorphogenetisches Protein 6	<ul style="list-style-type: none"> • Liganden für TGF-β-Rezeptor • Fördert Knochenwachstum
Axl	AXL Rezeptor-Tyrosinkinase	<ul style="list-style-type: none"> • Rezeptor-Tyrosinkinase • Zellproliferation • Antiinflammatorisch
Myh1	Myosin 1	<ul style="list-style-type: none"> • Kontraktiler Protein

<i>Mstn</i>	Myostatin	<ul style="list-style-type: none"> • Ligand für TGF-β-Rezeptor • Hemmt Proliferation und Differenzierung von Skelettmuskelzellen
<i>Fbxo32</i>	F-Box Protein 32	<ul style="list-style-type: none"> • F-Box-Protein • Abbau von Muskelzellbestandteilen • Fördert Muskelatrophie
<i>Trim63</i>	Tripartite Motif Containing 63	<ul style="list-style-type: none"> • Zinkfingerprotein, Ringtyp • Abbau vom Kontraktionsapparat • Fördert Muskelatrophie
<i>Atp2a1</i>	Sarcoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase 1	<ul style="list-style-type: none"> • SERCA Ca²⁺-ATPase • Fördert Muskelrelaxation
<i>Atp2a2</i>	Sarcoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase 2	<ul style="list-style-type: none"> • SERCA Ca²⁺-ATPase • Fördert Muskelrelaxation

Die Konzentration der umgeschriebenen cDNA lag zwischen 40 ng/ μ l und 50 ng/ μ l.

4.2 Effekt der Arthrose auf die Oberschenkelmuskulatur

4.2.1 Auswertung der Muskelfaserquerschnittsfläche (CSA) im OA-Verlauf über 12 Wochen

Die Beurteilung der CSA des VIM erfolgte in 4 Regionen, *Pars anterior, posterior, lateralis und medialis*. Zu den Beobachtungszeitpunkten 2, 4, 6, 8, und 12 Wochen wurden je 3 DMM- und sham-Mäuse untersucht.

Darüber hinaus wurden unbehandelte Mäuse (naiv) zum Startzeitpunkt (0 Wochen, n=3), betrachtet.

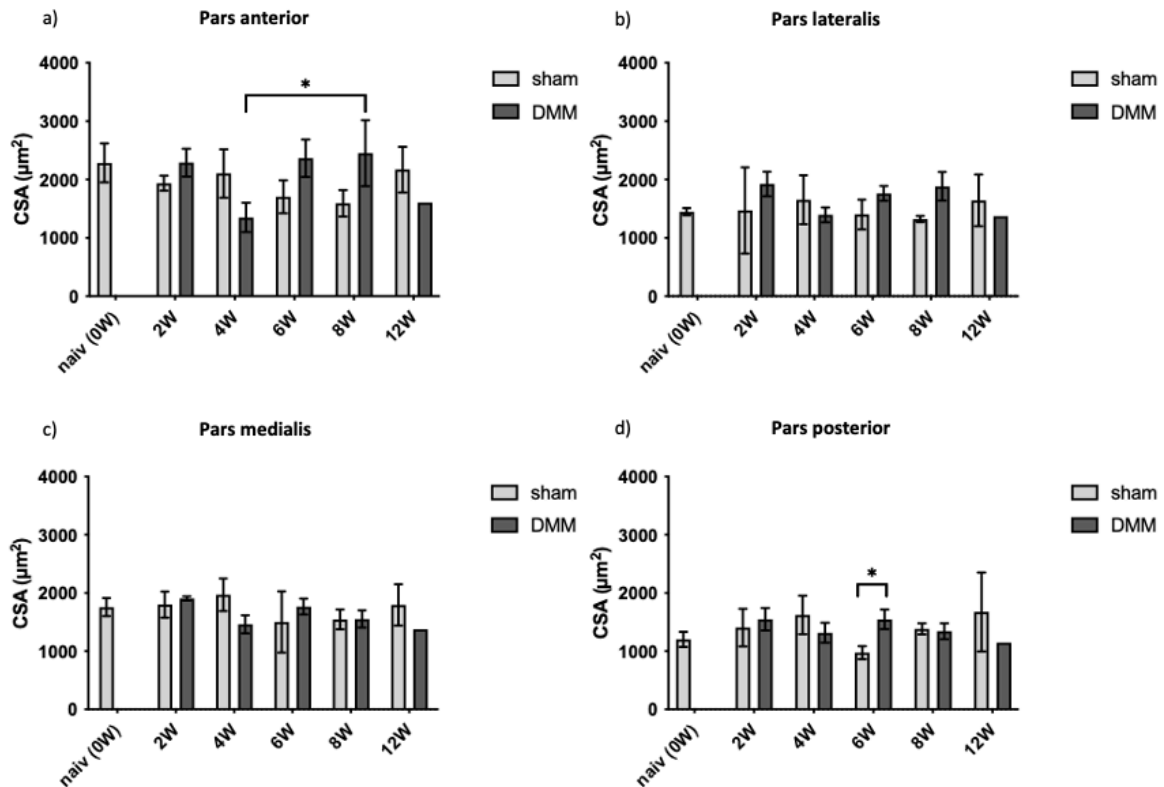


Abb. 12: Darstellung des Mittelwertes und Standardabweichung der CSA in den sham- und DMM-Mäusen im Vergleich zu den Naivmäusen über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen (W) in vier verschiedenen Regionen des VIM. a) Pars anterior b) Pars lateralis c) Pars medialis d) Pars posterior. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$ angegeben.

Unbehandelte Mäuse (naiv) wiesen eine CSA von $2284,29 \mu\text{m}^2$ mit SD $332,98 \mu\text{m}^2$ im *Pars anterior*, $1449,80 \mu\text{m}^2$ mit SD $62,31 \mu\text{m}^2$ im *Pars lateralis*, $1755,84 \mu\text{m}^2$ mit SD $154,51 \mu\text{m}^2$ im *Pars medialis* und $1197,85 \mu\text{m}^2$ mit SD $129,40 \mu\text{m}^2$ im *Pars posterior* auf (Abb. 13).

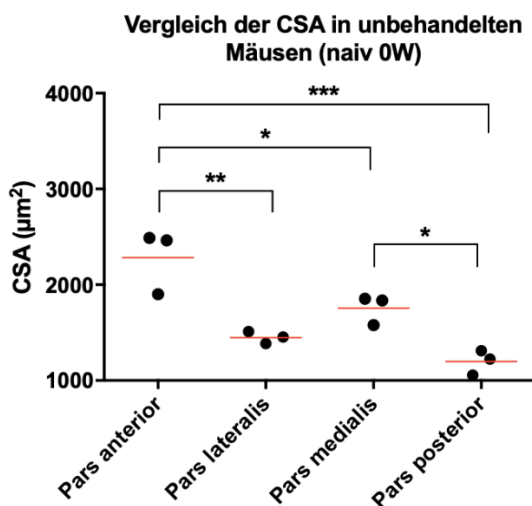


Abb. 13: Vergleich der CSA in den Bereichen Pars anterior, Pars lateralis, Pars medialis und Pars posterior in unbehandelten Mäusen (naiv).

Der Tukey post-hoc-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Regionen innerhalb des VIM in unbehandelten Mäusen (Abb. 13). Es fiel vor allem eine signifikant größere CSA im *Pars anterior* im Vergleich zu den anderen Regionen des VIM auf (*Pars anterior* vs. *Pars lateralis* $p=0,0037$, *Pars anterior* vs. *Pars medialis* $p=0,0446$, *Pars anterior* vs. *Pars posterior* $p=0,0007$). Der *Pars posterior* wies die kleinste CSA innerhalb des VIM auf (Abb. 13).

In allen Regionen waren die CSAs zu keinem Untersuchungszeitpunkt nach OA-Induktion signifikant verändert zur entsprechenden unbehandelten (naiv, 0W) Gruppe (Abb. 12).

Darüber hinaus gab es bis auf eine Ausnahme (*Pars posterior* 6 Wochen, $p=0,0377$ [Holm-Sidak post-hoc-Test], Abb. 12 d) zu keinem Beobachtungszeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der CSA zwischen DMM- und sham-OP Gruppen.

4.2.2 Auswertung der Genexpression im OA-Verlauf über 12 Wochen

Die Beurteilung der Genexpression ausgewählter Gene erfolgte an Biopsien des *Musculus quadriceps femoris*. Zu den Beobachtungszeitpunkten 2, 4, 6, 8, und 12 Wochen wurden je 3 DMM- und 3 sham-Mäuse untersucht. Darüber hinaus wurden unbehandelte Mäuse (naiv) zum Startzeitpunkt (0 Wochen, $n=3$), betrachtet.

Die Expression der untersuchten Gene wurde auf das Haushaltsgen (*Gapdh*) normalisiert. *Gapdh* wurde aus einer Gruppe von Haushaltsgenen ausgewählt, da es in unseren Voruntersuchungen die geringsten Expressionsschwankungen bei der

Mausmuskel cDNA hatte. Die OA- oder sham-OP, sowie der Beobachtungszeitpunkt hatten keinen Einfluss auf die *Gapdh* Expression.

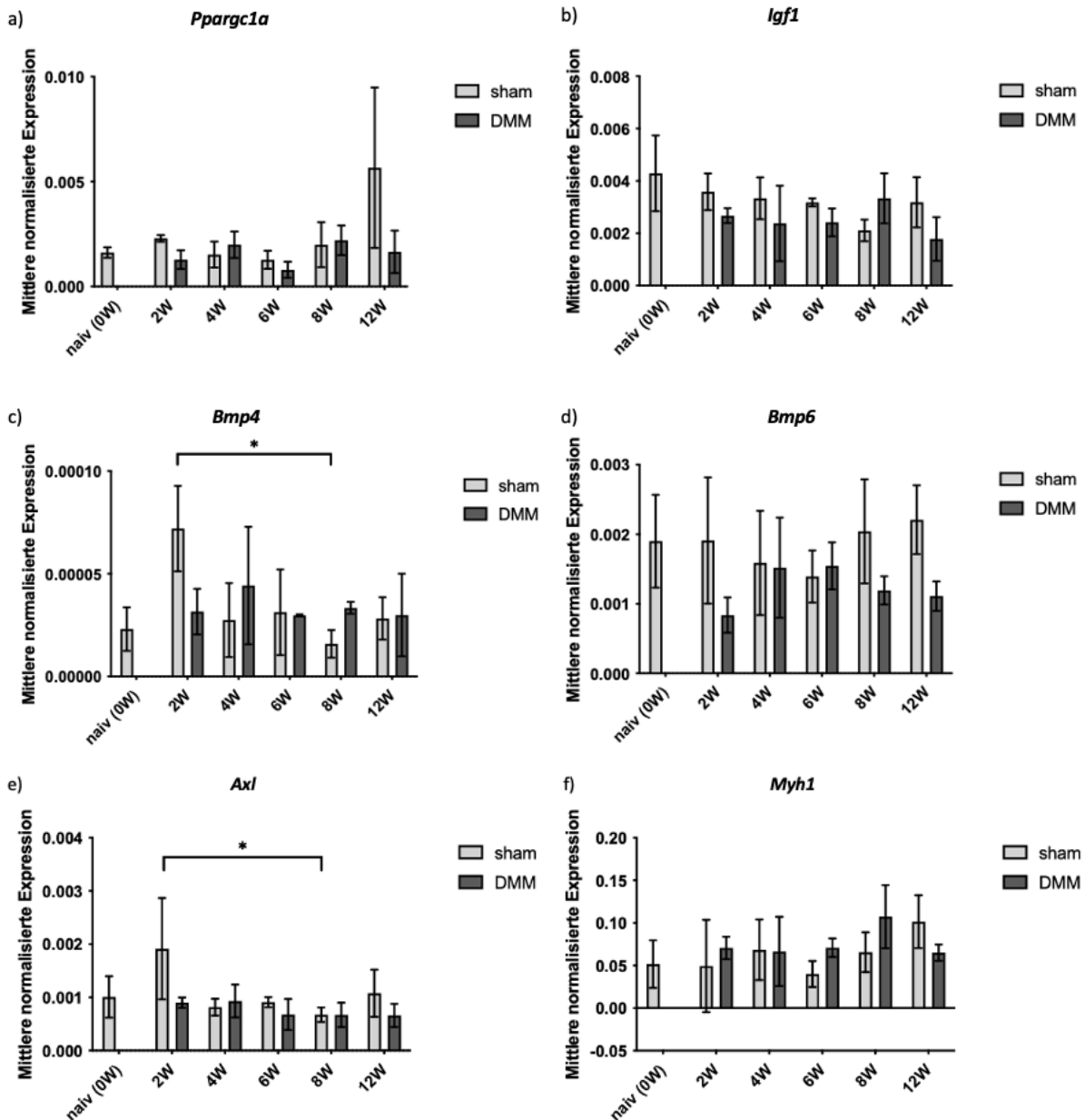


Abb. 14: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter anabol-wirkender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) *Ppargc1a* b) *Igf1* c) *Bmp4* d) *Bmp6* e) *Axl* f) *Myh1*. Signifikanz wird mit * $p < 0,05$ angegeben.

Die Genexpressionsanalyse zeigte in allen untersuchten anabol-wirkenden Genen keine signifikanten Unterschiede zwischen den DMM- und sham-Mäusen (Abb. 14). Auch im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (naiv) gab es bei keinem der

untersuchten anabol-wirkenden Gene signifikante Unterschiede (Abb. 14). Der Holm-Sidak post-hoc-Test zeigte innerhalb der sham-Mäuse eine Abnahme der Expression von *Bmp4* ($p=0,0161$) und *Axl* ($p=0,0177$) zwischen Woche 2 und Woche 8 (Abb. 14 c, e).

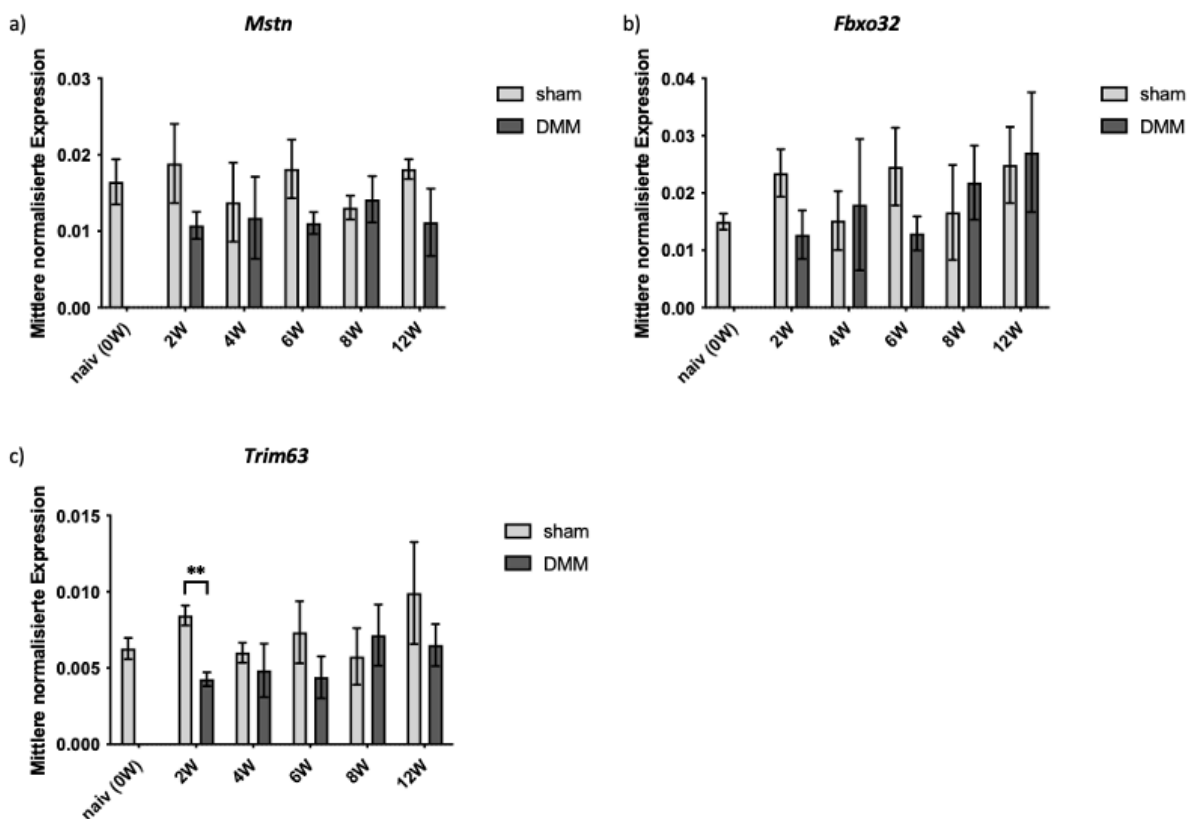


Abb. 15: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter katabol-wirkender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) *Mstn* b) *Fbxo32* c) *Trim63*. Signifikanz wird mit $*p<0,05$, $**p<0,01$ angegeben.

Für die drei untersuchten katabol-wirkenden Gene konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Mäusen (naiv) und den Mäusen nach sham- bzw. DMM-OP nachgewiesen werden (Abb. 15). *Trim63* wurde in Woche 2 in den DMM-Mäusen signifikant geringer transkribiert ($p=0,0033$ [Holm-Sidak post-hoc-Test]) im Vergleich zu den sham-Mäusen (Abb. 15 c). Es konnten zu keinem Zeitpunkt nach OP Unterschiede in der Transkription von *Mstn* und *Fbxo32* zwischen den sham- und DMM-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 15 a, b).

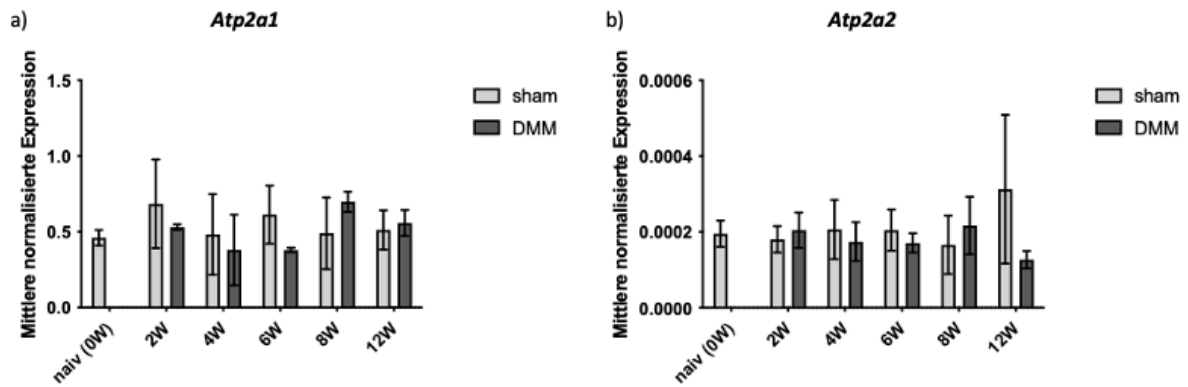


Abb. 16: Entwicklung der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter Muskelaktivität regulierender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham- und DMM-Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von 12 Wochen im Vergleich. a) *Atp2a1* b) *Atp2a2*.

Bei keinem der untersuchten Gene, die die Muskelaktivität regulieren, konnten Unterschiede zwischen sham- bzw. DMM-Mäusen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (naiv) beobachtet werden (Abb. 16). Der Vergleich zwischen den sham- und DMM-Mäusen ergab zu keinem Beobachtungszeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 16).

4.3 Effekt des Vibrationstrainings auf die Oberschenkelmuskulatur

4.3.1 Auswertung der Muskelfaserquerschnittsfläche (CSA) nach Vibrationstraining in OA- und kontralateralen Beinen

Das WBV-Training erfolgte über 7 Wochen, je 5 Tage pro Woche für 15 Minuten bei 15 Hz. Kontrollmäuse erhielten eine sham-Behandlung auf der Vibrationsplatte ohne Vibrationen. Die CSA des VIM wurde sowohl im rechten, OA-induzierten Bein (OA) als auch im kontralateralen, nicht-operierten Bein (CO) gemessen. Es wurden für die Versuche eine Versuchsgruppe von n=3 (OA) und n=2 (CO) Mäusen pro sham-WBV- und WBV-Versuchsgruppe verwendet. Die CSA wurde in den vier Regionen des VIM, *Pars anterior*, *posterior*, *lateralis* und *medialis* analysiert. Die CSA-Mittelwerte der einzelnen Regionen des VIM setzten sich aus 250-800 einzelnen Muskelfasern zusammen.

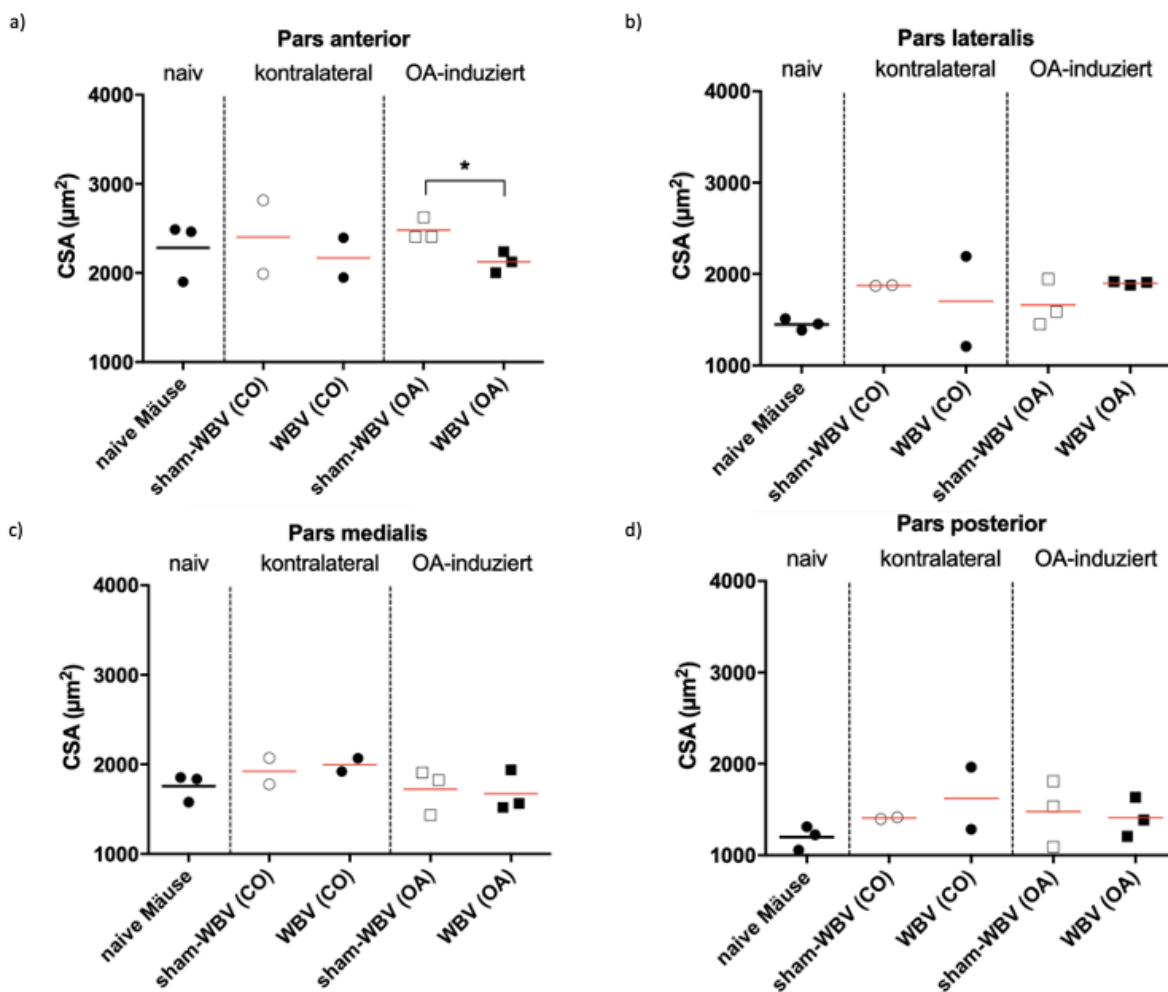


Abb. 17: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der CSA der unbehandelten (naiven) Mäuse im Vergleich zu kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) sham-WBV- und WBV-Mäusen im a) Pars anterior, b) Pars lateralis, c) Pars medialis und d) Pars posterior des VIM nach 8 Wochen. Signifikanz wird mit $*p < 0,05$ angegeben.

Das WBV-Training hatte keinen offensichtlichen Effekt auf die CSA des *Pars anterior*, *Pars lateralis*, *Pars medialis* und *Pars posterior* in den kontralateralen Beinen (sham-WBV [CO] vs. WBV [CO] Abb. 17). Auch die OA-Induktion hatte keinen offensichtlichen Einfluss auf die CSA des *Pars anterior*, *Pars lateralis*, *Pars medialis* und *Pars posterior*, womit die Ergebnisse aus 4.2.1 bestätigt werden (sham-WBV [CO] vs. sham-WBV [OA], Abb. 17). Das WBV-Training führte im *Pars anterior* OA-induzierter Beine zu einer signifikant geringeren CSA ($p = 0,0236$ [post-hoc multipler t-Test]) im Vergleich zum OA-induzierten Bein mit Scheinbehandlung (sham-WBV), (sham-WBV [OA] vs. WBV [OA], Abb. 17 a). Dieser Effekt war im *Pars lateralis*, *Pars medialis* und *Pars posterior* nicht zu beobachten (Abb. 17). Auch im Vergleich zu den

unbehandelten, naiven Mäusen gab es in keiner betrachteten Region einen Unterschied der CSA der sham-WBV- und WBV-Mäuse (Abb. 17).

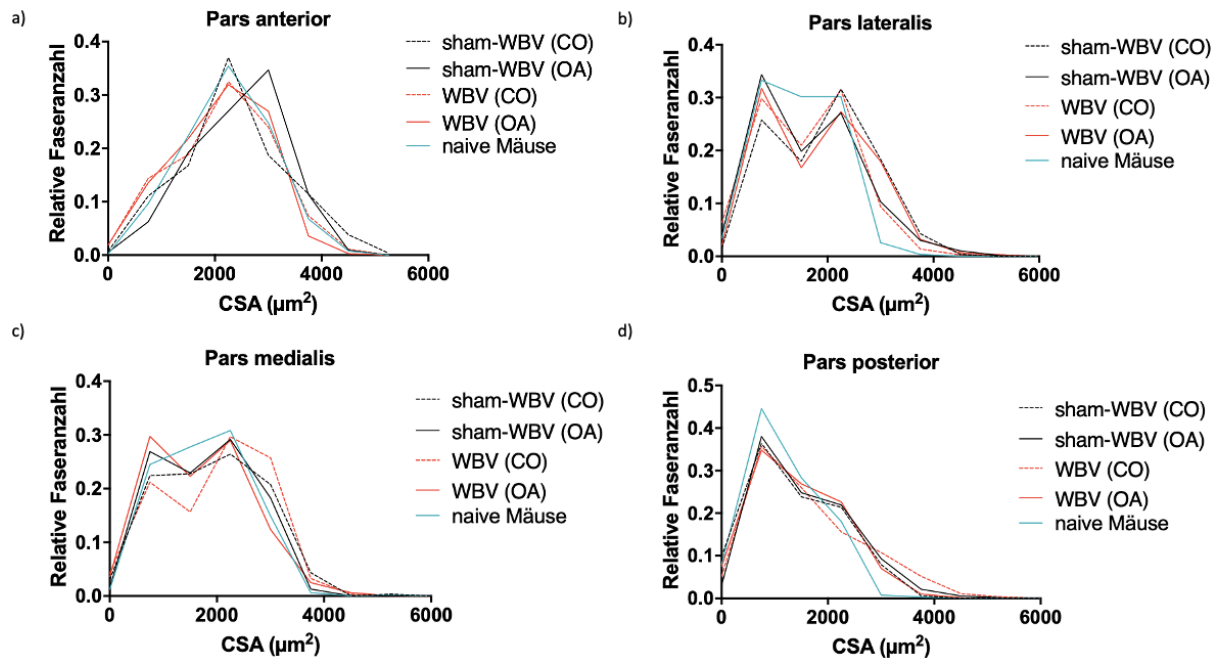


Abb. 18: Histogramm der CSA-Größenverteilung in kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) sham-WBV- und WBV-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten (naiven) Mäusen im a) Pars anterior, b) Pars lateralis, c) Pars medialis und d) Pars posterior des VIM nach 8 Wochen.

Die Darstellung der Fasergrößenverteilung ergab im *Pars anterior* ein Maximum bei $2250 \mu\text{m}^2$ der kontralateralen Beine. Der Scheitelpunkt der OA-induzierten sham-WBV-Mausbeine lag bei $3000 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich zu den OA-induzierten sham-WBV-Mausbeinen zeigten die OA-induzierten WBV-Mausbeine eine Verschiebung des Maximums in Richtung der Kontrollgruppe ($2250 \mu\text{m}^2$, CO und naive Mäuse), (Abb. 18 a).

Die Darstellung der Fasergrößenverteilung ergab im *Pars lateralis* und *Pars medialis* zwei Maxima, jeweils bei $750 \mu\text{m}^2$ und $2250 \mu\text{m}^2$ in den kontralateralen und OA-induzierten Beinen (Abb. 18 b, c).

Im *Pars posterior* lag das Maximum aller vier Kurven, die die Fasergrößenverteilung darstellen, bei $750 \mu\text{m}^2$ (Abb. 18 d).

In keinem der betrachteten Bereiche ergab die Faserverteilung einen Unterschied zu den unbehandelten, naiven Mäusen (Abb. 18).

4.3.2 Einfluss des WBV-Trainings auf die Genexpression

Für die statistische Beurteilung der ausgewählten Gene wurde die Expression mittels RTD-PCR des *Musculus quadriceps femoris* der WBV- und sham-WBV-Mäuse zum Beobachtungszeitpunkt in Woche 8 betrachtet.

Die Beurteilung der Genexpression ausgewählter Gene erfolgte an Biopsien des *Musculus quadriceps femoris*. Es wurde nach einem siebenwöchigen (8 Wochen nach OA-Induktion) WBV-Trainings die Genexpression im rechten, OA-induzierten Bein (OA) als auch im kontralateralen, nicht-operierten Bein (CO) gemessen. Es wurden für die Versuche eine Versuchsgruppe von n=3 (OA) und n=3 (CO) Mäusen pro sham-WBV- und WBV-Versuchsgruppe verwendet.

Die Expression der untersuchten Gene wurde auf das Haushaltsgen (*Gapdh*) normalisiert. Die OA-OP und die WBV hatten keinen Einfluss auf die *Gapdh* Expression.

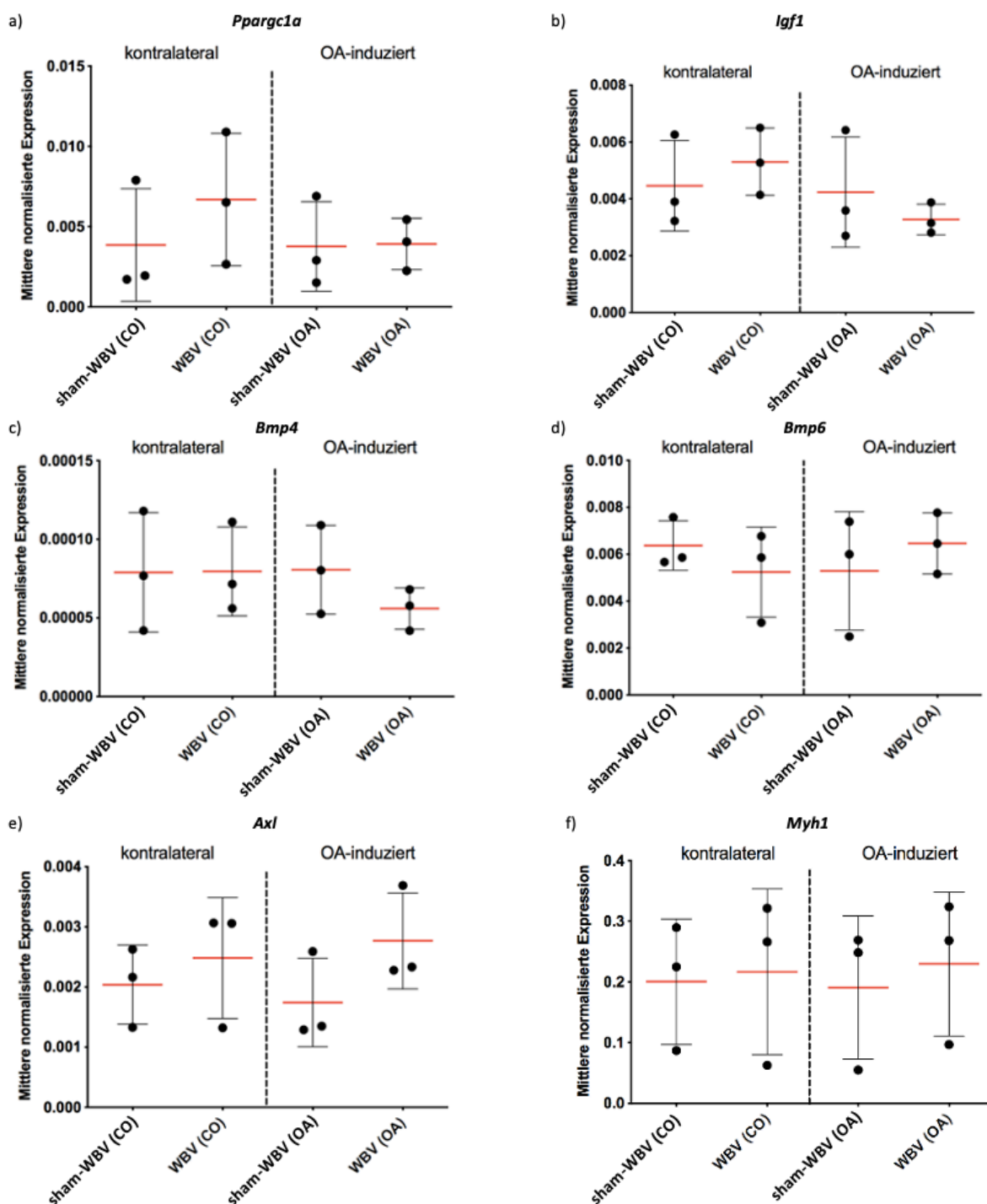


Abb. 19: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter anabol-wirkender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich. a) *Ppargc1a* b) *Igf1* c) *Bmp4* d) *Bmp6* e) *Axl* f) *Myh1*.

Das WBV-Training hatte keinen Effekt auf die Genexpression der untersuchten anabol-wirkenden Gene in den kontralateralen und OA-induzierten Beinen (sham-WBV [CO] vs. WBV [CO], sham-WBV [OA] vs. WBV [OA]), Abb. 19).

Auch die OA-Induktion hatte keinen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten anabol-wirkenden Gene, womit die Ergebnisse aus 4.2.2 bestätigt werden (sham-WBV [CO] vs. sham-WBV [OA], Abb. 19).

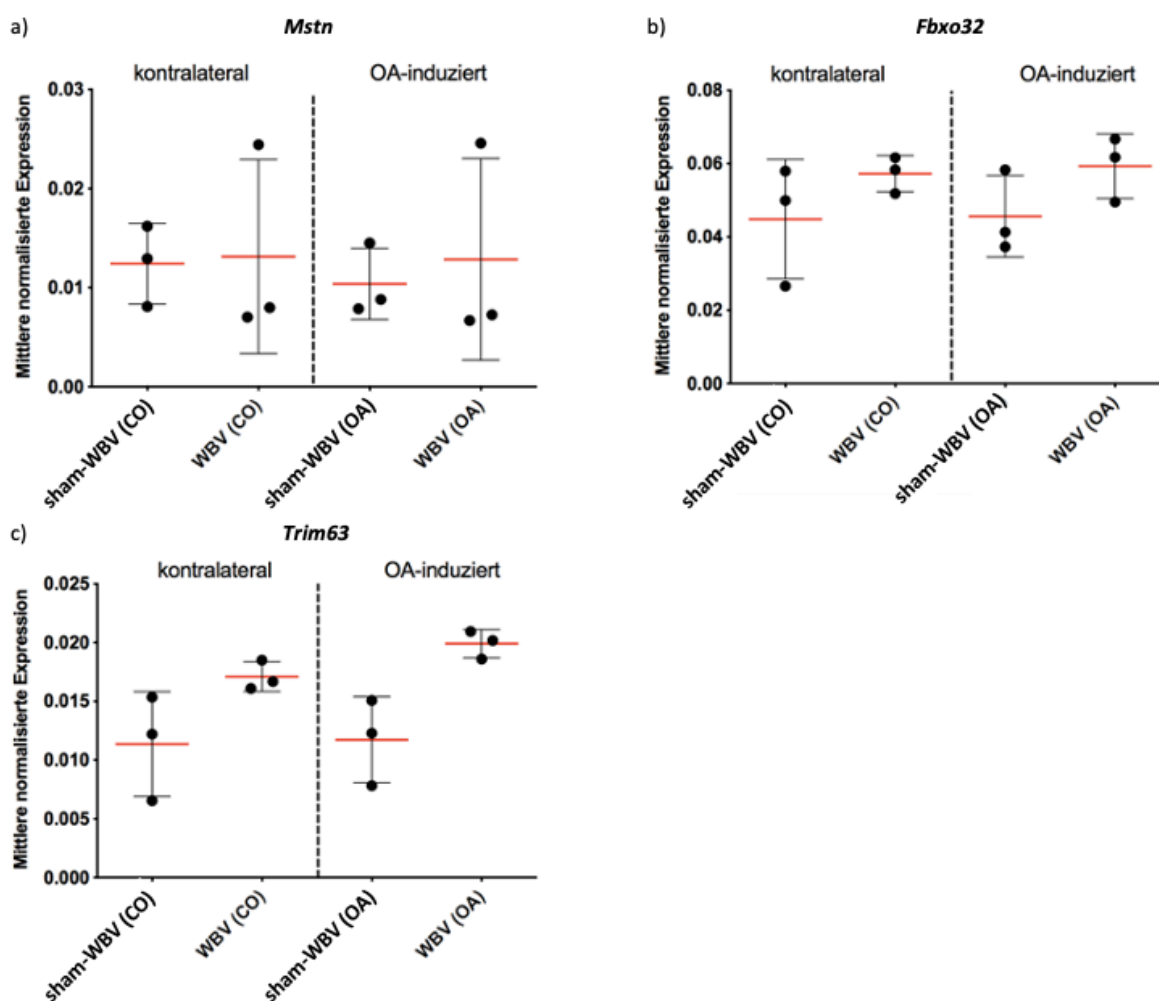


Abb. 20: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter katabol-wirkender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich. a) *Mstn* b) *Fbxo32* c) *Trim63*.

Das WBV-Training hatte keinen Effekt auf die Genexpression der drei untersuchten katabol-wirkenden Gene in den kontralateralen und OA-induzierten Beinen (sham-WBV [CO] vs. WBV [CO], sham-WBV [OA] vs. WBV [OA]), Abb. 20). Auch die OA-Induktion hatte keinen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten katabol-wirkenden Gene (sham-WBV [CO] vs. sham-WBV [OA], Abb. 20).

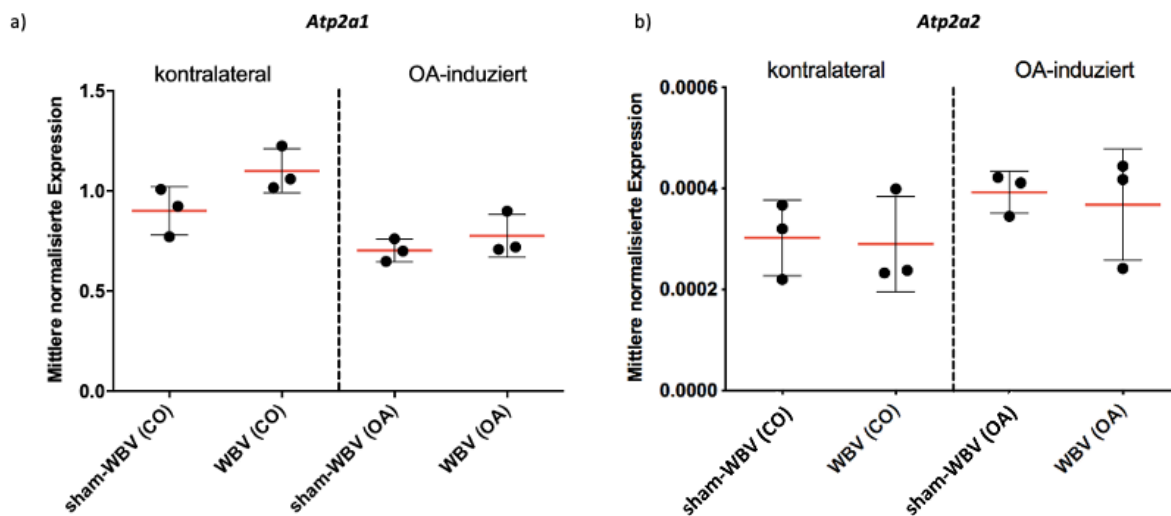


Abb. 21: Vergleich der mittleren normalisierten Expression und Standardabweichung der RTD-PCR Genanalyse ausgewählter Muskelaktivität regulierender Gene im *M. quadriceps femoris* der sham-WBV und WBV kontralateralen (CO) und OA-induzierten (OA) Mausbeine zum Beobachtungszeitpunkt Woche 8 im Vergleich a) *Atp2a1* b) *Atp2a2*.

Innerhalb der kontralateralen und OA-induzierten Gruppen zeigte das WBV-Training keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Muskelaktivitäts-regulierenden Gene (sham-WBV [CO] vs. WBV [CO], sham-WBV [OA] vs. WBV [OA]), Abb. 21). Auch die OA-Induktion hatte keinen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Muskelaktivitäts-regulierenden Genen, womit die Ergebnisse aus 4.2.2 bestätigt werden (sham-WBV [CO] vs. sham-WBV [OA], Abb. 21).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Muskulatur spielt im Krankheitsbild der Osteoarthrose (OA) eine entscheidende Rolle, da eine Muskelhypotrophie einerseits eine OA bedingen und andererseits Folge einer OA sein kann (Roos *et al.*, 2011; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018). Das gelenkschonende körperliche Training ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie der OA, weshalb die *Whole Body Vibration* (WBV) als Trainingsoption erforscht wird (Wang *et al.*, 2015). Der Effekt des WBV-Trainings auf die periartikuläre Muskulatur eines OA-induzierten Knies ist bislang wenig erforscht. Auch sind im präklinischen OA-Modell in der Maus die Forschungsergebnisse bezüglich der Auswirkung der OA auf die Muskulatur bislang uneindeutig (van der Poel *et al.*, 2016; Shorter *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Dissertation zunächst der Einfluss des DMM-Mausmodells auf die Oberschenkelmuskulatur betrachtet und anschließend der Effekt des WBV-Trainings als potentielle Therapieoption für die Oberschenkelmuskulatur im DMM-Modell erforscht.

Es wurden einerseits DMM-Mäuse mit sham-operierten-Mäusen verglichen und andererseits OA-induzierte und kontralaterale Beine von vibrierten (WBV) und sham-vibrierten (sham-WBV) Mäusen betrachtet. Die Versuche umfassten die Messung der Querschnittsfläche der Muskelfaser (CSA) und eine Expressionsanalyse des *Musculus quadriceps femoris*.

5.1.1 Interaktionen zwischen Arthrose und Muskel

Zunächst zeigte sich in den naiven, unbehandelten Mäusen, dass die CSA im *Pars anterior* generell am größten und die CSA im *Pars posterior* am kleinsten innerhalb des VIM ist. Dies könnte auf eine unterschiedliche Zusammensetzung mit verschiedenen Muskelfasertypen (langsam vs. schnell zuckende Fasern) in den Muskelregionen zurückzuführen sein.

Obwohl zu einzelnen, isolierten Zeitpunkten Unterschiede zwischen sham- und DMM-Mäusen und innerhalb der DMM-Mäuse selbst gemessen wurden, weisen die Ergebnisse auf keinen direkten Einfluss der OA auf die Muskulatur hin. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass der DMM-Eingriff einen relativ milden Verlauf der Arthrose induziert, wie in unseren Untersuchungen des Gelenks zu sehen war (Haase *et al.*, 2019).

Die Expressionsanalyse des *M. quadriceps femoris* (QF) im OA-Verlauf zeigte vor allem, dass die in den Muskelabbau involvierten Gene tendenziell vermindert in den DMM-Mäusen exprimiert wurden. *Trim63* wurde im Vergleich zu den gleichwöchigen sham-Mäusen signifikant vermindert in den DMM-Mäusen exprimiert. Dies steht im Kontrast zu anderen Forschungsergebnissen, welche eine vermehrte Expression von *Trim63* in OA-induzierten Ratten (ACLT-Methode [Durchtrennung vorderes Kreuzband]) mit einer Muskelatrophie vor allem im *Musculus quadriceps femoris* und *Musculus tibialis anterior* zeigten (Cunha *et al.*, 2019). Die Expression von *Mstn* zeigte in unseren Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Forschungsergebnisse aus anderen OA-Mausmodellen (ACLT) haben vor allem eine vermehrte Expression von *Mstn* durch die OA gezeigt, wodurch eine Muskelatrophie begünstigt wird (Silva *et al.*, 2018). Diese Unterschiede verdeutlichen, dass verschiedene OA-Modelle einen unterschiedlichen Einfluss auf die Oberschenkelmuskulatur haben können. Eine weitere Studie zeigt, dass das DMM-Modell in der Maus zu einer Einschränkung der Muskelfunktion ohne Zeichen einer Muskelatrophie führt, was die Ergebnisse aus dieser Dissertation bestätigt (van der Poel *et al.*, 2016).

Betrachtet man den gesamten OA-Verlauf beziehungsweise den Vergleich zur Kontrollgruppe, sind keine signifikanten Effekte oder eine Korrelation zwischen der Genexpression und dem Arthroseverlauf zu erkennen. Dies lässt sich mit den Ergebnissen der CSA-Versuche vereinbaren und lässt darauf schließen, dass der Effekt des DMM-Modells auf die Muskulatur nicht vorhanden ist oder zu gering ist, um ihn in unserem Versuchsaufbau zu erkennen.

5.1.2 WBV-Training in der Arthrose

Bisher konzentrierte sich die Forschung auf den Effekt der WBV auf die OA-induzierten Gelenke selbst, der Effekt auf die Muskulatur im OA-Krankheitsbild ist bislang noch wenig erforscht.

Die Forschungsergebnisse bezüglich des Effekts des Vibrationstrainings auf Kniegelenke in Mäusen sind widersprüchlich. Ein achtwöchiges WBV-Training induzierte Meniskusrisse, Knorpelschäden und eine irreversible Degeneration der Bandscheiben in den Mäusen (McCann *et al.*, 2017). Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch die WBV vermehrt TNF- α produziert und dadurch die Knorpeldegeneration der

OA beschleunigt wurde (Yu *et al.*, 2020). In einer anderen Studie konnte eine Verzögerung der Knorpeldegeneration durch die WBV in Mäusen gezeigt werden (Ye *et al.*, 2020).

Untersuchungen zu Effekten auf die Beinmuskulatur zeigten, dass eine lokal angewendete, auf ein Mausbein begrenzte Form des WBV-Trainings, eine Vergrößerung der CSA und eine Reduktion von Muskeldefekten in Mäusen bewirkt (Corbiere & Koh, 2020). In Studien am Menschen wurden überwiegend positive Effekte des Vibrationstrainings auf die Muskulatur beschrieben. So wurde beispielsweise ein positiver Effekt der WBV auf die Beinmuskulatur gezeigt (Lai *et al.*, 2019; Zafar *et al.*, 2015). Durch die WBV wurde vor allem die Funktion der Knieextensoren durch eine Steigerung der Muskelkraft verbessert und eine Schmerzreduktion bewirkt (Zafar *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Vibrationstraining auch einen positiven Effekt auf die Unterschenkelmuskulatur im Menschen hat (Blottner *et al.*, 2006). Auf die Progression der OA im Menschen hatte das WBV-Training keinen Effekt (Anwer *et al.*, 2016). Auch in Bezug auf andere Krankheitsbilder zeigte die WBV vor allem positive Effekte auf die Muskulatur. Vor allem bei älteren Menschen konnte die WBV eine Steigerung der Muskelkraft bewirken, was zu einer Verbesserung der Lebensqualität beitrug (Šarabon *et al.*, 2020). Auch wurde im Krankheitsbild der Zerebralparese eine Muskelkraftsteigerung durch eine horizontal durchgeführte WBV bewiesen und die Körperhaltung und das Gleichgewicht der Patient*innen verbessert (Song *et al.*, 2018).

Unsere Untersuchungen des OA-Verlaufs in WBV trainierten Tieren zeigten keine negativen Effekte auf die OA. Dies war eine Voraussetzung für weitere Untersuchungen der Effekte auf die Beinmuskulatur.

Das Vibrationstraining führte im anterioren Bereich des VIM zu einer signifikant kleineren CSA in OA-induzierten Beinen. Dies könnte auf eine Muskelhypotrophie oder auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Muskelfasertypen hindeuten. Die Untersuchung der Größenverteilung der Muskelfasern zeigte in den untersuchten Regionen, bis auf den *Pars anterior*, keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den naiven, unbehandelten Mäusen. Im *Pars anterior* hat das WBV-Training die Größenverteilung der Muskelfasern in arthrotischen Beinen in Richtung der Kontrollgruppe (kontralaterale Beine und naive Mäuse) verschoben.

Drüber hinaus konnte in den hier vorgestellten Versuchen kein signifikanter Effekt des Vibrationstrainings auf die Oberschenkelmuskulatur nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigte eine Studie am Menschen, dass die durch Vibrationen induzierten Muskelkräfte deutlich niedriger sind als die, die durch normales Gehen erzeugt werden (Bergmann *et al.*, 2018). Die Autor*innen weisen folgerichtig darauf hin, dass die Effekte des Vibrationstrainings nicht durch Steigerung der Muskelkraft erklärt werden können. Darüber hinaus berichten die Autor*innen, dass die durch Vibrationen ausgelösten Kräfte auf Gelenke und Muskeln stark von der Position auf der Vibrationsplatte und individuellen Mechanismen des Körpers zur Dämpfung der Vibrationen abhängig sind (Bergmann *et al.*, 2018). Diese Vielzahl an Varianzen und der ungewisse Wirkmechanismus machen ein effektives Training mittels der Vibrationsplatte schwierig.

Da es in den Versuchen an Mäusen nicht möglich ist, die Position auf der Vibrationsplatte zu beeinflussen, ist ein gerichtetes Training schwer durchführbar beziehungsweise die Effekte des durchgeführten Trainings sehr variabel und kaum beeinflussbar. Daher könnten die Ergebnisse von Bergmann *et al.* den in unseren Versuchen gezeigten geringen Einfluss des WBV-Trainings auf die Oberschenkelmuskulatur erklären.

Neben dem Training der Muskelkraft könnten Vibrationen aber auf anderen Ebenen Effekte auslösen, wie beispielsweise bei der Genexpression oder Ausschüttung von Botenstoffen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Einsatz des WBV-Trainings die Durchblutung im Skelettmuskel verbessert, was ebenfalls zur Verbesserung der Symptome von Patient*innen beitragen könnte (Kerschán-Schindl *et al.*, 2001).

Die Untersuchung der Genexpression nach Vibrationstraining zeigte keine wegweisenden Unterschiede in der Expression der ausgewählten Gene im Vergleich zu den nicht trainierten Mäusen. Auch im Vergleich zu den unbehandelten, naiven Mäusen zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Operation zur Destabilisierung des medialen Meniskus und Vibrationstraining

Obwohl sich Mausmodelle in der Untersuchung der OA als nützlich erwiesen haben, muss die geringe Größe, unterschiedliche Fortbewegung, Lastenverteilung im Gelenk

und Knorpelstruktur im Vergleich zum Menschen berücksichtigt werden (McCoy, 2015; Cope *et al.*, 2019). Durch die geringe Körpergröße und vierbeinige Fortbewegung der Maus wirkt eine andere biomechanische Belastung auf die Gelenke im Vergleich zum Menschen (McCoy, 2015; Cope *et al.*, 2019). Zusätzlich erschwert die Heterogenität der menschlichen OA die Abdeckung aller Aspekte der Erkrankung mit nur einer Art von Tierversuchsmodell. Die enorme Vielfalt an Modellen ermöglicht jedoch, dass ein großer Teil der Forschungsfragen untersucht werden kann (McCoy, 2015; Cope *et al.*, 2019). Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DMM-Methode zu einem relativ milden aber progressiven OA-Verlauf im Mausknie führt. Nach OA-Induktion zeigten die Tiere keinerlei Verhaltensänderungen, die auf Schmerzen, Einschränkungen in der Bewegung oder Schonverhalten hindeuten könnten. Dies steht im Gegensatz zu dem progressiven Krankheitsverlauf beim Menschen mit Schmerzen und üblichen Schonverhalten bei einer symptomatischen Arthrose. Darüber hinaus zeigten sich keine Effekte durch die OA auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse.

Das siebenwöchige Vibrationstraining der Mäuse wurde in einer hierfür speziell angefertigten Vibrationsplatte durchgeführt. Die Platte war so gebaut, dass die Mäuse auf der für sie vorgesehenen Position auf der Vibrationsplatte während der Dauer des Trainings bleiben mussten. Die Standposition der Maus selbst, ob sie beispielsweise mit allen vier Beinen oder nur mit den Hinterbeinen auf der Platte steht, konnte während des Trainings nicht beeinflusst werden. Das Verhalten der Maus beeinflusst somit das Ergebnis des Trainings. Das Vibrationstraining führte zu keinerlei Verhaltensänderungen der Tiere. Sowohl die WBV als auch die sham-WBV Behandlung führte zu keinerlei Aversionsverhalten gegenüber der Vibrationsbox oder des Vibrationstrainings. Das Vibrationstraining hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse. Dies wurde ebenfalls in anderen Studien in der Maus gezeigt. Die Gewichtsentwicklung und das Längenwachstum der Mäuse wurde durch das WBV-Training im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst (Gnyubkin *et al.*, 2016). Eine weitere Studie in der Maus zeigte, dass trotz gleichbleibendem Gesamtgewicht, das WBV-Training vor allem den prozentualen Fettgehalt reduziert (Lin *et al.*, 2015). In humanen Studien wurde ebenfalls eine Reduktion des prozentualen Fettgehalts durch das WBV-Training gezeigt (Zago *et al.*, 2018). Jedoch wurde im Kontrast zur Maus beim Menschen zusätzlich eine Reduktion des Gesamtgewichts durch die WBV erreicht (Omidvar, Alavinia & Craven, 2019; Zago *et al.*, 2018). Dies verdeutlicht erneut, dass die Ergebnisse der WBV-Versuche im

Mausmodell nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, da die Versuchsergebnisse zum Teil deutlich voneinander abweichen.

5.2.2 Die Methode der CSA-Auswertung

Ein wichtiger Aspekt bei der Anfertigung der histologischen Muskelquerschnitte ist eine stetige Kontrolle mittels des Mikroskops. Dadurch kann bestimmt werden, in welchem histologischen Querschnitt sich die größte Muskelfläche, und somit der Muskelbauch, befindet. Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Oberschenkelquerschnitten ziehen zu können, müssen sich die ausgewählten Schnitte für die spätere Färbung und Auswertung stets an derselben Position des Muskels befinden. Der Muskelbauch, und somit die größtmögliche Querschnittsfläche des Muskels, ist hierfür die am besten geeignete Indikation. Eine mögliche Fehlerquelle in der Anfertigung von histologischen Querschnitten wäre die Auswahl eines Querschnitts, der sich nicht im Muskelbauch befindet, wodurch in der Auswertung eine kleinere CSA gemessen wird. Diese Fehlerquelle wurde durch eine regelmäßige Kontrolle per Mikroskop minimiert.

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die CSA nicht nur zwischen einzelnen Versuchstieren, sondern auch innerhalb einer Muskelgruppe variiert, weshalb die auszuwertenden Bereiche des Muskels im Vorhinein klar definiert werden mussten. Die Einfärbung der Zellwände der einzelnen Muskelfasern mit Fluoreszenzfarbstoffen machten die Aufnahme des kompletten Oberschenkelquerschnitts mit einem Scanner für Mikroskop-Objekträger möglich. Diese Übersicht des gesamten Querschnitts war notwendig, um einzelne zu untersuchende Muskeln und Muskelregionen gezielt auswählen zu können. Fehler in der Färbung der Querschnitte würden die darauffolgenden Versuchsschritte erschweren, oder sogar unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde bei den Färbeversuchen stets auf ein einheitliches Vorgehen nach Protokoll geachtet.

Durch die halb-automatische Auswertungsmethode war es möglich 250-800 Fasern pro Muskelausschnitt objektiv und ohne menschliche Einflussnahme auszuwerten. Die Auswahl der verschiedenen Regionen des *M. vastus intermedius* (VIM) bedingten unterschiedliche CSA-Mittelwerte in der Gesamtauswertung, wobei der *Pars anterior* den größten CSA-Mittelwert und der *Pars posterior* den kleinsten CSA-Mittelwert aufwies. Um die Vergleichbarkeit der ausgewählten Muskelregionen zwischen den Versuchstieren zu bewahren, wurden die Ausschnitte aus den vier verschiedenen

Regionen des VIM jeweils an derselben Stelle des Muskels gewählt. Weiterhin könnten bei der manuellen Bildbearbeitung der schwarz-weiß-Querschnittsbilder Fehler entstanden sein, welche die Gesamtergebnisse beeinflussen würden. Um diese Unterschiede so gering wie möglich zu halten, wurde bei der Bearbeitung der Bilder jeweils dieselben Bearbeitungseinstellungen und dasselbe Vorgehen gewählt. Eine Optimierung des Auswertprozesses zu einer vollautomatischen Auswertung würde diese Fehlerquellen noch weiter verringern.

5.2.3 Die Genexpressionsanalyse

Bei der Probenentnahme der Mausbeine wurde auf ein gleichmäßiges Vorgehen geachtet. Der Großteil der Proben hatte ein ähnliches Gewicht. Bei den Experimenten zur RNA-Isolation und Umschreibung der RNA in cDNA wurde eine Kontamination der Proben mittels der Behandlung der Flächen mit *RNase Away* und der Verwendung von RNA/DNA-freien Reaktionsgefäßen minimiert. Es ist jedoch möglich, dass eine Kontamination der Proben nicht vollständig verhindert werden konnte, was eine Verfälschung der Ergebnisse bedingen würde. Die Gefahr einer Kontamination der RNA/cDNA mit genomischer DNA und damit Fehlbindung der Primer konnte durch einen zusätzlichen DNA-Verdau minimiert werden. Die Konzentration der isolierten RNA wurde bei der Umschreibung in cDNA berücksichtigt. Eine fehlerhafte Messung der RNA-Konzentration mittels Spektralphotometer durch kontaminierende oder maskierende Moleküle in der RNA würde die Ergebnisse ebenfalls verändern. Diese Fehlerquelle wurde mittels eines identischen Vorgehens bei der Isolation und Messungen verringert. Darüber hinaus können Messfehler in den RTD-PCR-Läufen eine Verfälschung des Gesamtergebnisses bewirken. Daher wurden alle RTD-PCR Läufe auf die Menge der vorhandenen Transkripte des Haushaltsgens normalisiert. Um Unsicherheiten bezüglich der Bindungseffizienz und Spezifität der Primer zu vermeiden, wurden die Primereffizienzen mit einer Verdünnungsreihenmethode bestimmt. Um Messungenauigkeiten bei der Fluoreszenzmessung zu minimieren, wurde das Gerät regelmäßig kalibriert.

5.3 Limitationen

Die präsentierten Ergebnisse stammten aus einer Anzahl von überwiegend $n=3$ Mäusen pro Versuchsgruppe. Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die Ergebnisse mit einer größeren Versuchsgruppe verändern würden. Auch bewirkte das untersuchte Mausmodell eine milde Form der Arthrose (Haase *et al.*, 2019). Ein Mausmodell mit

stärkerer Ausprägung der Arthrose könnte mögliche Effekt auf die Beinmuskulatur messbar machen.

In Anlehnung an Tierversuche und humane Studien wurde das WBV-Training über 7 Wochen an 5 Tagen in der Woche für 15 Minuten durchgeführt (Xie, Rubin & Judex, 2008; Murfee *et al.*, 2005; Vanleene & Shefelbine, 2013; Ward *et al.*, 2004; Gilsanz *et al.*, 2006). Die Frequenz von 15 Hz wurde aufgrund von vorherigen Untersuchungen im Mausmodell festgelegt.

In der CSA-Auswertung wurden nur vier exemplarische Regionen des *Musculus vastus intermedius* (VIM) ausgewertet. Möglicherweise würden sich die Ergebnisse verändern, wenn das ausgewertete Areal die komplette Querschnittsfläche des VIM umfasst hätte. Außerdem wäre die Auswertung weiterer Muskeln des Oberschenkels von Bedeutung, um beurteilen zu können, ob sich die im VIM gemessenen Veränderungen über den gesamten Oberschenkel beobachten lassen. Möglicherweise ist der VIM nicht am stärksten von den OA-induzierten Veränderungen im Gelenk betroffen und die Betrachtung anderer Muskelgruppen hätte andere Ergebnisse aufgezeigt. Weitergehend müssten auch die Muskelgruppen des Unterschenkels erforscht werden, da diese ebenfalls zur Stabilisierung des Knies beitragen und beispielsweise eine mögliche Hypertrophie dieser Muskeln einen positiven Effekt auf den Verlauf der Osteoarthrose bedeuten könnte (Alnahdi, Zeni & Snyder-Mackler, 2012). Ein Training beziehungsweise eine Arthrose kann zu einer Veränderung der Muskelfasertypen innerhalb eines Muskels führen (Blotner *et al.*, 2006). Die Betrachtung von Unterschieden in der Faserzusammensetzung wäre interessant, da diese die Funktion des Muskels beeinflusst (Schiaffino, Reggiani & Murgia, 2020; Krishnasamy, Hall & Robbins, 2018; Noehren *et al.*, 2018). Darüber hinaus war die Expressionsanalyse auf ausgewählte Gene beschränkt. Möglicherweise ist ein Effekt auf die Expression anderer Gene durch das DMM-Mausmodell und die WBV messbar. Die zusätzliche Betrachtung von proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Genen würde einen Einblick geben, ob in der Arthrose beziehungsweise nach Vibrationstraining entzündliche oder entzündungshemmende Prozesse die Muskulatur beeinflussen (Dalle & Koppo, 2020).

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten, dass die durch das DMM-Modell induzierte Osteoarthritis (OA) und das *Whole Body Vibration* Training (WBV) keinen messbaren Effekt auf die Muskelfaserquerschnittsfläche (CSA) und die Expression exemplarischer Gene im *Musculus quadriceps femoris* hatte.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen hat ein anderes Tiermodell der OA (ACTL-Modell) eine Muskelatrophie und korrelierende Expression von Atrophie begünstigenden Genen gezeigt (Cunha *et al.*, 2019).

Insbesondere im Hinblick auf die Effekte des Vibrationstrainings ist die derzeitige Studienlage gemischt. Die zugrundeliegenden Mechanismen, durch die das Vibrationstraining einen physiologischen Effekt erzielen soll, sind nicht identifiziert (Bergmann *et al.*, 2018; Cakar *et al.*, 2015; Zazula *et al.*, 2020). Dadurch ist es nicht möglich ein einheitliches Trainingsregime oder ein auf ein bestimmtes Krankheitsbild angepasstes Training durchzuführen.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Dissertation im Zusammenhang mit weiteren Studien, dass weitergehende Untersuchungen zu den grundlegenden Mechanismen des Vibrationstrainings benötigt werden, um die WBV gezielt in der Arthrose einsetzen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Alcaraz, M. J., Megias, J., Garcia-Arnandis, I., Clerigues, V. & Guillen, M. I. (2010). New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*, 80(1), pp. 13-21.
2. Alnahdi, A. H., Zeni, J. A. & Snyder-Mackler, L. (2012). Muscle impairments in patients with knee osteoarthritis. *Sports Health*, 4(4), pp. 284-92.
3. Anwer, S., Alghadir, A., Zafar, H. & Al-Eisa, E. (2016). Effect of whole body vibration training on quadriceps muscle strength in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy*, 102(2), pp. 145-51.
4. Bennell, K. L., Hunter, D. J. & Hinman, R. S. (2012). Management of osteoarthritis of the knee. *Bmj*, 345, pp. e4934.
5. Berezovskaya, S., Cicuttini, F., Hussain, S., Hill, C., Jones, G., Wluka, A., Tonkin, A., Ding, C. & Wang, Y. (2021). Correlates of vastus medialis cross-sectional area in adults with symptomatic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 29, pp. S272-S273.
6. Bergmann, G., Kutzner, I., Bender, A., Dymke, J., Trepczynski, A., Duda, G. N., Felsenberg, D. & Damm, P. (2018). Loading of the hip and knee joints during whole body vibration training. *PLOS ONE*, 13(12), pp. e0207014.
7. Billesberger, L. M., Fisher, K. M., Qadri, Y. J. & Boortz-Marx, R. L. (2020). Procedural Treatments for Knee Osteoarthritis: A Review of Current Injectable Therapies. *Pain Res Manag*, 2020, pp. 3873098.
8. Blottner, D., Salanova, M., Puttmann, B., Schiffl, G., Felsenberg, D., Buehring, B. & Rittweger, J. (2006). Human skeletal muscle structure and function preserved by vibration muscle exercise following 55 days of bed rest. *Eur J Appl Physiol*, 97(3), pp. 261-71.
9. Cakar, H. I., Cidem, M., Sebik, O., Yilmaz, G., Karamehmetoglu, S. S., Kara, S., Karacan, I. & Turker, K. S. (2015). Whole-body vibration-induced muscular reflex: Is it a stretch-induced reflex? *J Phys Ther Sci*, 27(7), pp. 2279-84.
10. Cope, P. J., Ourradi, K., Li, Y. & Sharif, M. (2019). Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis Cartilage*, 27(2), pp. 230-239.
11. Corbiere, T. F. & Koh, T. J. (2020). Local low-intensity vibration improves healing of muscle injury in mice. *Physiol Rep*, 8(2), pp. e14356.
12. Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., Hill, C. L., Laslett, L. L., Jones, G., Cicuttini, F., Osborne, R., Vos, T., Buchbinder, R., Woolf, A. & March, L. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*, 73(7), pp. 1323-30.
13. Cunha, J. E., Barbosa, G. M., Castro, P., Luiz, B. L. F., Silva, A. C. A., Russo, T. L., Vasilceac, F. A., Cunha, T. M., Cunha, F. Q. & Salvini, T. F. (2019).

- Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Sci Rep*, 9(1), pp. 6366.
14. Dalle, S. & Koppo, K. (2020). Is inflammatory signaling involved in disease-related muscle wasting? Evidence from osteoarthritis, chronic obstructive pulmonary disease and type II diabetes. *Experimental Gerontology*, 137, pp. 110964.
 15. Gilsanz, V., Wren, T. A., Sanchez, M., Dorey, F., Judex, S. & Rubin, C. (2006). Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res*, 21(9), pp. 1464-74.
 16. Gnyubkin, V., Guignandon, A., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Malaval, L. & Vico, L. (2016). High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. *J Biomech*, 49(9), pp. 1899-1908.
 17. Gomez-Cabello, A., Ara, I., Gonzalez-Aguero, A., Casajus, J. A. & Vicente-Rodriguez, G. (2012). Effects of training on bone mass in older adults: a systematic review. *Sports Med*, 42(4), pp. 301-25.
 18. Haase, T., Sunkara, V., Kohl, B., Meier, C., Bußmann, P., Becker, J., Jagielski, M., von Kleist, M. & Ertel, W. (2019). Discerning the spatio-temporal disease patterns of surgically induced OA mouse models. *PLOS ONE*, 14(4), pp. e0213734.
 19. Herzog, W. & Longino, D. (2007). The role of muscles in joint degeneration and osteoarthritis. *J Biomech*, 40 Suppl 1, pp. S54-63.
 20. Hunter, D. J., Schofield, D. & Callander, E. (2014). The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 10(7), pp. 437-41.
 21. Kerschán-Schindl, K., Grampp, S., Henk, C., Resch, H., Preisinger, E., Fialka-Moser, V. & Imhof, H. (2001). Whole-body vibration exercise leads to alterations in muscle blood volume. *Clin Physiol*, 21(3), pp. 377-82.
 22. Krishnasamy, P., Hall, M. & Robbins, S. R. (2018). The role of skeletal muscle in the pathophysiology and management of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 57(suppl_4), pp. iv22-iv33.
 23. Lai, Z., Lee, S., Hu, X. & Wang, L. (2019). Effect of adding whole-body vibration training to squat training on physical function and muscle strength in individuals with knee osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 19(3), pp. 333-341.
 24. Levinger, I., Trenerry, M., Levinger, P., Feller, J., Bartlett, J., Bergman, N., McKenna, M. & Cameron-Smith, D. (2010). 452 INCREASED INFLAMMATORY CYTOKINE GENE EXPRESSION IN THE SKELETAL MUSCLE OF PATIENTS WITH SEVERE KNEE OSTEOARTHRITIS. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, pp. S203-S204.

25. Lin, C. I., Huang, W. C., Chen, W. C., Kan, N. W., Wei, L., Chiu, Y. S. & Huang, C. C. (2015). Effect of whole-body vibration training on body composition, exercise performance and biochemical responses in middle-aged mice. *Metabolism*, 64(9), pp. 1146-56.
26. McCann, M. R., Veras, M. A., Yeung, C., Lalli, G., Patel, P., Leitch, K. M., Holdsworth, D. W., Dixon, S. J. & Séguin, C. A. (2017). Whole-body vibration of mice induces progressive degeneration of intervertebral discs associated with increased expression of Il-1 β and multiple matrix degrading enzymes. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(5), pp. 779-789.
27. McCoy, A. M. (2015). Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*, 52(5), pp. 803-18.
28. Michael, J. W., Schluter-Brust, K. U. & Eysel, P. (2010). The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*, 107(9), pp. 152-62.
29. Murfee, W. L., Hammett, L. A., Evans, C., Xie, L., Squire, M., Rubin, C., Judex, S. & Skalak, T. C. (2005). High-frequency, low-magnitude vibrations suppress the number of blood vessels per muscle fiber in mouse soleus muscle. *J Appl Physiol* (1985), 98(6), pp. 2376-80.
30. Nelson, A. E. (2018). Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(3), pp. 319-325.
31. Noehren, B., Kosmac, K., Walton, R. G., Murach, K. A., Lyles, M. F., Loeser, R. F., Peterson, C. A. & Messier, S. P. (2018). Alterations in quadriceps muscle cellular and molecular properties in adults with moderate knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(10), pp. 1359-1368.
32. Omidvar, M., Alavinia, S. M. & Craven, B. C. (2019). The effects of whole body vibration therapy on reducing fat mass in the adult general population: A systematic review and meta-analyses. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 19(4), pp. 455-464.
33. Palmieri, B., Lodi, D. & Capone, S. (2010). Osteoarthritis and degenerative joint disease: local treatment options update. *Acta Biomed*, 81(2), pp. 94-100.
34. Park, Y. G., Kwon, B. S., Park, J. W., Cha, D. Y., Nam, K. Y., Sim, K. B., Chang, J. & Lee, H. J. (2013). Therapeutic effect of whole body vibration on chronic knee osteoarthritis. *Ann Rehabil Med*, 37(4), pp. 505-15.
35. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 8(8), pp. 457-65.
36. Pereira, D., Ramos, E. & Branco, J. (2015). Osteoarthritis. *Acta Med Port*, 28(1), pp. 99-106.
37. Rehan Youssef, A., Longino, D., Seerattan, R., Leonard, T. & Herzog, W. (2009). Muscle weakness causes joint degeneration in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(9), pp. 1228-35.

38. Rettig, A., Haase, T., Pletnyov, A., Kohl, B., Ertel, W., von Kleist, M. & Sunkara, V. (2019). SLCV-a supervised learning-computer vision combined strategy for automated muscle fibre detection in cross-sectional images. *PeerJ*, 7, pp. e7053.
39. Rogan, S., Hilfiker, R., Herren, K., Radlinger, L. & de Bruin, E. D. (2011). Effects of whole-body vibration on postural control in elderly: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*, 11, pp. 72.
40. Roos, E. M., Herzog, W., Block, J. A. & Bennell, K. L. (2011). Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 7(1), pp. 57-63.
41. Samvelyan, H. J., Hughes, D., Stevens, C. & Staines, K. A. (2021). Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. *Calcified Tissue International*, 109(3), pp. 243-256.
42. Šarabon, N., Kozinc, Ž., Löfler, S. & Hofer, C. (2020). Resistance Exercise, Electrical Muscle Stimulation, and Whole-Body Vibration in Older Adults: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clin Med*, 9(9).
43. Schiaffino, S., Reggiani, C. & Murgia, M. (2020). Fiber type diversity in skeletal muscle explored by mass spectrometry-based single fiber proteomics. *Histol Histopathol*, 35(3), pp. 239-246.
44. Shorter, E., Sannicandro, A. J., Poulet, B. & Goljanek-Whysall, K. (2019). Skeletal Muscle Wasting and Its Relationship With Osteoarthritis: a Mini-Review of Mechanisms and Current Interventions. *Current Rheumatology Reports*, 21(8), pp. 40.
45. Silva, J. M. S., Alabarse, P. V. G., Teixeira, V. O. N., Freitas, E. C., de Oliveira, F. H., Chakr, R. & Xavier, R. M. (2018). Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One*, 13(4), pp. e0196682.
46. Simon, P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19(11), pp. 1439-1440.
47. Sitja-Rabert, M., Rigau, D., Fort Vanmeerghaeghe, A., Romero-Rodriguez, D., Bonastre Subirana, M. & Bonfill, X. (2012). Efficacy of whole body vibration exercise in older people: a systematic review. *Disabil Rehabil*, 34(11), pp. 883-93.
48. So, B., Kim, H. J., Kim, J. & Song, W. (2014). Exercise-induced myokines in health and metabolic diseases. *Integr Med Res*, 3(4), pp. 172-179.
49. Song, S., Lee, K., Jung, S., Park, S., Cho, H. & Lee, G. (2018). Effect of Horizontal Whole-Body Vibration Training on Trunk and Lower-Extremity Muscle Tone and Activation, Balance, and Gait in a Child with Cerebral Palsy. *Am J Case Rep*, 19, pp. 1292-1300.

50. Staines, K. A., Poulet, B., Wentworth, D. N. & Pitsillides, A. A. (2017). The STR/ort mouse model of spontaneous osteoarthritis - an update. *Osteoarthritis Cartilage*, 25(6), pp. 802-808.
51. Terracciano, C., Celi, M., Lecce, D., Baldi, J., Rastelli, E., Lena, E., Massa, R. & Tarantino, U. (2013). Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int*, 24(3), pp. 1095-100.
52. Valderrabano, V., von Tscharnner, V., Nigg, B. M., Hintermann, B., Goepfert, B., Fung, T. S., Frank, C. B. & Herzog, W. (2006). Lower leg muscle atrophy in ankle osteoarthritis. *J Orthop Res*, 24(12), pp. 2159-69.
53. van der Poel, C., Levinger, P., Tonkin, B. A., Levinger, I. & Walsh, N. C. (2016). Impaired muscle function in a mouse surgical model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 24(6), pp. 1047-53.
54. Vanleene, M. & Shefelbine, S. J. (2013). Therapeutic impact of low amplitude high frequency whole body vibrations on the osteogenesis imperfecta mouse bone. *Bone*, 53(2), pp. 507-14.
55. Vaz, M. A., Baroni, B. M., Geremia, J. M., Lanferdini, F. J., Mayer, A., Arampatzis, A. & Herzog, W. (2013). Neuromuscular electrical stimulation (NMES) reduces structural and functional losses of quadriceps muscle and improves health status in patients with knee osteoarthritis. *J Orthop Res*, 31(4), pp. 511-6.
56. Wang, A. T., Feng, Y., Jia, H. H., Zhao, M. & Yu, H. (2019). Application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of osteoarthritis of the knee: A concise review. *World J Stem Cells*, 11(4), pp. 222-235.
57. Wang, P., Yang, X., Yang, Y., Yang, L., Zhou, Y., Liu, C., Reinhardt, J. D. & He, C. (2015). Effects of whole body vibration on pain, stiffness and physical functions in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil*, 29(10), pp. 939-51.
58. Ward, K., Alsop, C., Caulton, J., Rubin, C., Adams, J. & Mughal, Z. (2004). Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. *J Bone Miner Res*, 19(3), pp. 360-9.
59. Xie, L., Rubin, C. & Judex, S. (2008). Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. *J Appl Physiol* (1985), 104(4), pp. 1056-62.
60. Xu, B., Ye, J., Yuan, F. Z., Zhang, J. Y., Chen, Y. R., Fan, B. S., Jiang, D., Jiang, W. B., Wang, X. & Yu, J. K. (2020). Advances of Stem Cell-Laden Hydrogels With Biomimetic Microenvironment for Osteochondral Repair. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, pp. 247.
61. Yamauchi, K., Kato, C. & Kato, T. (2019). Characteristics of individual thigh muscles including cross-sectional area and adipose tissue content measured by magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology International*, 39(4), pp. 679-687.

62. Ye, W., Guo, H., Yang, X., Yang, L. & He, C. (2020). Pulsed Electromagnetic Field Versus Whole Body Vibration on Cartilage and Subchondral Trabecular Bone in Mice With Knee Osteoarthritis. *Bioelectromagnetics*, 41(4), pp. 298-307.
63. Yu, P. M., Lin, Y., Zhang, C., Wang, H. M., Wei, Q., Zhu, S. Y., Wei, Q. C., Wang, Z. G., Pan, H. X., Huang, R. D. & He, C. Q. (2020). Low-Frequency Vibration Promotes Tumor Necrosis Factor- α Production to Increase Cartilage Degeneration in Knee Osteoarthritis. *Cartilage*, pp. 1947603520931178.
64. Zafar, H., Alghadir, A., Anwer, S. & Al-Eisa, E. (2015). Therapeutic effects of whole-body vibration training in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*, 96(8), pp. 1525-32.
65. Zago, M., Capodaglio, P., Ferrario, C., Tarabini, M. & Galli, M. (2018). Whole-body vibration training in obese subjects: A systematic review. *PLoS One*, 13(9), pp. e0202866.
66. Zazula, M. F., Wutzke, M. L. S., da Costa, J. R. G., Guimaraes, A. T. B., Costa, R. M., Bertolini, G. R. F. & Ribeiro, L. F. C. (2020). Morphological effects of whole-body vibration on remobilization of the tibialis anterior muscle of Wistar rats. *Anat Rec (Hoboken)*.
67. Zhang, R., Ma, J., Han, J., Zhang, W. & Ma, J. (2019). Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am J Transl Res*, 11(10), pp. 6275-6289.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Derya Larissa Rostowski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss der Osteoarthrose auf die Oberschenkelmuskulatur und *whole body vibration* als Therapieoption – Untersuchungen im Mausmodell/Impact of osteoarthritis on femoral muscles and whole body vibration as a therapeutic option – studies in a mouse model of osteoarthritis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei meinen Betreuern Prof. Dr. Wolfgang Ertel und Dr. Michal Jagielski bedanken, welche mir das Thema überlassen haben und durch die diese Dissertation erst möglich geworden ist.

Weiterhin gilt ein herzlicher Dank dem Team des Labors für Regenerative Orthopädie. Ein großer Dank geht an Dr. Tobias Haase, welcher mich von Anfang bis Ende betreut hat und mir wertvolles fachliches Input gegeben hat.

Außerdem möchte ich mich bei Benjamin Kohl bedanken, welcher mich bei der Durchführung der Experimente und inhaltlich zu jeder Zeit unterstützt hat.

Schließlich gilt Carola Meier und Patricia Bußmann ein Dank, welche bei Fragen immer ein offenes Ohr hatten.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, welche mich über die gesamte Zeit dieser Arbeit begleitet haben und zu jedem Zeitpunkt fest an mich geglaubt haben.

10 Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Rostowski, Derya Larissa
Emailadresse: derya.rostowski@charite.de
Matrikelnummer: 221268
Promotionsbetreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel
Promotionsinstitution: Klinik für Unfall- und
Wiederherstellungschirurgie, CBF, Charité

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Frau Derya Rostowski* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- *Termin 1: 10.09.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Eine Fallzahl von drei Einheiten pro Gruppe ist klein, Resultate von statistischen Tests sind mit großer Vorsicht zu betrachten.
- KS-Test kann Normalität nicht zeigen, nur widerlegen. Es sollte stattdessen in der Arbeit darauf hingewiesen werden, dass ein KS-Test die Normalität nicht widerlegen konnte.
- Eine klarere Darlegung der durchgeführten statistischen Tests (was wurde wie/wogegen getestet) im Text als Beschreibung der Abbildungen scheint sinnvoll.
- Gegebenenfalls sollte für multiples Testen adjustiert werden.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel