

Aus der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. Thomas Mittlmeier

Regenerative Eigenschaften von Laufbandtraining auf die Struktur des peripheren Skelettmuskels der orchiektomierten Ratte



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Katharina Hink

aus Filderstadt

Rostock, September 2016

Gutachter:

PD Dr. Ioannis Stratos

Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Universität Rostock

Prof. Dr. Brigitte Vollmar

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Universität Rostock

Prof. Dr. Michael Fröhner

Klinik und Poliklinik für Urologie

Universitätsklinikum Dresden

Datum der Einreichung: 05.09.2016

Datum der Verteidigung: 27.06.2017

Meinen Eltern

I. INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| I. | Inhaltsverzeichnis..... | 4 |
| II. | Abkürzungen..... | 7 |
| III. | Zusammenfassung..... | 10 |
| II. | Abkürzungen..... | 7 |
| III. | Zusammenfassung..... | 10 |
| 1 | Einleitung..... | 12 |
| 1.1 | Die periphere Skelettmuskulatur..... | 12 |
| 1.2 | Definition und Epidemiologie der Sarkopenie..... | 14 |
| 1.3 | Pathophysiologie und Ursachen der Sarkopenie..... | 15 |
| 1.4 | Prävention und therapeutische Ansätze für die Sarkopenie..... | 16 |
| 1.5 | Auswirkungen der Andropause auf das muskuloskelettale System..... | 18 |
| 1.6 | Trainingsformen für das muskuloskelettale System..... | 22 |
| 2 | Ziel der Studie..... | 25 |
| 3 | Material und Methoden..... | 26 |
| 3.1 | Experimentelles Modell..... | 26 |
| 3.1.1 | Versuchsaufbau und Versuchsgruppen..... | 26 |
| 3.1.2 | Orchiektomie und sham-Orchiektomie..... | 29 |
| 3.1.3 | Laufbandtraining..... | 31 |
| 3.2 | Untersuchungsmethoden..... | 33 |
| 3.2.1 | Muskelkraftmessung..... | 33 |
| 3.2.2 | Histologische und immunhistochemische Untersuchungen..... | 38 |
| 3.2.2.1 | Muskelfaserdiameter..... | 38 |
| 3.2.2.2 | Muskelgewebefraktion..... | 39 |
| 3.2.2.3 | Kollagendeposition..... | 40 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.2.4 | Muskelzellproliferation..... | 40 |
| 3.2.2.5 | Muskelzellapoptose..... | 41 |
| 3.2.3 | Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht | 42 |
| 3.2.4 | Serum-Testosteron-Wert..... | 42 |
| 3.3 | Statistische Analyse | 43 |
| 4 | Ergebnisse | 44 |
| 4.1 | Allgemeine Beobachtungen | 44 |
| 4.2 | Muskelkraftmessung | 44 |
| 4.2.1 | Tetanie..... | 44 |
| 4.2.2 | Kurzkontraktion | 46 |
| 4.2.3 | Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie..... | 47 |
| 4.3 | Histologische und immunhistochemische Untersuchungen | 48 |
| 4.3.1 | Muskelfaserdiameter..... | 48 |
| 4.3.2 | Muskelgewebefraktion | 49 |
| 4.3.3 | Kollagendeposition..... | 50 |
| 4.3.4 | Muskelzellproliferation..... | 51 |
| 4.3.5 | Muskelzellapoptose..... | 53 |
| 4.4 | Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht | 55 |
| 4.5 | Serum-Testosteron-Wert..... | 56 |
| 4.6 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 56 |
| 5 | Diskussion..... | 58 |
| 5.1 | Diskussion von Material und Methoden..... | 58 |
| 5.1.1 | Die Ratte als Versuchstier | 58 |
| 5.1.2 | Orchiektomie zur Induktion der Andropause..... | 59 |
| 5.1.3 | Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung..... | 60 |
| 5.1.4 | Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen..... | 61 |
| 5.1.5 | Laufbandtraining | 62 |
| 5.2 | Diskussion der Untersuchungsmethoden | 64 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.2.1 | Diagnostik der Sarkopenie bei Mensch und Tier | 64 |
| 5.2.2 | Muskelkraftmessung | 66 |
| 5.2.3 | Narkose | 67 |
| 5.2.4 | Histologische und immunhistochemische Untersuchungen | 68 |
| 5.2.4.1 | Kollagendeposition..... | 69 |
| 5.2.4.2 | Muskelzellproliferation..... | 70 |
| 5.2.4.3 | Muskelzellapoptose..... | 71 |
| 5.2.5 | Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht | 73 |
| 5.3 | Diskussion der Ergebnisse | 74 |
| 5.3.1 | Muskuläre Veränderungen nach Orchiectomie..... | 74 |
| 5.3.2 | Muskuläre Veränderungen nach Laufbandtraining | 77 |
| 5.3.3 | Klinische Relevanz..... | 82 |
| 5.3.4 | Limitation und Ausblick | 84 |
| 6 | Thesen..... | 85 |
| 7 | Literatur..... | 88 |
| 8 | Danksagung..... | 106 |
| 9 | Eidesstattliche Erklärung..... | 107 |

II. ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------|--|
| 3'OH | Hydroxygruppe |
| % | Prozent |
| § | Paragraph |
| ACE | Angiotensin-Converting-Enzym |
| ADT | Androgendeprivationstherapie |
| ANOVA | analysis of variance |
| ARKO | Androgen-Rezeptor-Knockout |
| BIA | Bioelektrische Impedanzanalyse |
| BrdU | 5-Brom-2'-desoxyuridin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celcius |
| ca. | circa |
| cm | Zentimeter |
| CT | Computertomographie |
| DGE | Deutsche Gesellschaft für Ernährung |
| d.h. | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DXA | Dual-Röntgen-Absorptiometrie |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EMAS | European Male Aging Studie |
| EMG | Elektromyographie |
| et al. | und andere |
| EWGSOP | European Working Group on Sarcopenia in Older People |
| g | Gramm |
| GF | Gesichtsfeld |
| GH | growth hormone |
| HBM | Beta-Hydroxy Beta-Methylbutyrat |
| HE | Hämatoxilin-Eosin |
| Hz | Hertz |
| IE | Internationale Einheiten |

| | |
|-----------------|---|
| IGF-1 | Insulin-like growth factor 1 |
| IL6 | Interleukin 6 |
| i.p. | intraperitoneal |
| ISEL | in-situ-end-labeling |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| kgKG | Kilogramm Körpergewicht |
| l | Liter |
| LOH | late-onset hypogonadism |
| M. | Musculus |
| m | Meter |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| MGF | mechano growth factor |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MyHC | myosin heavy chain |
| N. | Nervus |
| N | Newton |
| n | Anzahl |
| ng | Nanogramm |
| nmol | Nanomol |
| ORX | Orchiektomie |
| p | Wahrscheinlichkeit |
| PADAM | partial androgen deficiency of the aging male |
| PCNA | proliferation cell nuclear antigen |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| pH | potential of hydrogen |
| pmol | Pikomol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SERM | selektive Östrogenrezeptormodulatoren |

| | |
|---------------|---|
| sham-ORX | Schein-Orchiektomie |
| SHbG | sexualhormon-bindendes Globulin |
| SPECT | Single-Photon-Emissions-Computertomographie |
| SPPB | short physical performance battery |
| t | Zeit |
| TdT | terminal desoxynucleotidyl transferase |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling |
| U | Umdrehungen |
| v.a. | vor allem |
| vs. | versus |
| V_{\max} | Maximalgeschwindigkeit |
| Wo | Wochen |
| μg | Mikrogramm |
| μm | Mikrometer |

III. ZUSAMMENFASSUNG

Der Alterungsprozess des Menschen steht im Zusammenhang mit Funktionseinschränkungen des Bewegungsapparates und geht mit Veränderungen der strukturellen und mechanischen Eigenschaften des peripheren Skelettmuskels einher. Grund hierfür ist unter anderem der durch die Andropause bedingte Abfall des Serum-Testosteronspiegels. Dieser wird, neben körperlicher Inaktivität, als Hauptursache in der Entstehung der Sarkopenie diskutiert. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der regenerative Einfluss von körperlicher Aktivität auf den sarkopenen Muskel im andropausalen Organismus untersucht.

Hierfür wurden männliche Wistar-Ratten zur Induktion der Andropause orchiectomiert (ORX) bzw. als Kontrolle sham-orchiectomiert (sham) und nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (n=6 Tiere pro Gruppe) analysiert. Um den Effekt von körperlicher Aktivität auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Skelettmuskels zu untersuchen, wurden jeweils sechs orchiectomierte Tiere einem 12-wöchigen Laufbandtraining zugeführt. Dieses wurde entweder bei einer Steigung von 10° (uphill), in der Ebene (level) oder bei einem Gefälle von 10° (downhill) durchgeführt. Dabei stellten die unterschiedlichen Laufmodalitäten mit ihren verschiedenen Anteilen an exzentrischer und konzentrischer Muskelkontraktion eine unterschiedliche Belastung für den sarkopenen Muskel dar. Nach Ende der 12 Trainingswochen wurden die Tiere der drei Laufgruppen mit orchiectomierten bzw. sham-orchiectomierten ruhenden Tieren verglichen. Die Auswertung erfolgte durch Analyse der kontraktiven Muskelkraft mittels biomechanischer Messung sowie histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen des linken M. soleus. Die statistische Auswertung wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt (one-way ANOVA, * p<0,05 vs. sham, # p<0,05 vs. 12-Wo-ORX, + p<0,05 vs. 12-Wo-ORX-level, \$ p<0,05 vs. 12-Wo-ORX-uphill).

Der Serum-Testosteronspiegel lag bei den orchiectomierten Tieren zu jedem Zeitpunkt nach der Orchiectomie unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,2 ng/ml). Die Werte der sham-orchiectomierten Tiere unterschieden sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant (4-Wo-sham: 2,7 ± 0,8 ng/ml, 8-Wo-sham: 2,4 ± 0,9 ng/ml, 12-Wo-sham: 2,4 ± 0,7 ng/ml). Die biomechanische Untersuchung zeigte bei den orchiectomierten Tieren

12 Wochen postoperativ eine statistisch relevante Abnahme der tetanischen Muskelkontraktionskraft, wohingegen durch das Laufbandtraining unabhängig von der Trainingsmodalitäten eine signifikante Zunahme der Kontraktionskraft gegenüber untrainierten orchiektomierten Tieren festgestellt werden konnte (12-Wo-sham: $1,6 \pm 0,1$ N, 12-Wo-ORX: $0,85 \pm 0,2^*$ N, 12-Wo-ORX-uphill: $1,72 \pm 0,1^{\#,*}$ N, 12-Wo-ORX-level: $1,28 \pm 0,1^{\#}$ N, 12-Wo-ORX-downhill: $1,71 \pm 0,1^{\#,*}$ N). Die Muskelkraft bei Kurzkontraktion und die Ratio von Kurzkontraktion zu tetanischer Kontraktion zeigten innerhalb der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten keine Unterschiede. Zur Untersuchung der morphologischen Muskelveränderungen wurden der Muskelfaserdiameter, die Muskelgewebefraktion sowie die Kollagendeposition und die Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht des Muskels bestimmt. Des Weiteren erfolgte die quantitative Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels Nachweis PCNA-positiver Zellen sowie der Muskelzellapoptose durch Sichtbarmachung TUNEL-positiver Zellen.

Die histologischen Untersuchungen zeigten eine Abnahme des Muskelfaserdiameter (4-Wo-sham: $54 \pm 1,5$ μm , 4-Wo-ORX: $50 \pm 1,4^*$ μm , 8-Wo-sham: $59 \pm 1,2$ μm , 8-Wo-ORX: $50 \pm 0,7^*$ μm , 12-Wo-sham: $57 \pm 0,9$ μm , 12-Wo-ORX: $53 \pm 1,1^*$ μm , 12-Wo-ORX-uphill: $61 \pm 1,9^{\#}$ μm , 12-Wo-ORX-level: $60 \pm 1,3^{\#}$ μm , 12-Wo-ORX-downhill: $62 \pm 1,4^{*,\#}$ μm) sowie eine Zunahme der apoptotischen Muskelzellen nach Orchiektomie (TUNEL-positive Zellen/ mm^2 : 4-Wo-sham: 58 ± 7 , 4-Wo-ORX: $89 \pm 12^*$, 8-Wo-sham: 55 ± 4 , 8-Wo-ORX: $96 \pm 18^*$, 12-Wo-sham: 65 ± 3 , 12-Wo-ORX: $121 \pm 13^*$). Durch das Lauftraining konnte die durch Orchiektomie bedingte Reduktion des Muskelfaserdiameter kompensiert und über das Niveau der sham-Kontrollgruppe angehoben werden. Des Weiteren führte das Lauftraining zur Zunahme der Muskelzellproliferation (PCNA-positive Zellen/ mm^2 : 12-Wo-ORX: 24 ± 6 , 12-Wo-ORX-uphill: $48 \pm 4^{*,\#}$, 12-Wo-ORX-level: $26 \pm 5^{\S}$, 12-Wo-ORX-downhill: $28 \pm 3^{*,\S}$) bei gleichzeitiger Abnahme der Muskelzellapoptose (TUNEL-positive Zellen/ mm^2 : 12-Wo-ORX: $121 \pm 13^*$, 12-Wo-ORX-uphill: $108 \pm 11^*$, 12-Wo-ORX-level: $85 \pm 9^{\#}$, 12-Wo-ORX-downhill: $75 \pm 8^{\#,\S}$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit erste *in vivo* Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von drei unterschiedlichen Laufbelastungen auf die Regeneration des sarkopenen Skelettmuskels aufzeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Laufbandtraining geeignet ist, den Muskelabbau bei Sarkopenie aufzuhalten und insbesondere die Trainingsmodalitäten uphill- und downhill-Laufen myoprotektiv wirken.

1 EINLEITUNG

1.1 Die periphere Skelettmuskulatur

Der menschliche Körper besteht zu einem großen Teil aus Muskulatur. Etwa ein Drittel der Gesamtkörpermasse machen die über 600 verschiedenen Muskeln aus. Man unterscheidet zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur. Letztere lässt sich nochmals in Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur unterteilen. Während die glatte Muskulatur vor allem die inneren Organe versorgt und unwillkürlich arbeitet, ist die Skelettmuskulatur für die aktive Bewegung des Organismus zuständig und willkürlich steuerbar. Eine der Hauptaufgaben der Skelettmuskulatur ist die Umwandlung von chemischer in mechanische Energie. Die dabei erzeugte Muskelkraft ermöglicht neben der Körperhaltung und Statik auch die Durchführung von komplexen Bewegungsabläufen [Frontera und Ochala 2015].

Die Skelettmuskulatur bildet den aktiven Teil des Stütz- und Bewegungsapparates, während Knochen, Knorpel, Gelenke und Bänder die passiven Strukturen darstellen und für die Stütz- und Gerüstfunktion des Körpers verantwortlich sind [Brotto und Johnson 2014]. Beide Teile bilden zusammen eine funktionelle Einheit. Als Kraftüberträger fungieren die bindegewebigen Faserzüge der Sehnen, die einerseits fest im Muskel verankert und andererseits am Knochen angewachsen sind.

Der Skelettmuskel besteht aus mehreren Muskelfaserbündeln, die von einer elastischen Bindegewebsschicht, dem Perimysium umgeben sind und zu einer funktionellen Einheit zusammengefasst werden. Der Muskel als Ganzes wird von einer dicken Bindegewebshülle, dem Epimysium und der Muskelfaszie ummantelt. Sie sichert seine Form und Lage und grenzt ihn vom umgebenden Gewebe verschieblich ab. Das Bindegewebe führt die Blutgefäße und Nervenfasern und verleiht dem Muskel Stabilität sowie Zug- und Druckfestigkeit. Es dient der Verankerung der Muskelfasern untereinander und zum umliegenden Gewebe hin und ist dadurch ein wichtiger Bestandteil des kontraktiven Apparates [Davis et al. 2013].

Ein Muskelfaserbündel besteht aus mehreren parallel verlaufenden Muskelfasern, auch Muskelfibrillen genannt, die jeweils von dünnem Endomysium überzogen sind. Muskelfasern haben einen Durchmesser von 10 - 100 μm und können eine Länge von

mehreren Zentimetern erreichen [Frontera und Ochala 2015]. Sie stellen ein Synzytium dar, das während der Embryonalentwicklung durch die Verschmelzung von einzelnen Myoblasten entsteht und dadurch mehrere randständige Zellkerne enthält.

Die kleinste Einheit bildet das Sarkomer, bestehend aus den kontraktile Proteinen Aktin und Myosin, sowie verschiedenen Struktur- und Zytoskelettproteinen. Es stellt den Kontraktionsapparat der Muskelfaser dar. Mehrere hintereinander geschaltete Sarkomere bilden eine Muskelfaser. Das Sarkomer ist durch Z-Streifen begrenzt, in denen die Aktinfilamente verankert sind. Das freie Ende des Aktinfilamentes steht über Bindungsstellen mit den Köpfchen der Myosinfilamente in Kontakt. Die Muskelkontraktion beruht auf dem Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten und wird in der Gleitfilament-Theorie und dem Querbrückenzyklus von Huxley beschrieben [Huxley und Niedergerke 1954]. Durch die charakteristische Anordnung der kontraktile Filamente entsteht die typische Querstreifung im Längsschnitt der Skelettmuskelfasern, die lichtmikroskopisch dargestellt werden kann (Abbildung 1).

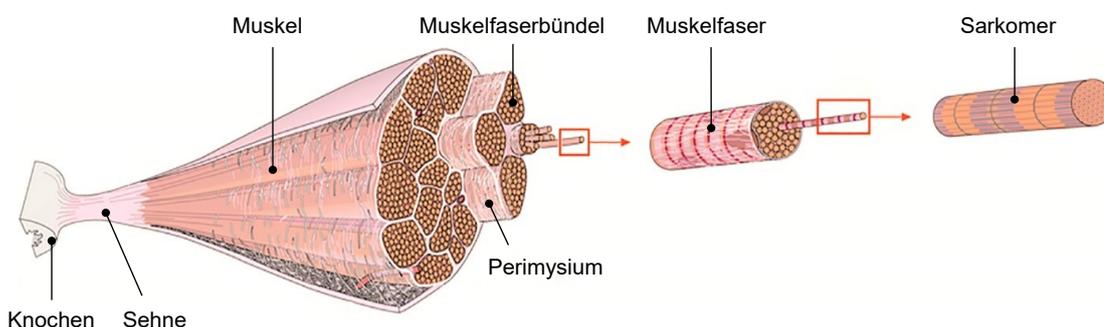


Abbildung 1: Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus der peripheren Skelettmuskulatur. Der Skelettmuskel besteht aus mehreren Muskelfaserbündeln, die von einer dünnen Bindegewebsschicht, dem Perimysium umhüllt werden, welches von Blutgefäßen und Nerven durchsetzt ist. Ein Muskelfaserbündel setzt sich aus mehreren Muskelfasern bzw. Muskelfibrillen zusammen, welche aus hintereinander geschalteten Sarkomeren bestehen. *Abbildung modifiziert nach Aumüller und Kollegen [Aumüller et al. 2014].*

Es gibt verschiedene Arten von Muskelfasern, die sich in ihrer Arbeitsweise unterscheiden und je nach Form der Beanspruchung aktiv sind. Eingeteilt werden sie nach den Isoformen der schweren Myosin-Ketten (MyHC) in Typ-I-Fasern und Typ-II-Fasern (Typ IIa, Typ IIb und Typ IIx). Typ-I-Fasern besitzen viele Mitochondrien und

haben einen hohen Myoglobinanteil, der für ihre dunkelrote Farbe verantwortlich ist. Sie arbeiten langsam und ausdauernd. Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe Glykolyse und oxidative Verstoffwechslung von Fettsäuren. Durch ihre langanhaltende Kontraktion werden sie vor allem bei Ausdauerleistung beansprucht, da sie nur sehr langsam ermüden. Typ-IIa-Fasern haben einen größeren Durchmesser, kontrahieren schnell und können mehr Kraft erzeugen. Ihr Mitochondrien- und Myoglobinanteil liegt unter dem von Typ-I-Fasern. Die Energiegewinnung erfolgt sowohl oxidativ, als auch anaerob über Glykolyse. Fasern vom Typ IIb und Typ IIx haben den geringsten Myoglobinanteil und werden daher auch weiße Fasern genannt. Sie arbeiten schnell und können die größte Kraft erzeugen; ermüden aber auch rasch. Ihre Energiegewinnung erfolgt vorwiegend über anaerobe Glykolyse, wodurch über einen kurzen Zeitraum eine hohe Menge an Energie freigesetzt werden kann [Schiaffino und Reggiani 2011]. Innerhalb eines Skelettmuskels sind die einzelnen Muskelfasertypen mit unterschiedlicher Dominanz vertreten. Diese Heterogenität ermöglicht dem Muskel, seine Aktivität den verschiedenen metabolischen und mechanischen Anforderungen anzupassen [Pette 2002; Blaauw et al. 2013; Frontera und Ochala 2015].

Die Muskelfasern sind in motorischen Einheiten organisiert, wobei eine Einheit durch eine Nervenfasern neuronal versorgt wird. Die Neuronen der motorischen Einheit vom Typ I haben kleine Zellkörper und eine niedrige Erregungsschwelle. Sie werden bei der Muskelkontraktion vorrangig erregt. Ist eine stärkere Kontraktion gefordert werden auch motorische Einheiten vom Typ II aktiviert, um eine maximale Muskelkraft entwickeln zu können [Knuttgen 2007].

1.2 Definition und Epidemiologie der Sarkopenie

Der Begriff Sarkopenie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den beiden Wortteilen *sarx* für Fleisch und *penia* für Mangel zusammen. Er beschreibt den altersbedingten degenerativen Abbau der Skelettmuskulatur und wurde erstmals 1988 auf einer Konferenz in Albuquerque in New Mexico von Irwin H. Rosenberg verwendet [Rosenberg 1997]. In den letzten Jahren formulierten verschiedene europäische und internationale Expertengremien erweiterte Definitionen. So spricht die European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) von Sarkopenie, wenn neben der reduzierten Muskelmasse auch eine Abnahme der Muskelkraft oder der körperlichen Leistungsfähigkeit vorliegt, oder aber wenn alle drei Parameter vermindert sind [Cruz-

Jentoft et al. 2010]. Trotz des steten wissenschaftlichen Fortschrittes gibt es bis heute keine einheitlich gültige Definition, was die Diagnose und Therapie der Sarkopenie erschwert [Cruz-Jentoft et al. 2010].

Mit zunehmendem Alter kommt es, durch physiologische Alterungsprozesse bedingt, zu einem Abbau der Muskelmasse und einer Minderung der Muskelkraft. Bereits ab dem 50. Lebensjahr nimmt die Muskelmasse jährlich um etwa 1 - 2% ab. Zudem reduziert sich die Muskelkraft bei über 60 Jährigen um ca. 3% pro Jahr. Folglich kommt es zu körperlichen Beeinträchtigungen und funktionellen Einschränkungen. Die Abnahme der motorischen Fähigkeiten führt zu Schwäche und Gangunsicherheit verbunden mit einer erhöhten Sturzgefahr [Rolland et al. 2008]. Durch die eingeschränkte Mobilität kommt es zu einer erschwerten Alltagsbewältigung und einem Verlust der Selbständigkeit mit eventueller Pflegebedürftigkeit. Dies bedeutet für viele Patienten eine Verminderung der Lebensqualität. Zudem konnte gezeigt werden, dass ältere Patienten mit Sarkopenie ein erhöhtes Mortalitätsrisiko haben, unabhängig vom Geschlecht und anderen Erkrankungen [Landi et al. 2013].

Aufgrund der nicht einheitlich gefassten Definition variieren die Angaben zur Prävalenz der Sarkopenie deutlich. So gehen Haehling und Kollegen davon aus, dass etwa 5 - 10% der über 65 Jährigen an Sarkopenie leiden. Bei den über 80 Jährigen sogar bis zu 50% [Haehling et al. 2010]. In anderen Studien wird die Prävalenz bei den über 60 Jährigen mit 8 - 40% angegeben, abhängig von den jeweils angewendeten Diagnostikmethoden [van Abellan Kan 2009]. In einem systematischen Review werteten Cruz-Jentoft und Kollegen mehrere Studien hinsichtlich der Prävalenz unter Verwendung der EWGSOP-Definition aus. Sie lag zwischen 1 - 33%, mit deutlicher Zunahme in den älteren Studienpopulationen. In den meisten Studien konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden, sodass man davon ausgeht, dass Frauen und Männer etwa gleichhäufig betroffen sind [Cruz-Jentoft et al. 2014].

1.3 Pathophysiologie und Ursachen der Sarkopenie

Die Sarkopenie lässt sich in eine primäre und sekundäre Form einteilen. Während es bei der primären Form allein aufgrund des Alterungsprozesses zu einer Abnahme von Muskelmasse und Muskelkraft bzw. Muskelleistung kommt, spielen bei der sekundären Form verschiedene Faktoren eine Rolle. Eine zentrale Bedeutung haben hierbei vor allem körperliche Inaktivität und Veränderungen im Hormonhaushalt, hauptsächlich von

Testosteron, Wachstumshormonen und insulin-like growth factor 1 (IGF-1). Aber auch Organerkrankungen, Entzündungen, maligne Tumorerkrankungen oder Malnutrition in Verbindung mit einer verminderten Proteinaufnahme und einem gestörten Eiweißstoffwechsel sind zu nennen. Die multifaktorielle Pathogenese und das individuelle Auftreten der Risikofaktoren erschweren die Einteilung in eine primäre und sekundäre Form [Cruz-Jentoft et al. 2010; Janssen 2011].

Pathophysiologisch steht die Abnahme der Muskelmasse im Zusammenhang mit dem Abbau langsamer Typ-I- und vor allem schneller Typ-II-Muskelfasern. Zudem kommt es zum Verlust von Satellitenzellen, die eine wichtige Rolle bei der Muskelregeneration einnehmen [Shefer et al. 2013]. Durch die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege werden im Muskelgewebe vermehrt Zytokine wie Interleukin 6 (IL 6) ausgeschüttet [Walston 2012]. Der Untergang von Motoneuronen im Rückenmark mit nachfolgender Atrophie der Muskelfasern in den motorischen Einheiten scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen. So konnten Drey und Kollegen durch elektromyographische Messungen eine reduzierte Anzahl motorischer Einheiten bei sarkopenen Patienten nachweisen [Drey et al. 2014].

1.4 Prävention und therapeutische Ansätze für die Sarkopenie

Da körperliche Inaktivität eine Hauptursache der Sarkopenie darstellt, gilt körperliches Training als einer der wichtigsten Ansatzpunkte im Rahmen von Prävention und Therapie. In mehreren Studien konnte der positive Effekt von körperlicher Aktivität sowohl auf Muskelmasse und Muskelkraft, als auch auf die allgemeine körperliche Leistungsfähigkeit nachgewiesen werden.

Allgemein versteht man unter körperlicher Aktivität jede Form von körperlicher Bewegung, die durch Kontraktion der Skelettmuskulatur hervorgerufen wird und mit einem erhöhten Energieaufwand verbunden ist, wobei Dauer und Intensität variieren können. Training ist eine Form von körperlicher Aktivität, bei der durch wiederholtes Durchführen von Übungen eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit erreicht wird [Montero-Fernandez und Serra-Rexach 2013]. Dabei kann zwischen verschiedenen Trainingsformen, wie z.B. Kraft- oder Ausdauertraining unterschieden werden. Cruz-Jentoft und Kollegen werteten mehrere Studien hinsichtlich des Einflusses verschiedener Trainingsformen auf den Muskel aus. Es zeigte sich, dass ein mehrmonatiges Krafttraining vor allem die Funktionalität und Kraft des Muskels erhöht,

die Zunahme der Muskelmasse dabei aber eher im Hintergrund steht [Cruz-Jentoft et al. 2014]. Gleichwohl konnte nachgewiesen werden, dass Ausdauertraining bei über 70-jährigen Männern die Anzahl und den Durchmesser der Skelettmuskelfasern erhöht und dadurch dem altersbedingten Muskelabbau entgegenwirken kann. Ein signifikanter Anstieg der Muskelmasse und Muskelkraft ließ sich bereits bei einer Trainingsdauer von drei Monaten feststellen [Harber et al. 2012]. Zudem reduziert regelmäßige körperliche Aktivität die altersbedingte intramuskuläre Fettinfiltration [Goodpaster et al. 2008].

Für den Muskelabbau im Alter spielt auch die Reduktion der Mitochondrien eine Rolle. Mitochondrien sind für die Bereitstellung von Energie verantwortlich und haben eine zentrale Funktion im Stoffwechsel der Muskelzellen. Durch freie Sauerstoffradikale entsteht oxidativer Stress, der die mitochondriale DNA schädigt und die Syntheseleistung von Muskelproteinen reduziert. Regelmäßiges Ausdauertraining kann dem entgegenwirken. Es erhöht die Aktivität von endogenen Antioxidantien, fördert den oxidativen Stoffwechsel und reduziert so die mitochondriale Dysfunktion in Skelettmuskelzellen [Johnson et al. 2014 und 2015; Barbieri et al. 2015]. Des Weiteren kommt es bei der Muskelkontraktion zur Freisetzung von Muskelwachstumsfaktoren wie IGF-1 und Mechano-Growth-Factor (MGF), welche über Aktivierung von Satellitenzellen die Muskelregeneration fördern [Morley 2012].

Auch ein Trainingsbeginn im späteren Alter führt bei regelmäßiger Fortführung der Übungseinheiten zu einer allgemeinen Leistungssteigerung und verminderten Mortalität. So zeigte sich, dass auch Patienten, die erst im Alter von über 85 Jahren mit dem Muskeltraining begannen, einen signifikanten Anstieg der 3-Jahres-Überlebensrate gegenüber gleichaltrigen inaktiven Patienten hatten [Wen et al. 2011]. Zudem fördert körperliche Aktivität im Alter die motorische Kompetenz und reduziert das Sturz- und Verletzungsrisiko sowie den damit verbundenen Mobilitätsverlust. Sie stärkt die mentale Gesundheit, soziale Integration und verbessert damit die allgemeine Lebensqualität [Montero-Fernandez und Serra-Rexach 2013].

Neben körperlicher Aktivität gilt die Proteinsubstitution als mögliche therapeutische Maßnahme. Es scheint, dass speziell die Zufuhr von essentiellen Aminosäuren wie Leucin oder Beta-Hydroxy Beta-Methylbutyrat (HBM) einen positiven Effekt auf die Muskelmasse hat und die Synthese von Muskelproteinen steigert. Die Kombination von Muskeltraining und Proteinzufuhr zeigt dabei eine additive Wirkung. Allerdings sind die Langzeiteffekte noch nicht ganz geklärt und bedürfen weiterer Studien [Sayer et al. 2013; Cruz-Jentoft et al. 2014].

Vitamin D wird ein positiver Effekt auf Muskelkraft und körperliche Leistungsfähigkeit nachgesagt. Es spielt eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Myoblasten und kann der altersbedingten Abnahme der Muskelfunktion entgegenwirken. Der intrazelluläre Wirkungsmechanismus ist allerdings noch nicht verstanden [Wagatsuma und Sakuma 2014]. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) spricht als Empfehlung eine Vitamin D Zufuhr von mindestens 800 IE (200µg) täglich aus, da diese Dosis das Risiko für Funktionseinbußen des Bewegungsapparates, Stürzen, Frakturen und vorzeitigen Tod mit wahrscheinlicher Evidenz verringert [Linseisen 2011]. Von einer Protein- oder Vitaminsubstitution könnten vor allem Patienten profitieren, die aufgrund ihres Gesundheits- oder Allgemeinzustandes nicht in der Lage sind ein körperliches Training durchzuführen.

In mehreren Studien wurde die Wirkung von Hormonersatztherapien mit Testosteron, Östrogen, Dehydroepiandrosteron und Wachstumshormonen getestet. Dabei zeigten sich positive Effekte hinsichtlich der Zunahme von Muskelmasse und Muskelkraft. Jedoch steht der Einsatz der genannten Substanzen mit einer hohen Rate an Nebenwirkungen wie z.B. Thrombosen oder Ödembildung in Verbindung. Das Nutzen-Risiko-Verhältnis muss somit gut abgewägt werden [Morley 2012; Sakuma und Yamaguchi 2012].

Inhalt aktueller Studien ist die Wirkung von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern (ACE-Hemmer) und Myostatin-Inhibitoren auf die Skelettmuskulatur. In einigen Arbeiten konnte bereits ein positiver Effekt von ACE-Hemmern auf die Angiogenese in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden. Allerdings ist die Datenlage nicht einheitlich. Ob sich daraus neue Therapieansätze ableiten lassen, werden weitere randomisiert kontrollierte Studien zeigen müssen [Burton und Sumukadas 2010; Sartiani et al. 2015].

1.5 Auswirkungen der Andropause auf das muskuloskeletale System

Der natürliche Alterungsprozess des Menschen ist mit Veränderungen im Hormonhaushalt verbunden, die vor allem die Sexualhormone betreffen. Die Andropause beschreibt dabei die verminderte Produktion und den Verlust von Sexualhormonen beim Mann.

Zu den Androgenen gehören die männlichen Sexualhormone, die neben der Entwicklung und Erhaltung der männlichen Geschlechtsmerkmale auch für anabole

Stoffwechselfvorgänge verantwortlich sind. Ihr wichtigster Vertreter ist das Testosteron. Es wird in den Leydig-Zellen des Hoden gebildet, ein geringer Anteil auch in der Nebennierenrinde. Im Blut sind ca. 98% des Testosterons an Transportproteine wie Albumin oder sexualhormon-bindendes Globulin (SHbG) gebunden, etwa 2% liegen als freies, hormonell aktives Testosteron vor [Vanderschueren et al. 2014].

Während es bei der Frau im Alter von 20 - 45 Jahren zu einem raschen Abfall des Testosterongehaltes kommt, sinkt dieser bei Männern ab dem 40. Lebensjahr kontinuierlich um ca. 1% jährlich ab [Huhtaniemi 2014]. Ursache ist die verminderte Aktivität der endokrinen Achse, als auch der Anstieg des SHbGs, was dazu führt, dass weniger freies Testosteron zur Verfügung steht [Khosla 2013]. Allerdings zeigt sich hier eine breite Variabilität, sodass einige Männer auch im fortgeschrittenen Alter ähnlich hohe Serum-Testosteronspiegel wie junge, gesunde Männer haben [Bremner 2010]. Bislang gibt es keinen einheitlichen Grenzwert, ab dem ein niedriger Testosteronspiegel als pathologisch eingestuft wird. Dem liegt auch zugrunde, dass viele Männer trotz niedriger Testosteronwerte keine klinischen Symptome zeigen.

Ein niedriger Testosteronwert in Verbindung mit klinischen Symptomen wie verminderter körperlicher Leistungsfähigkeit, Abnahme von Muskelmasse und Muskelkraft, Osteoporose, sexuellen Funktionsstörungen, Müdigkeit oder Depression, kann als partial androgen deficiency of the aging male (PADAM) oder altersassoziierter Hypogonadismus (late-onset hypogonadism, LOH) beschrieben werden [Huhtaniemi 2014]. Auf Grundlage der Daten der European Male Aging Studie (EMAS) empfehlen Wu und Kollegen den Grenzwert von 11 nmol/l für Gesamttestosteron und 220 pmol/l für freies Testosteron in Kombination mit dem Vorliegen von drei sexualbezogenen Symptomen. Danach liegt die Prävalenz des altersassozierten Hypogonadismus bei 40 - 80 Jährigen etwa bei 2% [Wu et al. 2010].

Am Skelettmuskel bindet Testosteron über einen speziellen Androgenrezeptor und aktiviert intrazellulär verschiedene Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Genregulation der Muskelzelle nehmen [Bhasin et al. 2006]. Testosteron wirkt über intramuskuläre Signalwege und beeinflusst positiv die Zellproliferation. Es stimuliert Wachstumsfaktoren wie GH (growth hormon) und IGF-1 und fördert so die Aktivierung von anabolen Stoffwechselfvorgängen wie dem akt-mTOR-Signalweg; gleichzeitig hemmt es katabole Stoffwechselwege [Rooy et al. 2016]. Außerdem erhöht Testosteron die mitotische Aktivität und Anzahl von pluripotenten mesenchymalen Satellitenzellen, die als Vorläuferzellen der Myozyten gelten. Als Ursache wird eine vermehrte Replikation bzw. eine verminderte Apoptose diskutiert; der genaue Wirkmechanismus ist jedoch

unklar. Zudem kommt es zu intrazellulären Veränderungen mit Zunahme der Zellorganellen wie Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum und Abnahme des Kern-Plasma-Verhältnisses [Sinha-Hikim et al. 2003 und 2006]. Dieser Mechanismus spielt auch in der Regeneration von geschädigten Muskelzellen eine Rolle. Im Tiermodell konnten Serra und Kollegen nachweisen, dass Testosteron in posttraumatischen Muskeln männlicher Mäuse die Bildung von pluripotenten Satellitenzellen induziert und somit die Regeneration von Muskelzellen positiv beeinflusst [Serra et al. 2013].

In mehreren Studien führte die Testosteronsubstitution bei gesunden eugonadalen Männern zur Zunahme der Muskelmasse und Muskelkraft. Die Effekte waren dabei meist dosisabhängig [Srinivas-Shankar und Wu 2009]. Eine tägliche transdermale Testosteron-Applikation über sechs Monate führte bei älteren Männern mit eingeschränkter Mobilität zur Zunahme der Muskelkraft der oberen und unteren Extremitäten sowie zu einer verbesserten Leistung beim Treppensteigen [Travison et al. 2011].

Die Zunahme der Muskelmasse erfolgt durch Hypertrophie der Muskelfasern. Hierbei vergrößern sich die Querschnittsfläche der Muskelfasern und die Anzahl der Muskelfaserkerne abhängig von der Testosterondosis. Wobei die langsamen Typ-I-Muskelfasern sensibler auf Testosteron reagieren [Sinha-Hikim et al. 2002 und 2006]. Des Weiteren steigert Testosteron die muskuläre Proteinsynthese und fördert hierbei vor allem die effiziente Wiederverwertung bereits intrazellulär vorliegender Aminosäuren. Im Fastenzustand fällt die Proteinbilanz dadurch weniger negativ aus [Ferrando et al. 2002; Sheffield-Moore et al. 2006; Kadi 2008].

Auch der passive Teil des Bewegungsapparates steht unter dem Einfluss von Testosteron. Während der Entwicklungsphase fördert Testosteron die Knochenbildung. Es reguliert die Proliferation von Knorpelzellen in der Wachstumsfuge und beeinflusst dadurch das Längenwachstum der Knochen sowie gegen Ende der Pubertät den Verschluss der Epiphysenfuge [Clarke und Khosla 2009]. Der adulte Knochen unterliegt ständigen Umbauvorgängen, bedingt durch die Aktivität von aufbauenden Osteoblasten und abbauenden Osteoklasten, wobei ein physiologisches Gleichgewicht im Knochenstoffwechsel angestrebt wird. In der Andropause kommt es durch den Testosteronmangel bedingt zu Veränderungen der Knochenstruktur mit einem verstärkten Abbau von kortikaler und spongiöser Knochensubstanz. Die Knochendichte reduziert sich [Marie und Kassem 2011]. Von Osteoporose spricht man, wenn die Knochenmineraldichte um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert gesunder, junger Erwachsener liegt. Der Substanzverlust führt zu einer verminderten

Tragfähigkeit der Knochen und erhöht das Risiko für Frakturen. Dieses ist bei Osteoporose-Erkrankten um 40% erhöht und betrifft vor allem Wirbelkörper und Oberschenkelhalsknochen. Neben dem Verlust der Mobilität und Einschränkungen der Lebensqualität kommt es durch die Immobilisation bedingt oft zu weiteren gesundheitlichen Komplikationen [Rachner et al. 2011].

Über Androgenrezeptoren bindet Testosteron an Bänder, speziell am vorderen Kreuzband und nimmt Einfluss auf selbige Strukturen [Hamlet et al. 1997; Lovering und Romani 2005]. Im Tiermodell konnten Dehghan und Kollegen an ovariektomierten weiblichen Ratten nachweisen, dass Testosteron die Expression von Relaxinrezeptoren in der Patellarsehne und im lateralen Seitenband des Knies hemmt [Dehghan et al. 2014a]. Relaxin ist ein Peptidhormon, das unter anderem für die Elastizität im Bandapparat verantwortlich ist. Durch seine Hemmung kommt es zu einer verminderten Dehnbarkeit und Abnahme des passiven Bewegungsausmaßes im Kniegelenk [Dehghan et al. 2014b und 2014c]. Zudem führt die Einnahme von erhöhten Testosterondosen zur reduzierten Dehnbarkeit und Flexibilität von Sehnen der Versuchstiere. Testosteron hemmt die Aktivität der Matrix-Metallpeptidase und fördert so die Festigkeit der Sehne. Dadurch erhöht sich das Risiko für Rupturen, speziell der Achillessehne [Marqueti et al. 2006 und 2011].

An Knorpelzellen wirkt Testosteron sowohl direkt über den Androgenrezeptor, als auch indirekt nach enzymatischer Umwandlung durch die Aromatase in Östrogen [Nilsson et al. 2005]. Die Datenlage bezüglich der Wirkung von Testosteron ist nicht eindeutig. So konnte nachgewiesen werden, dass Testosteron einen positiven Einfluss auf männliche Vorläuferzellen von Knorpelzellen *in vitro* hat [Koelling und Miosge 2010] und es durch Kastration zur Apoptose und Abnahme der Chondrozytenproliferation an der Wachstumsfuge kommt [Irie et al. 2005]. Gleichzeitig zeigen aber Langzeitergebnisse, dass eine Verbindung zwischen hohen freien Testosteronwerten und dem Verlust von Knorpel am Kniegelenk von gesunden Männern besteht [Hanna et al. 2005].

Die physiologische Wirkung der Androgene, wird besonders an Ausfallerscheinungen deutlich, die nach ihrem Wegfall auftreten. Im Tiermodell konnte an kastrierten bzw. Androgen-Rezeptor-Knockout-Nagetieren (ARKO) in mehreren Versuchen gezeigt werden, dass der Testosteron-Verlust mit einer Reduktion der Muskelmasse einhergeht. Dies führte zur Abnahme des Muskelfaserdiameters mit Verlust der Muskelkontraktionskraft [Rooy et al. 2016].

Auch in klinischen Studien lassen sich die Folgen des Testosteronmangels nachweisen. So wirkt sich die Androgendeprivationstherapie (ADT) bei Männern mit Prostatakarzinom nachteilig auf die Körperzusammensetzung aus. Durch den Testosteronmangel kommt es zum signifikanten Verlust der Muskelmasse bei gleichzeitiger Zunahme des Fettgewebsanteils [Cheung et al. 2014]. Grund ist unter anderem eine verstärkte Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Adipozyten [Singh et al. 2003]. Durch Myosteatoses erhöht sich der intramuskuläre Lipidgehalt und verändert damit die Qualität des Muskelgewebes mit nachfolgender Abnahme der Muskelkraft [Chang et al. 2014]. Die Abnahme der Muskelkraft betrifft sowohl die oberen als auch die unteren Extremitäten und zeigt sich in einer verminderten Handdruckstärke und einer reduzierten Kraft bei der Brustpresse, als auch in schlechteren Ergebnissen bei Laufstreckentests [Galvao et al. 2009; Alibhai et al. 2010].

Die Auswirkungen der Andropause auf das muskuloskeletale System sind somit weitreichend. Ein verminderter Testosteronengehalt gilt als wichtiger Faktor im Verlust von Muskelmasse und Muskelkraft und trägt damit wesentlich bei der Entstehung der Sarkopenie bei. Allerdings liegt der Fokus der meisten Studien auf der Androgendeprivations- sowie der Testosteronsubstitutionstherapie nach Orchiektomie. Die Folgen des Testosteronmangels nach chirurgischer Kastration sind dagegen bislang wenig untersucht und bedürfen weiterer Forschung, insbesondere klinischer Studien.

1.6 Trainingsformen für das muskuloskeletale System

Jede Form der körperlichen Aktivität beinhaltet eine mechanische und eine metabolische Muskelleistung, die sich je nach Trainingsform unterscheiden kann. Unter mechanischer Leistung versteht man die direkte biomechanische Leistung, die z.B. beim Gehen oder Laufen aufgebracht wird. Die metabolische Leistung wird in den Muskelzellen durch aerobe und anaerobe Stoffwechselfvorgänge erbracht und erzeugt die Energie, welche benötigt wird, um die jeweilige Bewegung auszuführen [Knuttgén 2007]. Beim Training wird durch wiederholtes Durchführen von Übungen eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit erreicht. Dabei kommt es im Muskel zu strukturellen und metabolischen Veränderungen. Mehrere spezifische Signalwege die beim Training aktiviert werden und zur Anpassung des Skelettmuskels führen konnten bereits identifiziert werden [Frontera und Ochala 2015]. Das Ausmaß der anatomischen und physiologischen Veränderungen die sich hierbei am Muskel abspielen, ist von der

Dauer und Intensität des Trainings sowie von den genetischen Voraussetzungen des Individuums abhängig [Knuttgen 2007].

Beim Ausdauertraining werden große Muskelgruppen bei einer Intensität aktiviert, die es der trainierenden Person ermöglicht die Aktivität ohne übermäßige Ermüdung über einen längeren Zeitraum auszuführen. Dies erfordert eine hocheffiziente Sauerstoffversorgung des Skelettmuskels. Typische Ausdauersportarten sind z.B. Gehen, Laufen, Schwimmen oder Radfahren [Frontera und Ochala 2015]. Als Reaktion auf den Trainingsreiz zeigt der Skelettmuskel auch phänotypische Anpassungen. Die erhöhte Muskeldurchblutung führt zur Angiogenese mit Bildung neuer intramuskulärer Kapillaren [Yan et al. 2011], zudem steigt die oxidative Kapazität durch Zunahme des Muskelfaserdiameters der Typ-I-Fasern [Knuttgen 2007]. Weiterhin ist bekannt, dass Ausdauertraining für eine suffiziente mitochondriale Stoffwechselfunktion sorgt [Barbieri et al. 2015]. Die erhöhte Funktionalität der Mitochondrien resultiert aus einer erhöhten Biogenese sowie einer effizienten Reduktion von dysfunktionalen und beschädigten Mitochondrien [Yan et al. 2012; Wiggs 2015]. Ausdauertraining wird auch als kardiovaskuläres Training bezeichnet, da es hierbei neben den Veränderungen des Muskelstoffwechsels auch zu einer generellen Adaptation des Körpers mit erhöhter Pumpleistung des Herzens und erhöhtem Herzminutenvolumen kommt [Knuttgen 2007].

Krafttraining führt zur Zunahme des Muskelfaserdiameters, speziell der Typ-II-Fasern und bedingt dadurch eine Hypertrophie des gesamten Muskels [Knuttgen 2007]. Durch die verstärkte Proteinsynthese werden vermehrt Membrantransportproteine wie der Laktattransporter gebildet und die Transportkapazität erhöht. Damit kann der pH-Wert der Muskelzelle auch unter Belastung im Gleichgewicht gehalten werden, was für eine effektive Muskelarbeit wichtig ist [Juel 2006]. Im Zusammenhang mit Krafttraining steht auch eine verstärkte Genexpression und Aktivierung von intramuskulären Stoffwechselforgängen, wie dem akt-mTOR-Signalweg [Schiaffino et al. 2013], sowie die Hemmung kataboler Stoffwechselregulatoren wie Myostatin [Hitachi und Tsuchida 2013]. Neuromuskuläre Anpassungen führen zur Zunahme der Muskelstärke. Der Kraftzuwachs in der Frühphase des Trainings resultiert aus einer erhöhten Aktivität der motorischen Einheiten durch Senkung der Reizschwelle, vor allem in schnellen Muskelfasern. Dies wird im weiteren Verlauf durch neuronale Plastizität verstärkt. Bereits inaktive Muskelfasern werden über Axone von benachbarten motorischen Einheiten reinerviert und wieder kontraktionsfähig. Die Vergrößerung der motorischen Einheit geht zwar mit einer langsameren Leitungsgeschwindigkeit einher, jedoch steigt durch die höhere Anzahl der rekrutierten Muskelfasern die Muskelkraft an [Arnold und Bautmans

2014]. Metaanalysen lassen darauf schließen, dass es bei Durchführung von mehreren Wiederholungssätzen zur Zunahme des Trainingseffekts von bis zu 40% kommt. Wobei die Zunahme der Muskelkraft größer als der Muskelzuwachs ist [Krieger 2010].

Man unterscheidet verschiedene Formen der Muskelkontraktion, die sowohl beim Ausdauer- als auch Krafttraining durchgeführt werden. Die isotonische Muskelkontraktion führt zur Krafterzeugung bei dynamischer Bewegung des Muskels. Sie kann entweder konzentrisch, d.h. mit einer Verkürzung des Muskels oder exzentrisch, mit einer Verlängerung des Muskels einhergehen. Bei der isometrischen Muskelkontraktion findet dagegen keine Muskelbewegung statt. Die geleistete Muskelarbeit ist statisch und der Widerstand größer als die zu erzeugende Kraft [Frontera und Ochala 2015].

Beim Laufbandtraining stellen die verschiedenen Laufmodalitäten unterschiedliche Reize für den Skelettmuskel dar. Während es beim downhill-Laufen vor allem zur exzentrischen Muskelkontraktion kommt [Rodio und Fattorini 2014], werden beim uphill-Laufen konzentrische Kontraktionskräfte eingesetzt [Vogt und Hoppeler 2014]. Das Laufen in der horizontalen Ebene stellt eine Zwischenstufe mit gleichen Anteilen an exzentrischer und konzentrischer Kontraktion dar.

Nur wenige aktuelle Studien haben den Effekt von unterschiedlichen Trainingsmodalität auf den andropausalen Organismus untersucht. Bis heute gibt es keine Studien die uphill-, level- und downhill-Training unter gleichen Bedingungen untersucht haben und somit wissenschaftlich belegen, welche Trainingsform die effizienteste ist, um die Muskelmasse und Muskelkraft im sarkopenen Skelettmuskel zu erhöhen.

2 ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden experimentellen Untersuchungen war es, den regenerativen Einfluss von körperlicher Aktivität auf den sarkopenen Muskel im andropausalen Organismus zu analysieren. Dabei wurde auf die folgende Fragen näher eingegangen:

- Wie wirkt sich die Orchiektomie auf den Serum-Testosteronspiegel aus?
- Welchen Einfluss haben unterschiedliche Laufband-Trainingsmodalitäten auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Skelettmuskels in orchiektomierten Wistar-Ratten?
- Wie beeinflussen die Orchiektomie und das Laufbandtraining das Kontraktionsvermögen und die Muskelkraft der peripheren Skelettmuskulatur?
- Wie beeinflussen die Orchiektomie und das Laufbandtraining den Muskelfaserdiameter der peripheren Skelettmuskulatur?
- Wie wirken sich die Orchiektomie und das Laufbandtraining auf die Muskelgewebefraktion des peripheren Skelettmuskels aus?
- Wie wirken sich die Orchiektomie und das Laufbandtraining auf den Kollagenanteil im Muskelgewebe aus?
- Welchen Einfluss haben die Orchiektomie und das Laufbandtraining auf die Proliferation der Skelettmuskelzellen?
- Welchen Einfluss haben die Orchiektomie und das Laufbandtraining auf die Apoptoserate der Skelettmuskelzellen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Experimentelles Modell

Die Versuche wurden an 54 männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 375 - 425 g durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht, nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Die Tiere wurden bei 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und unter Bereitstellung von Laborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten.

Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz § 8 von der Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommerns genehmigt worden (Aktenzeichen 7221.3-1.1-034/13) und standen unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten (Dr. rer. nat. D. Zechner) am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Der Versuchsbeginn erfolgte eine Woche nach Akklimatisierung der Tiere an die Laborbedingungen.

3.1.1 Versuchsaufbau und Versuchsgruppen

Die insgesamt 54 Ratten wurden randomisiert in folgende Studienabschnitte und Gruppen eingeteilt (Abbildung 2): 36 Tiere im Studienabschnitt A und 18 Tiere im Studienabschnitt B. Die Auswertung erfolgte *in vivo* und *ex vivo*. *In vivo* wurde bei allen Tieren die Muskelkraft am linken M. soleus gemessen. Anschließend folgten *ex vivo* histologische und immunhistochemische Untersuchungen, nachdem die Tiere mit einer Überdosis der Ketamin-Xylazin-Narkose sowie durch den Volumenmangel bei der intrakardialen Blutabnahme getötet wurden.

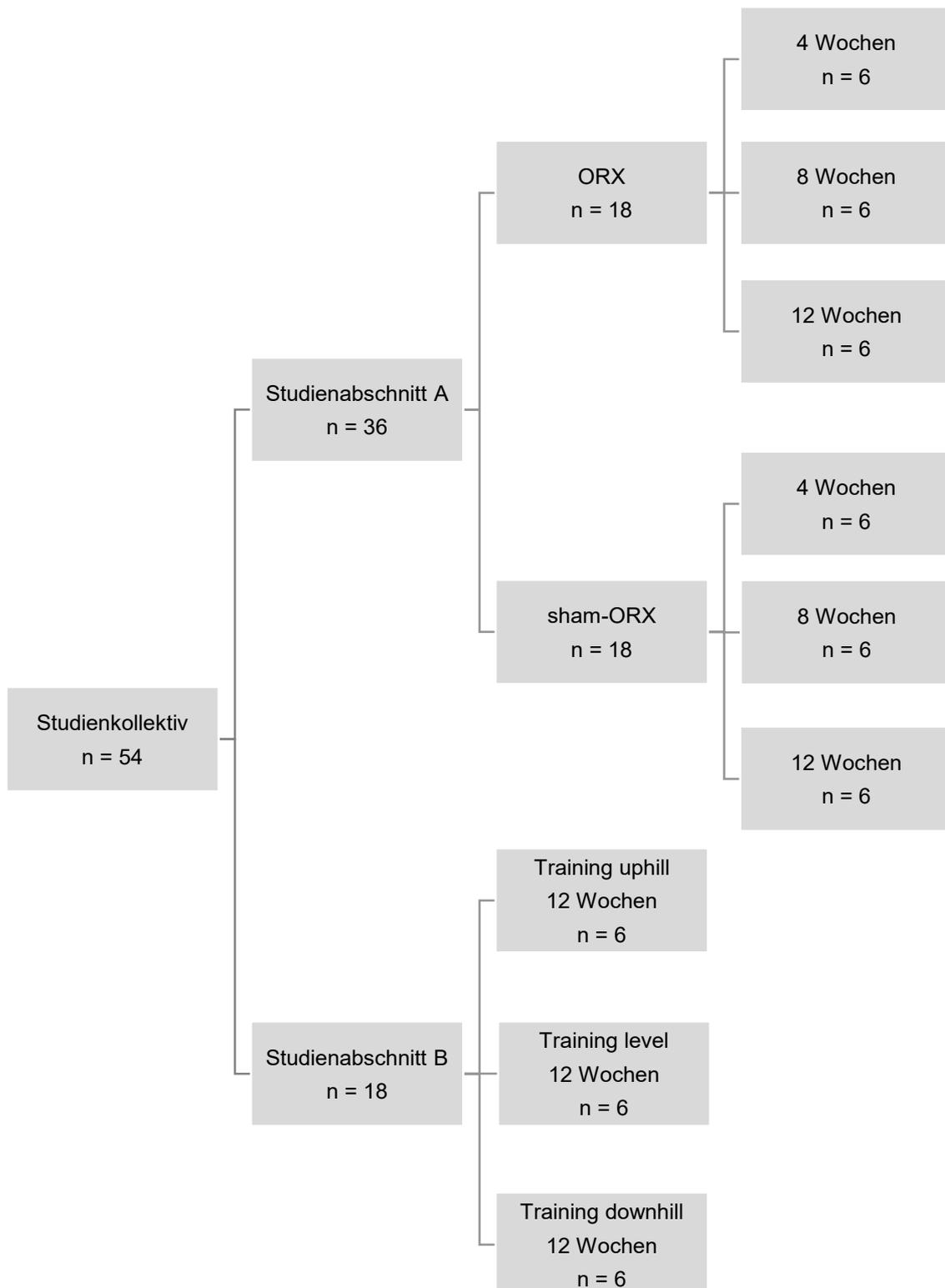


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen und des experimentellen Protokolls.

Studienabschnitt A

Im Studienabschnitt A wurde der Einfluss der, durch Orchiectomie induzierten Andropause, auf den Skelettmuskel untersucht. Dafür erfolgte eine Woche nach Akklimatisierung der Tiere an die Laborbedingungen die Orchiectomie (ORX) bzw. bei der Kontrollgruppe die sham-Orchiectomie (sham-ORX). Es folgte ein Beobachtungszeitraum von 4, 8 bzw. 12 Wochen mit anschließender Messung der Muskelkraft sowie histologischer und immunhistochemischer Untersuchung des Muskels (Abbildung 3). Insgesamt ergaben sich im Studienabschnitt A folgende sechs Gruppen mit jeweils sechs Tieren, welche miteinander verglichen wurden:

4 Wo sham-ORX
4 Wo ORX

8 Wo sham-ORX
8 Wo ORX

12 Wo sham-ORX
12 Wo ORX

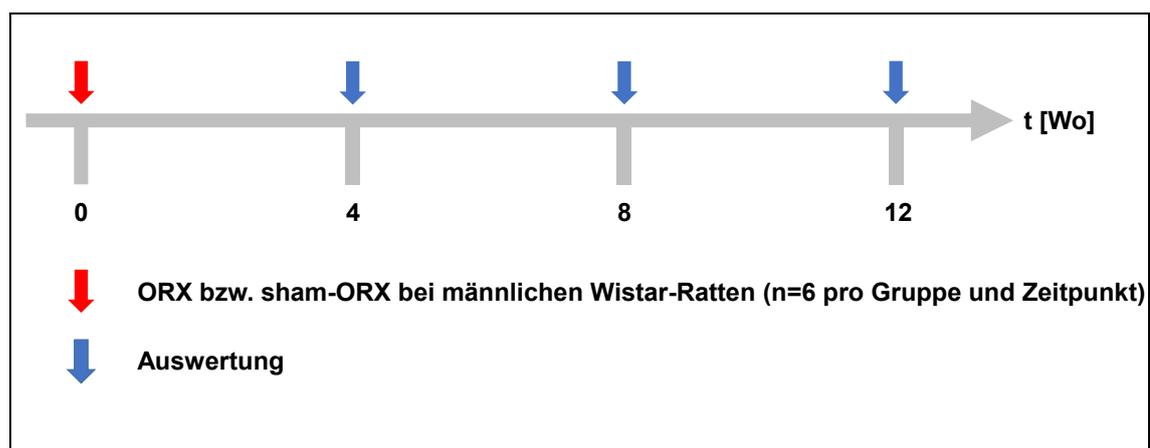


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufes von Studienabschnitt A.

Studienabschnitt B

Die Tiere aus Studienabschnitt B wurden einer Orchiectomie sowie einem anschließenden 12-wöchigen Laufbandtraining zugeführt (Abbildung 4). Das Training wurde frühestens 3 Tage post operationem begonnen. Dabei liefen die Tiere entweder eine Steigung von 10° aufwärts (uphill), in der Ebene (level) oder ein Gefälle von 10° abwärts (downhill). Details zum Laufprotokoll sind unter dem Punkt 3.1.3 aufgeführt. Die Zuteilung zu den folgenden drei Trainingsgruppen erfolgte randomisiert (n=6):

12 Wo ORX uphill

12 Wo ORX level

12 Wo ORX downhill

Nach Ablauf der 12-wöchigen Trainingsphase wurden die Tiere dieser drei Laufgruppen mit den Tieren der 12 Wo ORX Gruppe bzw. 12 Wo sham ORX Gruppe aus Studienabschnitt A verglichen und der Effekt des Trainings auf den Skelettmuskel untersucht. Die Messung der Muskelkraft erfolgte einen Tag nach Beendigung des Laufbandtrainings.

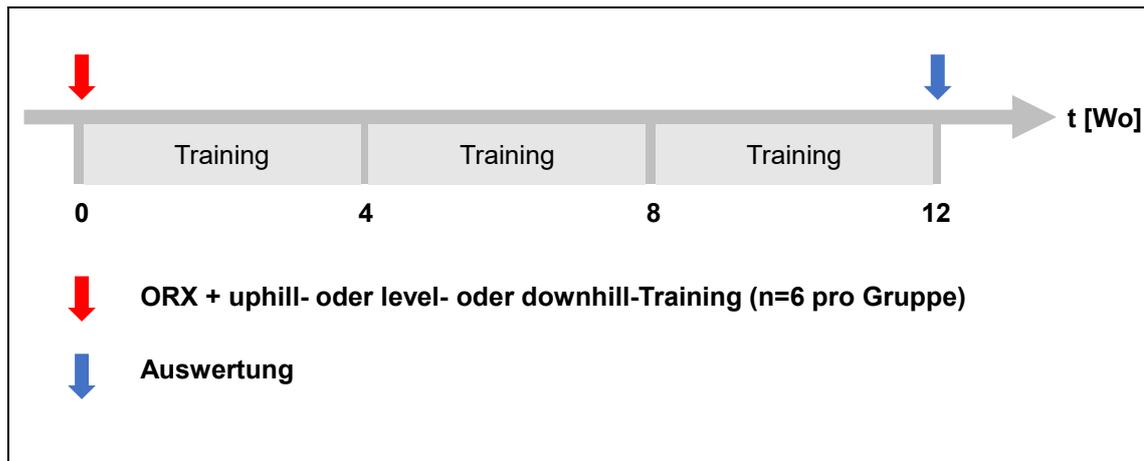


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufes von Studienabschnitt B.

3.1.2 Orchiektomie und sham-Orchiektomie

Die Narkose der Tiere wurde gewichtsadaptiert mit intraperitonealer (i.p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid 10% (Ketamin, Bela-Pharm, Vechta, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) durchgeführt (110 mg/kgKG Ketamin und 7 mg/kgKG Xylazin). Der Eingriff erfolgte unter nicht sterilen Bedingungen und Verwendung von mikrochirurgischen Instrumenten. Nach Rasur der Skrotalbehaarung folgte die Lagerung der Tiere in Rückenlage auf einer Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizintechnische Geräte, Pfaffing, Deutschland) zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 36 - 37 °C. Die Augen wurden mit einem Gel (Vidisic®, Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Nach Fixierung der Hinterläufe mit Pflasterstreifen (Leukosilk® S, BSN medical, Hamburg, Deutschland) erfolgte die Hautdesinfektion der Hodenregion mit Providon-Iod (Betaisadona®, Mundipharma, Limburg, Deutschland). Die Orchiektomie wurde an jedem Hoden einzeln durchgeführt. Sie erfolgte „geschlossen“,

d.h. unter Schonung des parietalen Blattes der Tunica vaginalis. Durch einen ca. 2 cm langen Schnitt wurde die Skrotalhaut mit einem Einmalskalpell (Präzisa plus, P. J. Dahlhausen & Co., Köln, Deutschland) kraneo-kaudal entlang der Längsachse des Hodens eröffnet. Es folgte die stumpfe Präparation und Darstellung des Hodens. Das Ligamentum caudae epididymidis wurde an seiner Insertion an der Tunica dartos mit der Schere durchtrennt und die eröffnete Wandung des Processus vaginalis nach kranial geschoben. Nach Anlage einer Arterienklemme am Samenstrang folgte die Ligatur des Samenstranges mit 3-0 resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 3-0, Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien) proximal und distal der Klemme. Die Absetzung des Hodens erfolgte distal der Arterienklemme. Anschließend wurde die Skrotalhaut leicht angehoben, sodass sich die Samenstrangstümpfe in die Tiefe zurückziehen konnten. Nach gründlicher Desinfektion des Operationsfeldes mit Povidon-Jod erfolgte der Wundverschluss durch zwei bis drei Einzelknopfnähte mit einem 3-0 resorbierbaren Vicryl-Faden. Die Operationszeit betrug ca. 20 min pro Ratte. Anschließend erwachten die Tiere in ihren Käfigen aus der Narkose. Die Schmerzbehandlung erfolgte bis zum 3. postoperativen Tag durch Zugabe von Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland, 200 mg/kgKG) zum Trinkwasser. Orchiectomierte Tiere, die dem Studienabschnitt B angehörten, begannen das Training frühestens drei Tage nach dem Eingriff.

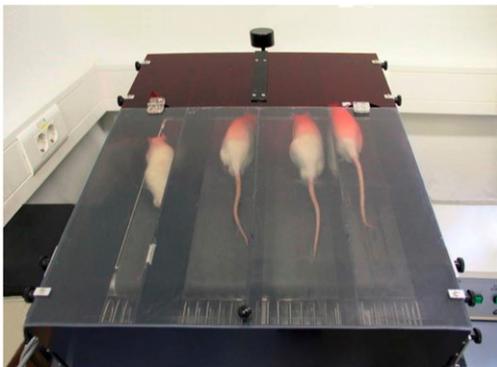
Die sham-Orchiectomie glich im prä-, intra- und postoperativen Ablauf der Orchiectomie. Intraoperativ wurden die freigelegten Hoden aber nicht abgesetzt, sondern mit einer Moskitoklemme vorsichtig mobilisiert und anschließend wieder in situ zurückgeschoben.

3.1.3 Laufbandtraining

Das insgesamt zwölf Wochen andauernde Laufbandtraining unterteilte sich in drei Phasen. Während des gesamten Trainingszeitraumes wurden die Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen je Woche (Montag - Freitag) auf einem speziellen Laufband für Ratten (TSE Treadmill - Modular treadmill for rats, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) trainiert (Abbildung 5A). Der Neigungswinkel des Laufbandes war elektronisch verstellbar und wurde mit einer digitalen Wasserwaage entsprechend der angewendeten Trainingsmodalität ausgelotet (Abbildung 5B).

Das Training wurde nur mit Tieren durchgeführt, welche selbständig aus eigener Motivation heraus kontinuierlich liefen oder aber mit geringem Aufwand bereit waren zu trainieren. Dazu zählte das sanfte Berühren des Schwanzes oder der Hinterläufe, wenn sich die Tiere ausruhen wollten. Eine vom Laufband automatisch verabreichte Stromapplikation wurde nicht angewendet. Der Ausschluss vom täglichen Training erfolgte, wenn mehr als 20 Berührungen des Schwanzes bzw. der Hinterläufe an einem Trainingstag notwendig waren. Insgesamt wurden fünf Ratten vom Versuch ausgeschlossen, da sie sich an drei Folgetagen nachhaltig dem Training verweigerten.

A



B

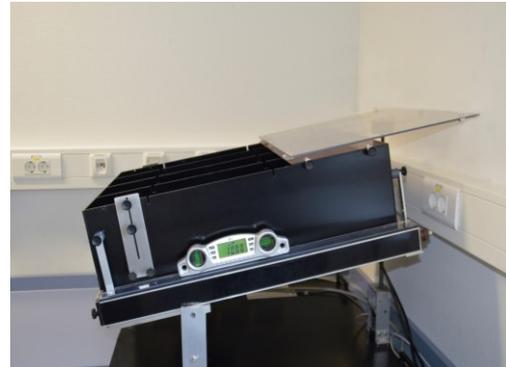


Abbildung 5: Darstellung des Laufbandtrainings in der Modalität uphill. Vier Tiere liefen gleichzeitig auf jeweils einer Bahn. Die einzelnen Bahnen waren durch Trennwände voneinander abgegrenzt, sodass sich die Tiere nicht sehen konnten (A). Der Neigungswinkel wurde mit einer digitalen Wasserwaage auf 10° Steigung eingestellt (B).

Trainingsprotokoll

Die 12 Wochen Laufbandtraining wurden in folgende drei Phasen unterteilt:

- 1. - 3. Woche: „learn-to-train“-Phase
Diese Phase beinhaltete ein Ausdauertraining mit langsamer Steigerung der Laufgeschwindigkeit und diente zur Gewöhnung der Tiere an das Laufband. In der ersten Woche liefen die Tiere 20 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 10 m/min. In der zweiten Woche wurde die Trainingsdauer auf 30 Minuten mit 15 m/min und in Woche drei auf 40 Minuten mit 20 m/min erhöht.
- 4. - 6. Woche: „train-to-train“-Phase
In dieser Phase wurde ein Intervalltraining durchgeführt und die Maximalgeschwindigkeit der jeweiligen Gruppe bestimmt. Hierfür liefen die Tiere in einer steady-state-Phase bei niedriger Geschwindigkeit von 10 m/min für sechs Zyklen von jeweils vier Minuten Dauer. Die steady-state-Phase wurde durch insgesamt fünf bout-Intervalle unterbrochen, in denen die Tiere für zwei Minuten mit ihrer jeweiligen Maximalgeschwindigkeit liefen. Der Übergang von der steady-state-Phase zum bout-Intervall erfolgte in einer Beschleunigungsphase mit stufenloser Erhöhung der Geschwindigkeit innerhalb von 30 Sekunden auf die jeweilige Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}). Die Laufgeschwindigkeit der bout-Intervalle wurde am ersten Tag der 4. Woche mit 20 m/min begonnen und an jedem folgenden Tag um 1 – 2 m/min erhöht. Im zeitlichen Verlauf konnte so die maximale Laufgeschwindigkeit (V_{\max}) der Tiere, abhängig von der jeweiligen Trainingsgruppe bestimmt werden. Daraus ergab sich für die uphill-Gruppe eine Maximalgeschwindigkeit von 28 m/min, für die level-Gruppe 35 m/min und für die downhill-Gruppe 34 m/min.
- 7. - 12. Woche: Trainingsphase
In der Trainingsphase liefen die Tiere das Intervalltraining mit der Maximalgeschwindigkeit der jeweiligen Gruppe (Abbildung 6).

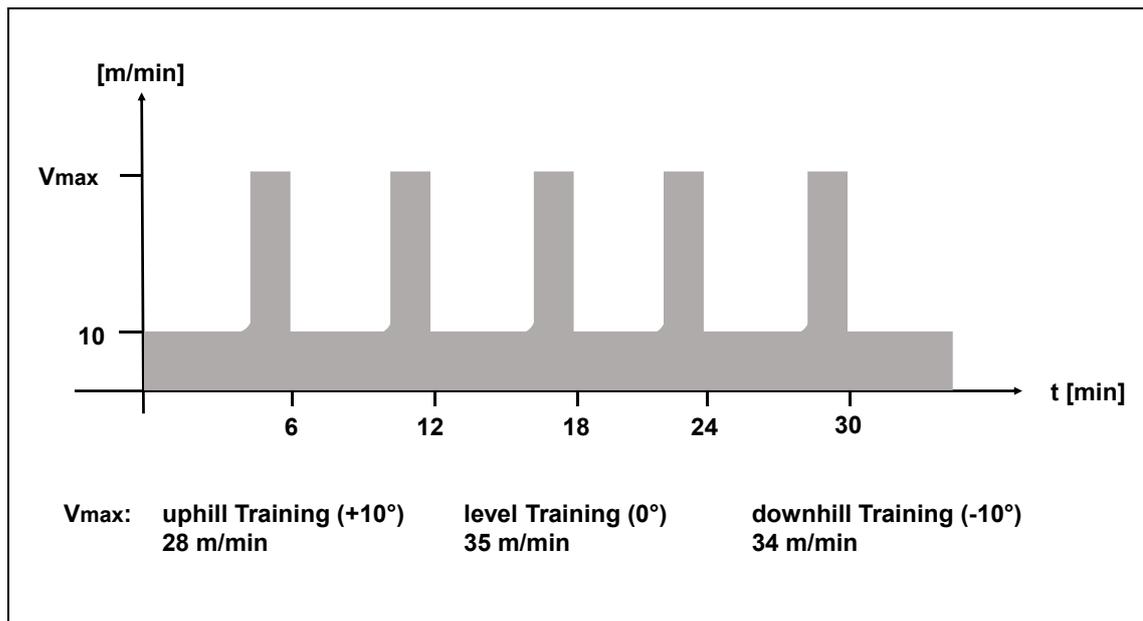


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Intervalltrainings. In der steady-state-Phase liefen die Tiere vier Minuten lang bei niedriger Geschwindigkeit von 10 m/min. Innerhalb von 30 Sekunden wurde in der Beschleunigungsphase die Geschwindigkeit dann stufenlos von 10 m/min auf die jeweilige Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) erhöht. Es folgte das zweiminütige bout-Intervall mit der Maximalgeschwindigkeit. Für die uphill-Gruppe mit 28 m/min, für die level-Gruppe mit 35 m/min und für die downhill-Gruppe mit 34 m/min. Dieses Intervall wurde insgesamt fünfmal wiederholt, immer gefolgt von einer vierminütigen steady-state-Phase bei 10 m/min und der Beschleunigungsphase von 30 Sekunden.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Muskelkraftmessung

Die biomechanische Messung der Kontraktionskraft der peripheren Skelettmuskulatur erfolgte *in vivo* mit Hilfe eines speziellen Versuchsaufbaues. Hierbei wurde in einer Messvorrichtung (Experimetria, Budapest, Ungarn) der M. soleus indirekt über den N. ischiadicus gereizt und die dabei auftretende Kontraktionskraft erfasst.

Erfassung der Muskelkraft

Die Narkose der Tiere wurde mit einer gewichtsadaptierten intraperitonealen Injektion von Ketaminhydrochlorid 10% (110 mg/kgKG) und Xylazinhydrochlorid 2%

(7 mg/kgKG) durchgeführt. Nach Rasur des linken Hinterlaufes wurden die Tiere in Bauchlage auf der Heizplatte gelagert und die Vorder- und Hinterläufe durch Pflasterstreifen fixiert.

Mit einem ca. 3 cm langen postero-lateralen Längsschnitt wurde die Haut des linken Hinterlaufes am Unterschenkel inzidiert. Es folgte die stumpfe Präparation und Darstellung der Muskelfaszie und ihre Öffnung. Dem schloss sich die Präparation der Beugemuskulatur an. Hierbei musste der M. gastrocnemius mobilisiert werden, um den darunter liegenden M. soleus freilegen zu können (Abbildung 7A). Um die Vitalität des M. soleus nicht zu gefährden, musste bei der Präparation besonders auf die Unversehrtheit der Gefäß-Nerven-Straße im proximalen Drittel des Muskels geachtet werden.

Nach vollständiger Freilegung des M. soleus und Darstellung der Achillessehne konnte das distale Muskelende am Übergang in die Achillessehne kurz oberhalb des Sehnenansatzes am Os calcaneum abgetrennt werden. Mit einer Durchflechtungsnaht nach Kirchmayr-Kessler wurde mit einem 3.0 Vicryl-Faden am distalen Ende des M. soleus eine Schlaufe angebracht.

Zur Freilegung des N. ischiadicus wurde die Haut des Oberschenkels im mittleren Drittel durch einen ca. 1,5 cm langen Schnitt eröffnet. Es folgte die Darstellung der Oberschenkelmuskulatur und die stumpfe Spreizung der Muskelbäuche um den N. ischiadicus in der Tiefe darstellen zu können (Abbildung 7B).

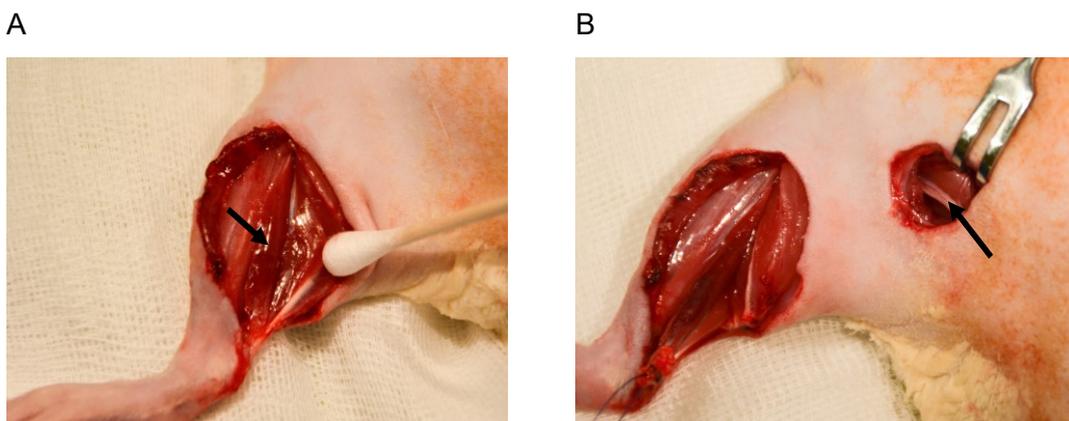


Abbildung 7: In der Abbildung A ist der frei präparierte M. soleus (Pfeil) dargestellt. Abbildung B zeigt den N. ischiadicus (Pfeil) nach Präparation.

Anschließend wurde das Tier von der Heizplatte auf die Messvorrichtung (NW-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) umgelagert. Nach Fixierung des linken Knie- und Sprunggelenkes in den entsprechenden Halterungen wurde der M. soleus über die Schlaufe mit dem Messwandler (FSG-01, Experimetria, Budapest, Ungarn) der Messvorrichtung verbunden (Abbildung 8).

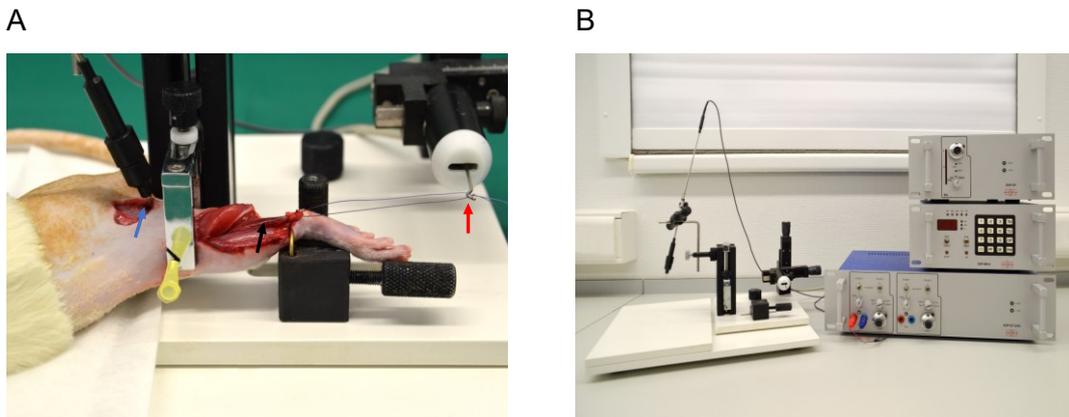


Abbildung 8: Darstellung der experimentellen Vorrichtung zur Muskelkraftmessung. Nach Präparation des M. soleus und des N. ischiadicus wurde die Ratte in Bauchlage in der Messvorrichtung platziert und das linke Knie- und Sprunggelenk entsprechend fixiert. Der M. soleus (schwarzer Pfeil) wurde indirekt über den N. ischiadicus (blauer Pfeil) gereizt (A) und die Kontraktionskraft über den Messwandler (roter Pfeil) detektiert. Das Signal wurde an den Empfänger (B) übermittelt, dort verstärkt und anschließend am Computer visualisiert.

Am freigelegten N. ischiadicus wurde die Elektrode befestigt und bipolar über Impulsgeber und Steuerungseinheit (CRS-ST-02-O, Experimetria, Budapest, Ungarn) stimuliert. Durch Applikation von Kochsalzlösung an die Kontaktstelle der Elektrode konnte die elektrische Leitfähigkeit verbessert werden.

Zur Erzeugung der Kurzkontraktion des M. soleus wurde der N. ischiadicus bipolar mit 9 mA / 75 Hz stimuliert. Dies erfolgte in fünf Pulsen von jeweils 0,1 Sekunden Dauer und 5-Sekunden-Pausenintervallen zwischen den einzelnen Pulsen. Für die Messung der maximalen tetanischen Muskelkraft wurde der M. soleus auf gleiche Weise wieder mit 9 mA / 75 Hz stimuliert, die Dauer der Pulse entsprach nun aber 3 Sekunden pro Stimulation, gefolgt von 5-Sekunden-Pausenintervallen zwischen den einzelnen Pulsen (Tabelle 1).

| Modus | Signalstärke | Signalfrequenz | Stimulation | Intervalldauer |
|-----------------|--------------|----------------|-------------|----------------|
| Kurzkontraktion | 9 mA | 75 Hz | 5 x 0,1 s | 5 s |
| Tetanie | 9 mA | 75 Hz | 5 x 3 s | 5 s |

Tabelle 1: Stimulationsablauf des N. ischiadicus für die Kurzkontraktion und Tetanie des M. soleus.

Zur Messung der Kontraktionskraft des M. soleus wurde das Signal der Muskelzugkraft durch den Messwandler an den Empfänger übermittelt und dort verstärkt (CRS-SG Experimetria, Budapest, Ungarn). Durch ein Modem (LabJack U12, LabJack Corporation, Lakewood USA) wurde das analoge Signal digitalisiert und die jeweiligen Werte mit einer speziell entwickelten Visual Basic Anwendung (Visual Basic 6, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) erfasst und gespeichert (Abbildung 9).

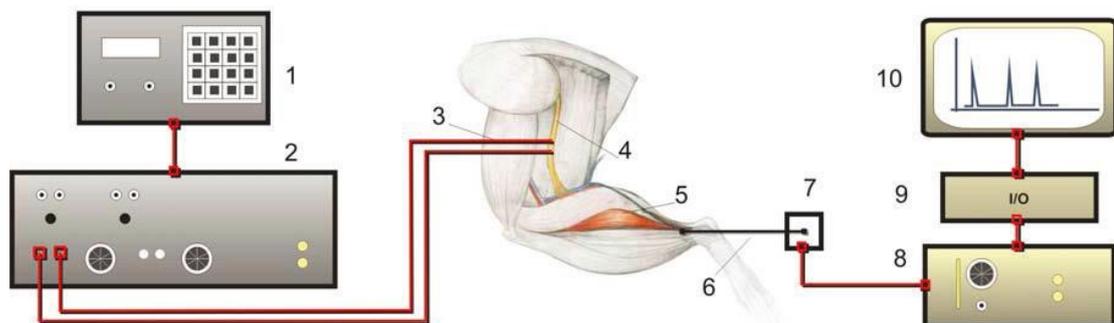


Abbildung 9: Die Elektrode (3) wird am N. ischiadicus (4) befestigt und bipolar durch den Impulsgeber (2) und die Steuerungseinheit (1) stimuliert. Um die Kontraktionskraft des M. soleus (5) zu messen, wird die Zugkraft des Muskels durch den Messwandler (6, 7) an den Empfänger (8) übermittelt und dort verstärkt. Das analoge Signal wird digitalisiert (9) und am Computer (10) visualisiert. *Abbildung modifiziert nach Stratos [Stratos 2009].*

Nach Beendigung der Muskelkraftmessungen wurde das Tier wieder auf die Heizplatte umgelagert und die Narkose vertieft. Es folgte die Entnahme und Teilung des linken M. soleus der Längsachse nach in zwei Hälften. Ein Teil wurde für nachfolgende histologische Untersuchungen in 4%iger Formalinlösung fixiert, der andere Teil der

Bestimmung der Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht zugeführt. Im Anschluss folgte die Thorakotomie und Punktion des linken Herzventrikels zur Blutentnahme. Zur Tötung der Tiere wurde eine Überdosis der Ketamin-Xylazin-Narkose verabreicht.

Berechnung der Muskelkraft

Von jedem Versuchstier wurde jeweils ein Datensatz für die Kurzkontraktion und tetanische Kontraktion des linken M. soleus erhoben. Um die Stärke der Kontraktionskraft zu bestimmen, wurde mittels Software (Microsoft Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) der Mittelwert der Amplituden von den fünf aufeinander folgenden Muskelkontraktionen berechnet (Abbildung 10).

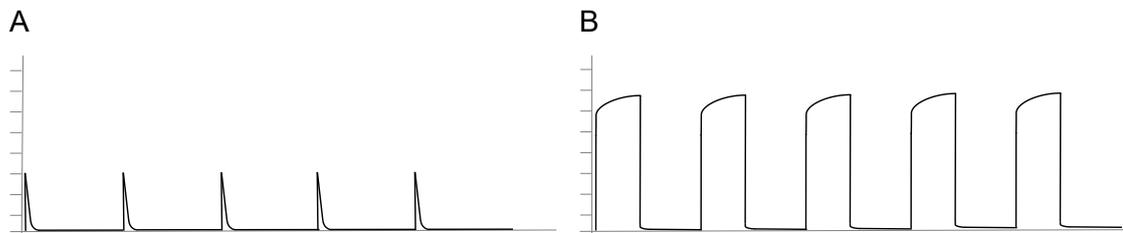


Abbildung 10: Exemplarische Datensequenzen der Muskelkraftmessung am M. soleus einer männlichen Wistar-Ratte. Auf der x-Achse ist die Zeit abgebildet und auf der y-Achse die Kontraktionskraft des Muskels bei direkter Stimulation des N. ischiadicus mit 9 mA / 75 Hz. Bild A zeigt jeweils 5 Kurzkontraktionen nach entsprechender Stimulation des N. ischiadicus für 0,1 s. Im Bild B ist die tetanische Kontraktion des M. soleus nach 5-facher Stimulation des N. ischiadicus für jeweils 3 s abgebildet.

3.2.2 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurde der M. soleus am Ende der *in vivo* Versuche entnommen und für drei Tage in 4%iger Formalinlösung (Carl Roth GmbH Co. KG) fixiert. Danach folgte die Einbettung in Paraffinwachs. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden aus den Paraffin-Blöcken 4 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Der Muskel wurde dabei vom proximalen zum distalen Ansatz in seiner longitudinalen Achse geschnitten, sodass er in voller Länge auf den Objektträgern abgebildet werden konnte. Nach unterschiedlichen histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Muskelpräparate an einem Lichtmikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung verschiedener Objektive (Abbildung 11). Alle Auswertungen wurden unter Verblindung der Gruppenzugehörigkeit durchgeführt.

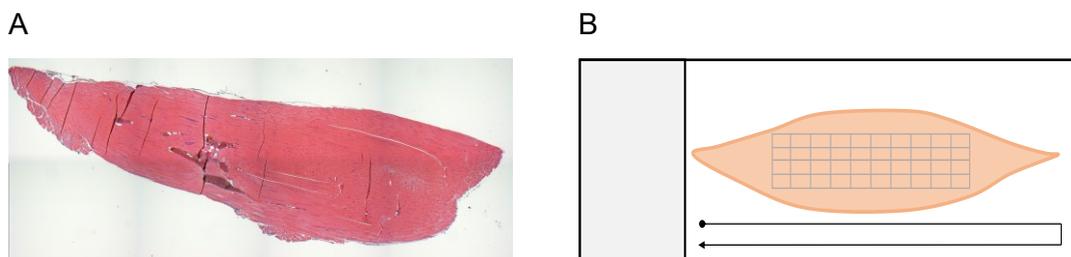


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung einer histologischen Untersuchung des linken M. soleus. Abbildung A zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme des M. soleus in 40x Vergrößerung. In der Abbildung B ist schematisch ein Objektträger mit Muskelpräparat abgebildet. Die Auswertung erfolgt meanderförmig über 40 Gesichtsfelder.

3.2.2.1 Muskelfaserdiameter

Zur Bestimmung des Muskelfaserdiameter wurden die Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und bei 200x Vergrößerung im Lichtmikroskop analysiert. Hierfür wurde bei allen im Objektfeld liegenden Muskelfasern an zwei Messpunkten der Diameter des Muskelfaserzylinders in µm bestimmt und der Mittelwert aus beiden Messwerten berechnet. Insgesamt wurden pro Schnittpräparat 40 Objektfelder meanderförmig mikroskopiert und vermessen (Abbildung 12).

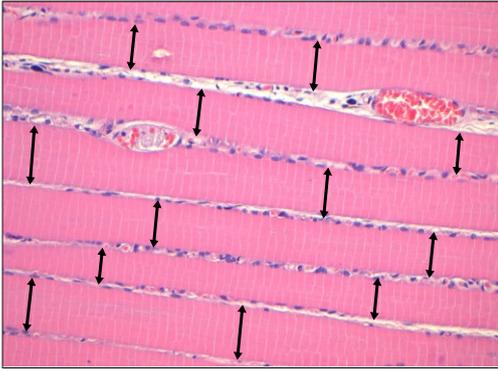


Abbildung 12:

Exemplarische Darstellung der Vermessung des Muskelfaserdiameters in einem Objektfeld eines HE-Schnittes in 200x Vergrößerung. An zwei Messpunkten wurde der Durchmesser des Muskelfaserzylinders in μm bestimmt (Doppelpfeil \updownarrow) und anschließend der Mittelwert aus beiden Messwerten berechnet.

3.2.2.2 Muskelgewebefraktion

Für die Auswertung der Muskelgewebefraktion wurde das zuvor mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Muskelpräparat in einer 40x Vergrößerung in seiner gesamten Größe digital aufgenommen (cell[^]D, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland). Mittels digitaler Bildbearbeitung (Photoshop CS4 Version 11.0.2, Adobe Systems Europe, Uxbridge, UK) wurden die Muskelfasern manuell von den restlichen Gewebestrukturen wie Kollagenfasern, Blutgefäßen oder Fettgewebe isoliert. Im Anschluss wurde die Pixelzahl der Muskelfasern planimetrisch berechnet und zum gesamten Objektfeld prozentual angegeben (Abbildung 13).

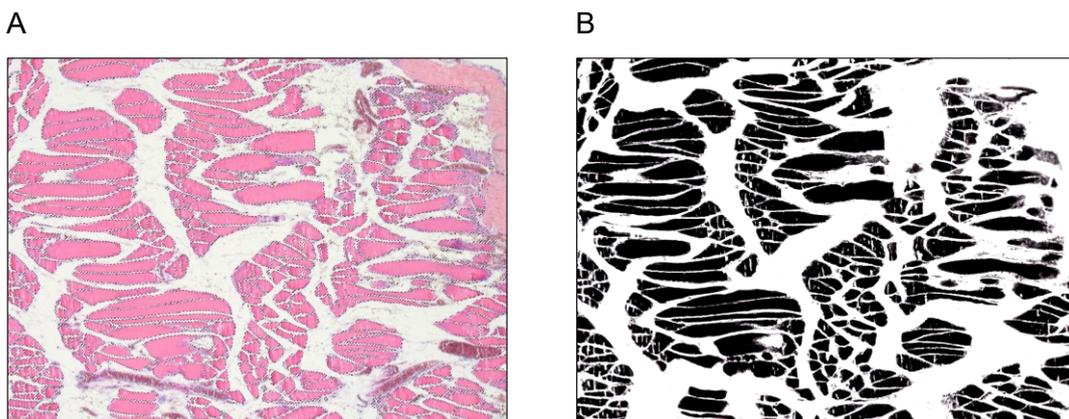


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der planimetrischen Untersuchung des M. soleus zur Bestimmung der Muskelgewebefraktion (A). Die Muskelzellen wurden digital von den restlichen Gewebestrukturen isoliert (B) und anschließend deren Fläche prozentual zur Fläche des Objektfeldes berechnet, 40x Vergrößerung.

3.2.2.3 Kollagendeposition

Die Bestimmung des Kollagenanteils im Skelettmuskelgewebe erfolgte an Muskelschnitten, welche mittels Sirius-Red-Färbung (Direct Red 80; Aldrich, Toronto, Kanada) gefärbt wurden. Die Färbung wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Auswertung wurde das gesamte Muskelpräparat in einer 40x Vergrößerung digital aufgenommen (cell^D, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) und die Bilder mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop CS4 Version 11.0.2, Adobe Systems Europe, Uxbridge, UK) digital so bearbeitet, dass sich die Kollagenfasern von den restlichen Bildstrukturen isoliert aufzeigten. Anschließend wurde die Pixelzahl der Kollagenfasern planimetrisch berechnet und der prozentuale Anteil zum gesamten Objektfeld angegeben (Abbildung 14).

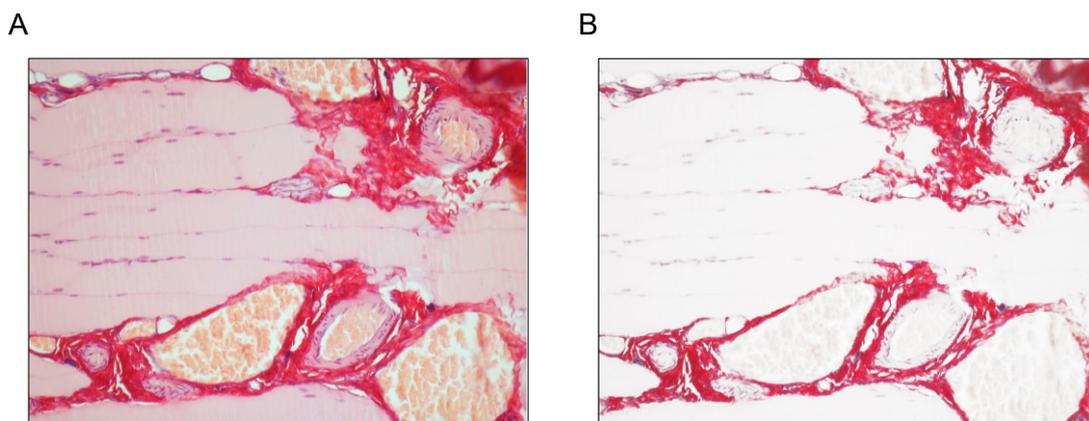


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der planimetrischen Untersuchung des M. soleus zur Bestimmung der Kollagendeposition (A). Die Kollagenfasern (rot) wurden digital von den restlichen Gewebestrukturen isoliert (B) und anschließend deren Fläche prozentual zur Fläche des Objektfeldes berechnet, 40x Vergrößerung.

3.2.2.4 Muskelzellproliferation

Der Nachweis proliferierender Zellen wurde an Muskelpräparaten durchgeführt, die mit PCNA-Antikörpern markiert waren. Die Verwendung des Anti-PCNA-antibody [PC 10] erfolgte den Angaben des Herstellers (abcam, Cambridge, UK) entsprechend mit einer Verdünnung von 1:1000. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist ein

Hilfsprotein der DNA-Polymerase-Delta und spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus eukaryotischer Zellen.

Es liegt als Homotrimer vor, wird im Zellkern proliferierender Zellen exprimiert und unterstützt den Prozess der DNA-Strangsynthese während der Replikation [Dieckman et al. 2012]. Anti-PCNA-antibody ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der PCNA-Moleküle bindet, diese markiert und somit als indirekter Marker für das Ausmaß der Zellproliferation steht. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Auszählung Anti-PCNA-antibody-positiver Zellen, die in der Einheit Zellen pro Gesichtsfeld (n/GF) angegeben wurden (Abbildung 15). Insgesamt wurden pro Muskelpräparat 40 fortlaufende Gesichtsfelder bei einer 400x Vergrößerung ausgezählt, der arithmetische Mittelwert der Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt und in Zellen pro mm² umgerechnet.

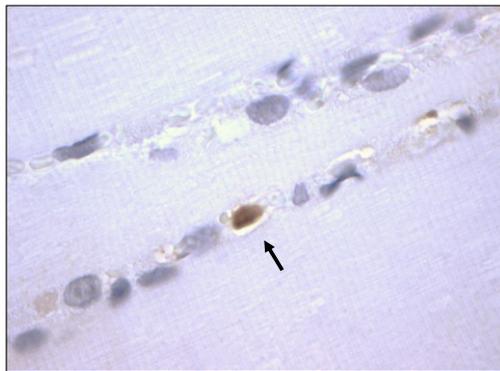


Abbildung 15:

Exemplarische Darstellung proliferierender Skelettmuskelzellen mittels PCNA-Antikörper, hier in 1000x Vergrößerung. Der Pfeil (↑) zeigt auf den bräunlich gefärbten Zellkern einer proliferierenden Skelettmuskelzelle.

3.2.2.5 Muskelzellapoptose

Der histologische Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen erfolgte mittels TUNEL-Methode (S7101 ApopTag kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Die Färbung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, zudem kamen Objektträger mit Poly-L-Lysin-Beschichtung zum Einsatz.

Während der Zellapoptose kommt es durch Endonukleasen bedingt zu Fragmentation und Abbau der zellulären DNA (Desoxyribonukleinsäure). Bei der TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) bindet das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) an die endständigen Hydroxygruppen (3'OH-Gruppen) der frei werdenden DNA-Stücke und fügt an diese biotinylierte Polydesoxyuridylnukleotide an. Diese Nukleotide werden dann durch einen farblich markierten Antikörper sichtbar gemacht [Loo 2011].

Im histologischen Präparat wurden die apoptotischen Muskelzellen anhand ihrer braunen Färbung erkennbar. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Auszählung TUNEL-positiver Zellen, die in der Einheit Zellen pro Gesichtsfeld (n/GF) angegeben wurden (Abbildung 16). Insgesamt wurden pro Muskelpräparat 40 fortlaufende Gesichtsfelder bei einer 400x Vergrößerung ausgezählt, der arithmetische Mittelwert der Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt und in Zellen pro mm² umgerechnet.



Abbildung 16:

Exemplarische Darstellung apoptotischer Skelettmuskelzellen mittels TUNEL-Färbung, hier in 1000x Vergrößerung. Der Pfeil (↑) zeigt auf den bräunlich gefärbten Zellkern einer apoptotischen Skelettmuskelzelle.

3.2.3 Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht

Zur Berechnung der Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht wurde das Muskelpräparat des linken M. soleus unmittelbar nach der Entnahme mit einer Präzisionswaage gewogen und das Feuchtgewicht bestimmt. Anschließend wurde es für 42 Tage bei 60 °C im Trockenschrank gelagert und danach das Trockengewicht ermittelt.

3.2.4 Serum-Testosteron-Wert

Am Ende der Muskelkraftmessung wurden die Tiere thorakotomiert und durch Punktion des linken Herzventrikels Blut entnommen. Es folgte die Zentrifugation des Blutes bei 3500 U/min über 12 Minuten (GS15-Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) zur Gewinnung des Blutserums. Die Bestimmung der Testosteronkonzentration im Serum wurde mit einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Lesegerät (Victor™ X3, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts,

USA) durchgeführt. Hierfür wurde das dazugehörige ELISA kit (Testosterone (5E801): sc-73144 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) verwendet.

3.3 Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse [„one way analysis of variance“ (1-way-ANOVA)], gefolgt vom Fisher-LSD-Test. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der Software Sigmaplot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software in Diagrammen dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Beobachtungen

Nach der Orchiektomie wurden die Tiere in ihre Käfige gebracht, bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet und dem gewohnten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus zugeführt. Alle Tiere erwachten ohne Komplikationen aus der Narkose, erholten sich rasch und zeigten nach kurzer Zeit wieder ein normales Ess- und Trinkverhalten. Eine Gewichtsabnahme wurde nicht beobachtet. Die Wunde heilte reizlos und trocken ohne Zeichen einer lokalen Infektion.

4.2 Muskelkraftmessung

4.2.1 Tetanie

Bei der biomechanischen Messung der tetanischen Muskelkraft führte die elektrische Stimulation des N. ischiadicus bei allen Tieren nach einer Sekunde zur tetanischen Kontraktion des M. soleus mit gleichem Kontraktionsmuster. Zwischen den orchiektomierten Tieren der ORX-Gruppe und den sham-orchiektomierten Tieren der Kontrollgruppe zeigten sich nach 4 und 8 Wochen Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. Nach 12 Wochen konnte bei den orchiektomierten Tieren eine statistisch relevante Abnahme der tetanischen Muskelkraft gegenüber der sham-Gruppe festgestellt werden. Die Tiere aller drei Laufgruppen zeigten eine signifikant höhere Muskelkontraktionskraft als die untrainierten Tieren der 12-Wo-ORX-Gruppe. Zudem konnte bei den Tieren die uphill und downhill laufen eine statistisch relevante höhere Muskelkontraktionskraft gegenüber den Tieren der level-Gruppe gemessen werden. Desweiteren zeigte sich, dass die kastrationsbedingte Schwäche der Muskelkraft durch uphill- und downhill-Training ausgeglichen und auf das Niveau der sham-Gruppe angehoben werden konnte (Abbildung 17).

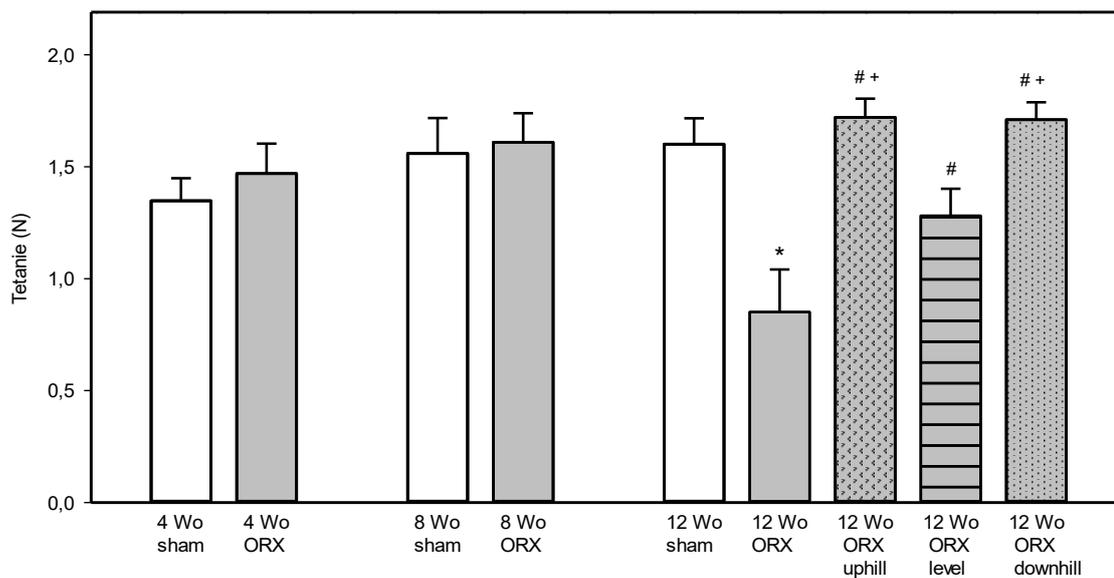


Abbildung 17: Graphische Darstellung der tetanischen Muskelkontraktionskraft in Newton (N). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA; * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. 12-Wo-ORX, + $p < 0,05$ vs. 12-Wo-ORX-level.

4.2.2 Kurzkontraktion

Die Muskelkraft bei Kurzkontraktion zeigte bei allen neun Versuchsgruppen eine ähnliche Kinetik wie die tetanische Kontraktionskraft, jedoch nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Die Orchiectomie zeigte zu keinem Messzeitpunkt einen statistisch relevanten Effekt auf die Muskelkraft bei Kurzkontraktion. Ebenso verhielt es sich mit dem Laufbandtraining. Weder uphill- noch level- oder downhill-Training führten zu einer signifikanten Zunahme der Muskelkraft bei Kurzkontraktion (Abbildung 18).

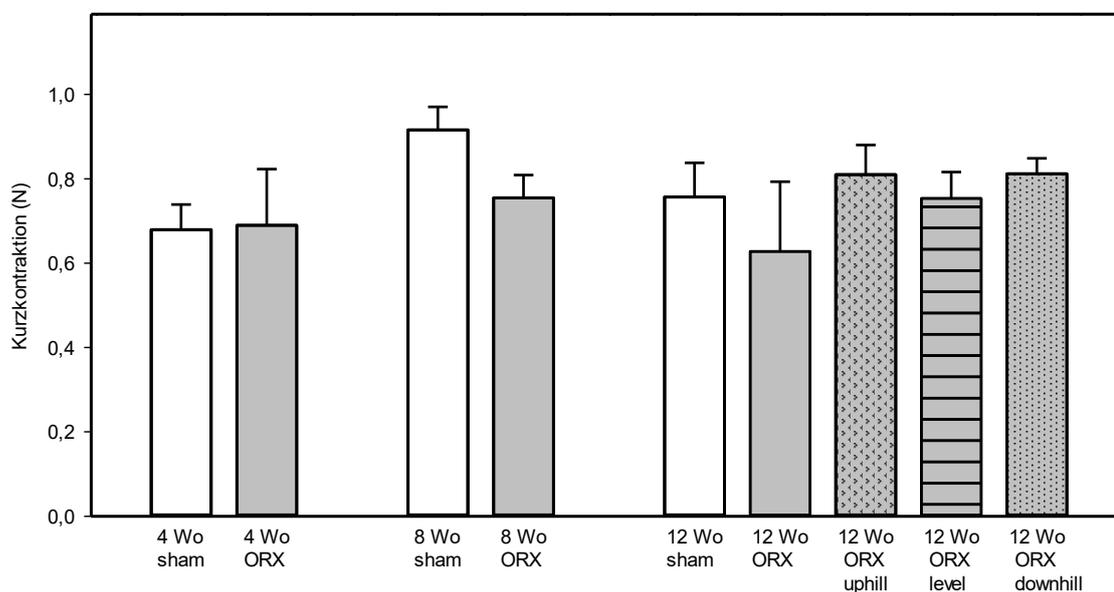


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Muskelkontraktionskraft bei Kurzkontraktion in Newton (N). Dargestellt sind orchiectomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiectomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiectomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA.

4.2.3 Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie

Die Ratio von Kurzkontraktion zu tetanischer Kontraktion gibt das Verhältnis von schnell und langsam kontrahierenden Muskelfasern des M. soleus an [Stratos et al. 2010]. Im Beobachtungszeitraum zwischen 4 und 8 Wochen zeigte sich sowohl in der sham-Gruppe als auch in der ORX-Gruppe ein dezenter Anstieg der Ratio, allerdings ohne statistische Signifikanz. Bei den Tieren der drei Trainingsgruppen konnten keine statistisch relevanten Unterschiede ausgemacht werden (Abbildung 19).

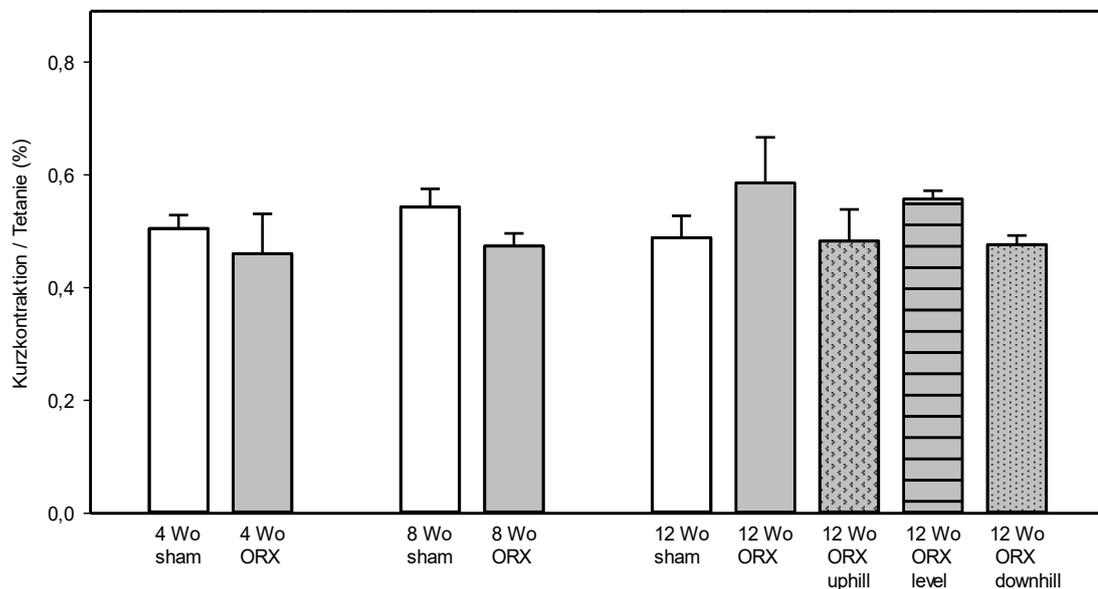


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Ratio von Kurzkontraktion zu tetanischer Kontraktion in Prozent (%). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA.

4.3 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

4.3.1 Muskelfaserdiameter

Die Orchiektomie führte zur Abnahme des Muskelfaserdiameter. Nach 4, 8 und 12 Wochen Beobachtungszeitraum zeigte sich ein signifikant verminderter Muskelfaserdiameter bei den orchiektomierten Tieren im Vergleich zu den Tieren der sham-Gruppe. Im Gegensatz dazu konnte durch das Laufbandtraining ein positiver Effekt auf den Muskelfaserdiameter erzielt werden. Alle Tiere der Trainingsgruppen wiesen signifikant größere Muskelfaserdiameter als die untrainierten orchiektomierten Tiere auf. Der Anstieg des Muskelfaserdiameter gegenüber der 12-Wo-ORX-Gruppe betrug bei der uphill-Gruppe ca. 14%, bei der level-Gruppe ca. 13% und bei der downhill-Gruppe ca. 17%. Zudem zeigten alle Trainingsgruppen auch höhere Werte als die sham-Kontrollgruppe. Bei den Tieren der downhill-Gruppe war der Muskelfaserdiameter dabei signifikant höher als bei den Tieren der sham-Gruppe (Abbildung 20).

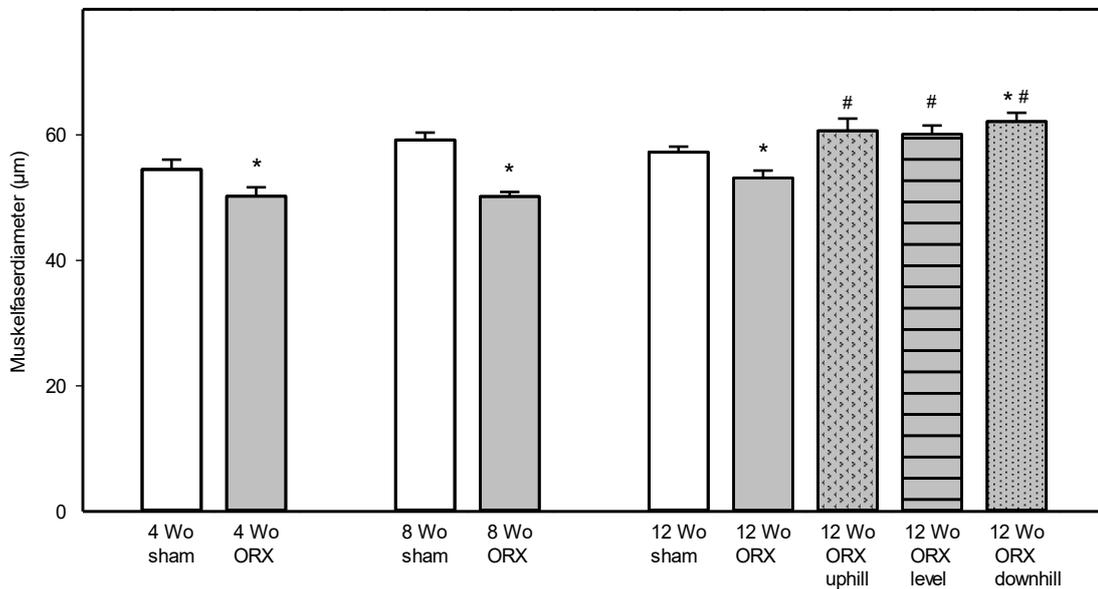


Abbildung 20: Graphische Darstellung des Muskelfaserdiameter in Mikrometern (μm). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, $n=6$ pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, $n=6$ pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill ($n=6$ pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA; * $p<0,05$ vs. sham, # $p<0,05$ vs. 12-Wo-ORX.

4.3.2 Muskelgewebefraktion

Die Muskelgewebefraktion beschreibt den planimetrisch berechneten prozentualen Anteil von intaktem Muskelgewebe im gesamten Muskelschnittpräparat. Innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 21). Die Orchiektomie und das Laufbandtraining wirkten sich nicht wesentlich auf die Muskelgewebefraktion aus. Der Anteil des Muskelgewebes am Muskelschnittpräparat war zwischen den Gruppen und Zeitpunkten nahezu vergleichbar und lag zwischen 68% bis 84%.

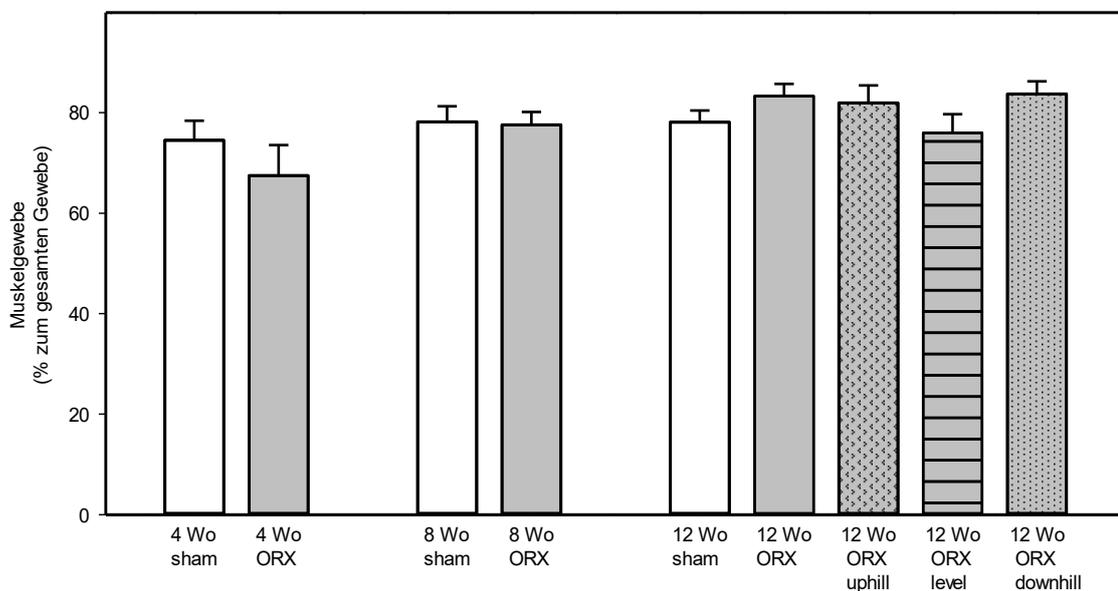


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Muskelgewebefraktion in Prozent (%). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA.

4.3.3 Kollagendeposition

Mit Bestimmung der Kollagendeposition wurden die Kollagenproduktion der muskulären Fibroblasten und die Bindegewebsbildung gemessen. Die Orchiektomie führte nach 4, 8 und 12 Wochen zur Abnahme des Kollagenanteils im Muskelgewebe. Allerdings war die Abnahme gegenüber der sham-Orchiektomie nicht statistisch signifikant. In den Laufgruppen zeigte sich ein heterogenes Bild. Während der Kollagenanteil in der uphill- und level-Gruppe unter dem der 12-Wo-ORX-Gruppe lag, konnte bei Tieren der downhill-Gruppe eine höhere Kollagendeposition im Vergleich zur 12-Wo-ORX-Gruppe ermittelt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dagegen zeigte sich in der sham-Gruppe und in der downhill-Gruppe eine signifikant höhere Kollagendeposition als in der level-Gruppe. Bei der sham-Gruppe konnte ein Anstieg des Kollagenanteils auf mehr als das Doppelte im Vergleich zur level-Gruppe gemessen werden. Die Zunahme des Kollagenanteils bei den Tieren der downhill-Gruppe war 1,3 mal größer als in der level-Gruppe (Abbildung 22).

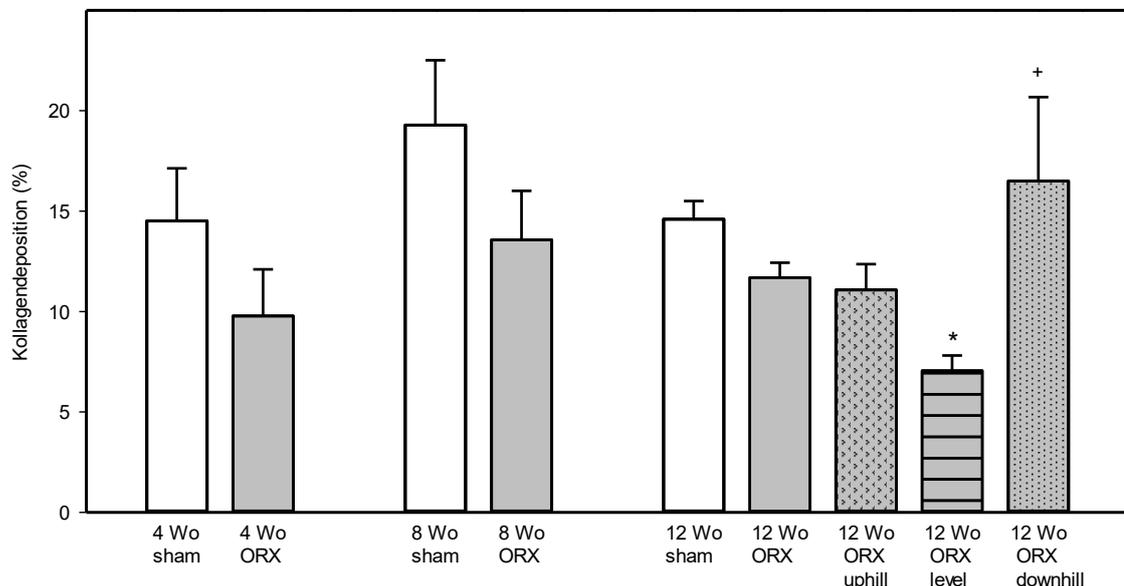


Abbildung 22: Graphische Darstellung des Kollagenanteils im Muskelgewebe in Prozent (%). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA; * $p < 0,05$ vs. sham, + $p < 0,05$ vs. 12-Wo-ORX-level.

4.3.4 Muskelzellproliferation

Zur Messung der Zellproliferation wurden die PCNA-positiven Zellen bestimmt. Zwischen den orchiektomierten Tieren der ORX-Gruppe und den sham-orchiektomierten Tieren der Kontrollgruppe zeigten sich nach 4 und 8 Wochen Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. In beiden Gruppen kam es im zeitlichen Verlauf zu einer geringen Abnahme der PCNA-positiven Zellen, ohne statistische Relevanz. Tiere, die im uphill-Training liefen, hatten eine signifikant höhere Muskelzellproliferation als die Tiere der beiden anderen Laufgruppen und die ruhenden Tiere der 12-Wo-ORX-Gruppe. Zudem war die Anzahl der PCNA-positiven Zellen in der uphill- und downhill-Gruppe signifikant höher als in der ruhenden sham-Kontrollgruppe (Abbildung 23 und 24). Der Zuwachs proliferierender Zellen pro mm² Muskelgewebe war in der uphill-Gruppe 2,4 mal höher und in der downhill-Gruppe fast doppelt so hoch wie in der sham-Gruppe.

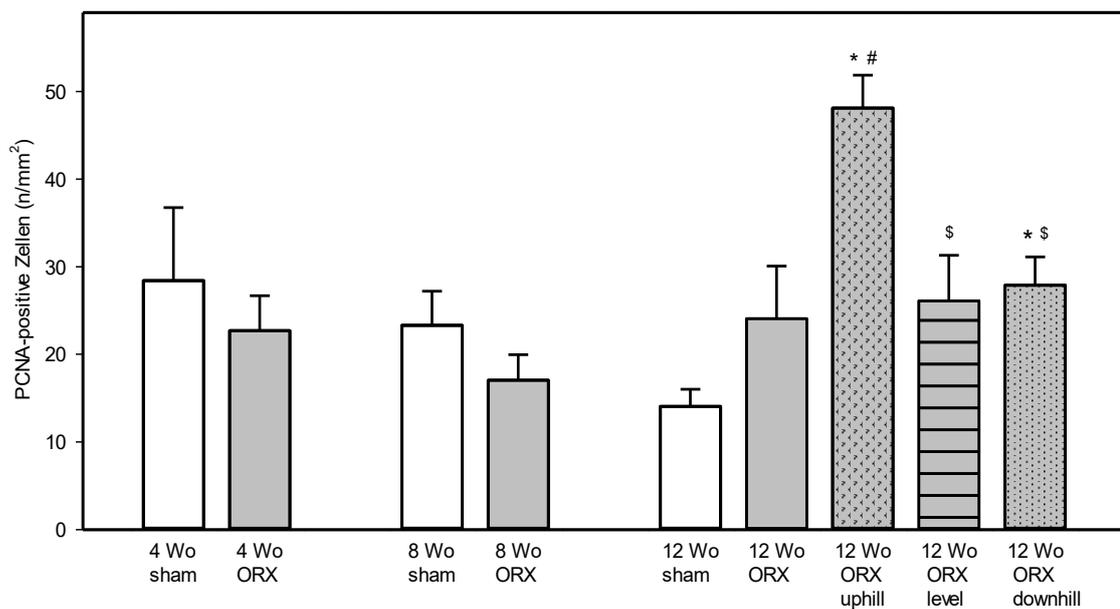


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Anzahl PCNA-positiver Zellen (n/mm²) zur Bestimmung der Muskelzellproliferation. Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA; * p<0,05 vs. sham, # p<0,05 vs. 12-Wo-ORX, \$ p<0,05 vs. 12-Wo-ORX-uphill.

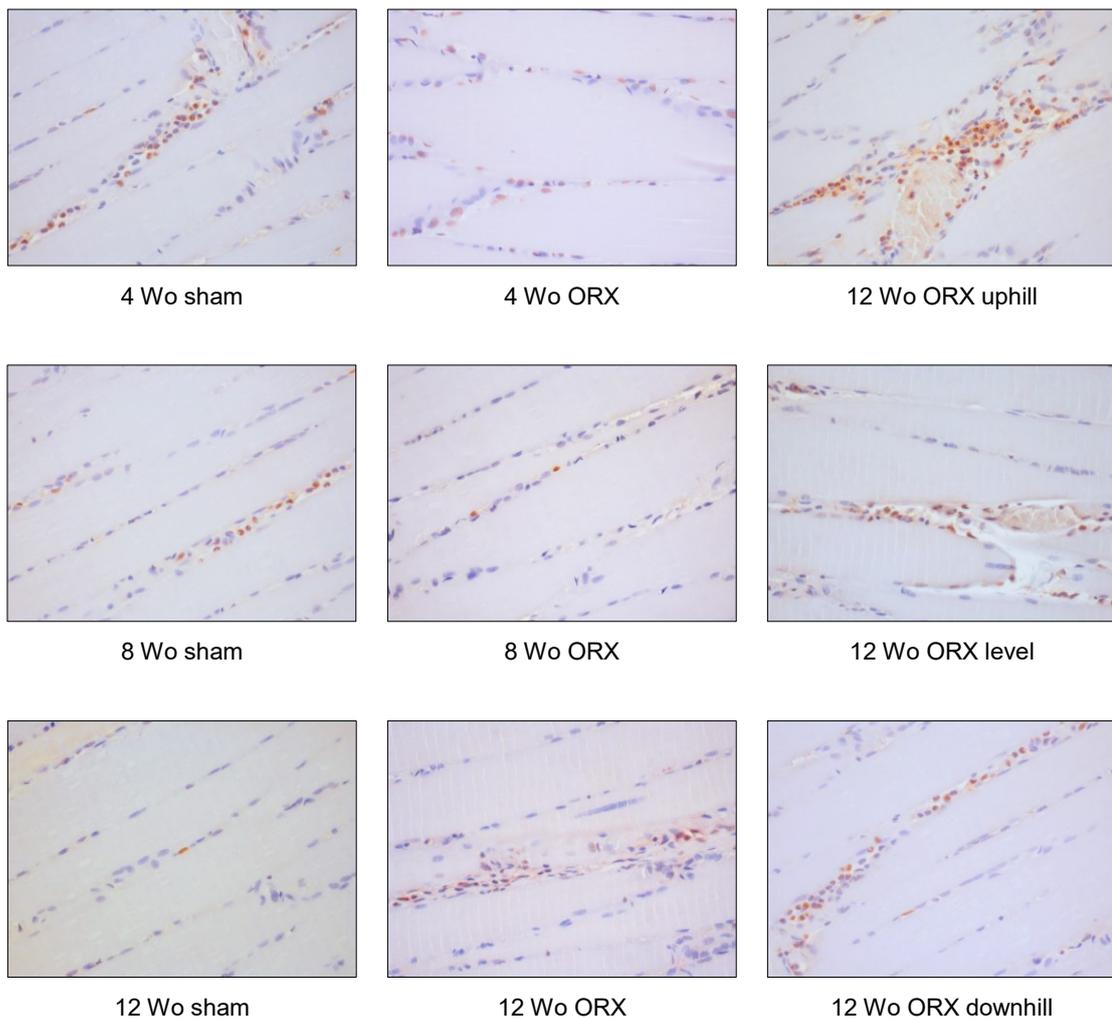


Abbildung 24: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur der einzelnen Versuchsgruppen mit PCNA-Antikörper-Färbung. Dargestellt sind jeweils longitudinale Schnittbilder des linken M. soleus von sham-orchiektomierten (sham) und orchiektomierten (ORX) Tieren nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie von orchiektomierten Tieren nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill. Die proliferierenden Zellen sind im histologischen Präparat anhand ihrer braun-rötlichen Färbung erkennbar. 400x Vergrößerung.

4.3.5 Muskelzellapoptose

Die Anzahl der TUNEL-positiven apoptotischen Skelettmuskelzellen stieg durch die Orchiectomie bedingt im zeitlichen Verlauf an und zeigte bei den orchiectomierten Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen signifikant höhere Werte als bei den sham-orchiectomierten Tieren der Kontrollgruppen. Auch zeigten alle Laufgruppen eine höhere Apoptoserate als die sham-Gruppe, jedoch nur die uphill-Gruppe auf einem statistisch signifikanten Niveau (Abbildung 25 und 26). Bei den trainierten Tieren konnten in der level- und downhill-Gruppe eine signifikant geringere Apoptoserate gegenüber der 12-Wo-ORX-Gruppe gemessen werden. Dabei konnte die Anzahl der Apoptosezellen pro mm^2 Muskelgewebe in der level-Gruppe um ca. 30% und in der downhill-Gruppe um ca. 38% im Vergleich zu den orchiectomierten, untrainierten Tieren gesenkt werden. Die Anzahl der apoptotischen Zellen der uphill-Gruppe war ebenfalls niedriger als die der 12-Wo-ORX-Gruppe, allerdings ohne statistische Relevanz. Zudem war bei den Tieren der downhill-Gruppe eine um 30% signifikant geringere Muskelzellapoptose gegenüber den Tieren der uphill-Gruppe auszumachen.

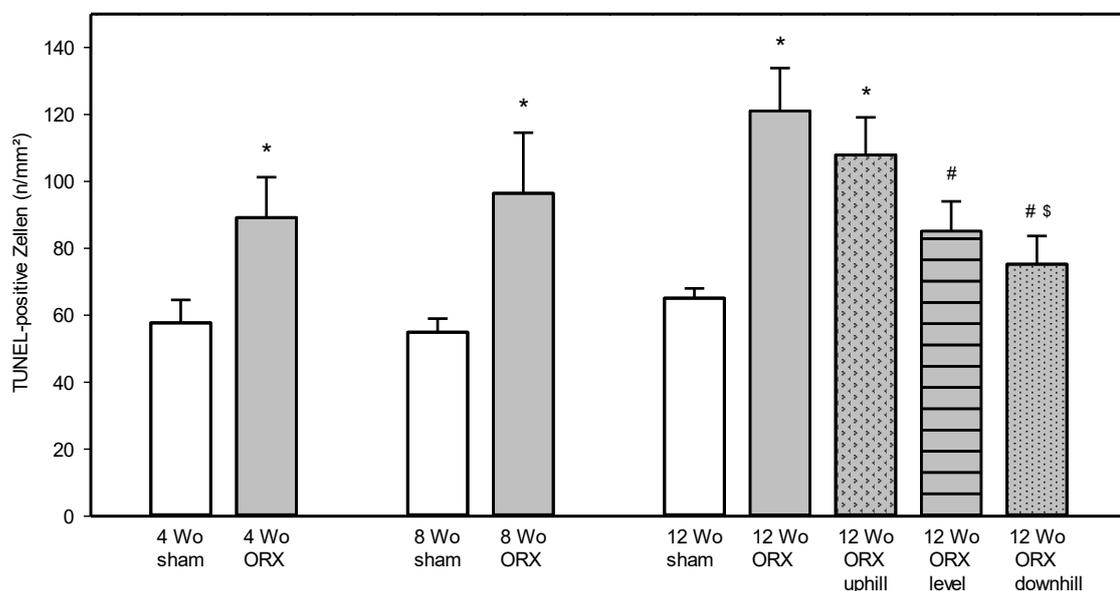


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen (n/mm^2) zur Bestimmung der Muskelzellapoptose. Dargestellt sind orchiectomierte (ORX, $n=6$ pro Zeitpunkt) und sham-orchiectomierte (sham, $n=6$ pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiectomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill ($n=6$ pro Laufgruppe). Angegeben

sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA; * $p < 0,05$ vs. sham, # $p < 0,05$ vs. 12-Wo-ORX, \$ $p < 0,05$ vs. 12-Wo-ORX-uphill.

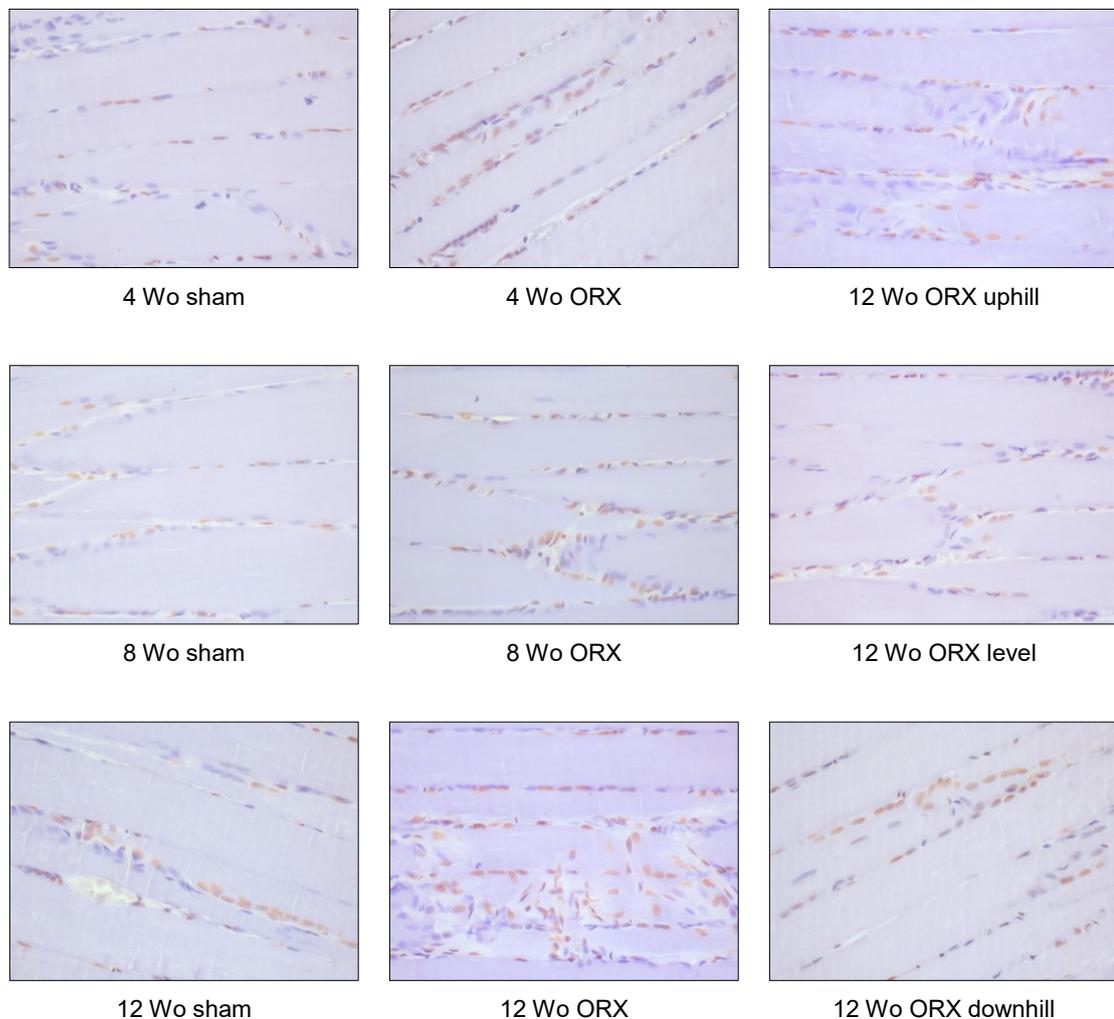


Abbildung 26: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Skelettmuskulatur der einzelnen Versuchsgruppen in TUNEL-Färbung. Dargestellt sind jeweils longitudinale Schnittbilder des linken M. soleus von sham-orchiektomierten (sham) und orchiektomierten (ORX) Tieren nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie von orchiektomierten Tieren nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill. Die apoptotischen Zellen sind im histologischen Präparat anhand ihrer braunen Färbung erkennbar. 400x Vergrößerung.

4.4 Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht

Die Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht spiegelt den Proteinanteil innerhalb des untersuchten Muskels wider. Insgesamt zeigte die Orchiektomie zu keinem Messzeitpunkt einen statistisch relevanten Effekt auf das Muskelgewicht. Ebenso verhielt es sich mit dem Laufbandtraining. Weder uphill-, noch level- oder downhill-Training führten zu einer signifikanten Veränderung der Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht (Abbildung 27).

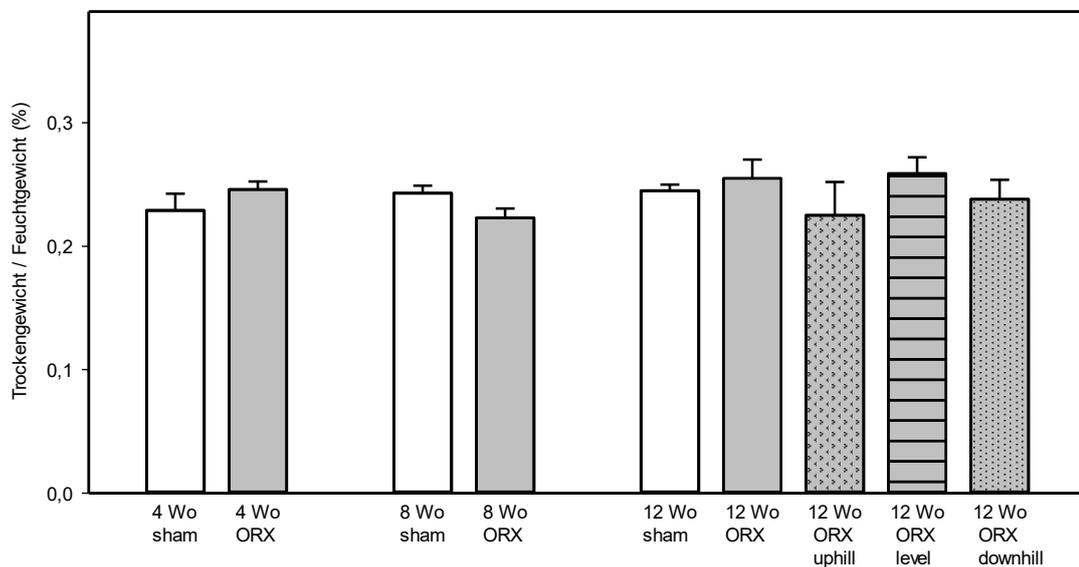


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ration von Trocken- zu Feuchtgewicht des M. soleus in Prozent (%). Dargestellt sind orchiektomierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-orchiektomierte (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tiere nach 4, 8 bzw. 12 Wochen (Wo), sowie orchiektomierte Tiere nach 12 Wochen Laufbandtraining in den Modalitäten uphill, level und downhill (n=6 pro Laufgruppe). Angegeben sind der Mittelwert \pm SEM; one-way ANOVA.

4.5 Serum-Testosteron-Wert

Die Testosteronwerte im Serum lagen bei allen orchiektomierten Tieren unterhalb der ELISA Nachweisgrenze ($< 0,2$ ng/ml). Bei den sham-orchiektomierten Tieren zeigte sich zu keinem der Untersuchungszeitpunkte ein wesentlicher Unterschied (4 Wo sham: $2,7 \pm 0,8$ ng/ml, 8 Wo sham: $2,4 \pm 0,9$ ng/ml, 12 Wo sham: $2,4 \pm 0,7$ ng/ml).

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie führte die Orchiektomie zu einer Reduktion des Serum-Testosteronspiegels unterhalb der Nachweisgrenze ($< 0,2$ mg/ml), wogegen sich die Werte bei sham-orchiektomierten Tieren zu keinem Untersuchungszeitpunkt unterschieden.

Die tetanische Muskelkraft zeigte zwischen der ORX-Gruppe und der sham-Kontrollgruppe nach 4 und 8 Wochen Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. Eine Abnahme der tetanischen Muskelkontraktionskraft konnte bei den orchiektomierten Tieren nach 12 Wochen erfasst werden. Das Laufbandtraining führte in allen Modalitäten zur Erhöhung der tetanischen Muskelkontraktionskraft, wobei uphill- und downhill-Laufen dem Laufen in der Ebene hierbei überlegen waren.

Die Muskelkraft bei Kurzkontraktion sowie die Ratio von Kurzkontraktion zu tetanischer Kontraktion wurden weder durch Orchiektomie, noch durch Laufbandtraining beeinflusst und zeigten innerhalb der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten keine Unterschiede.

Der Muskelfaserdiameter reduzierte sich unter dem Einfluss der Orchiektomie, wohingegen das Laufbandtraining in allen Modalitäten zur Zunahme des Muskelfaserdiameter führte. Dabei erzielten die Tiere der downhill-Gruppe signifikant höhere Muskelfaserdiameter als die Tiere der sham-Gruppe.

Die Orchiektomie und das Laufbandtraining wirkten sich nicht wesentlich auf die Muskelgewebefraktion aus, der Anteil des Muskelgewebes am Muskelschnittpräparat war zwischen den Gruppen und Zeitpunkten nahezu vergleichbar.

Während die Orchiektomie keinen signifikanten Einfluss auf den Kollagenanteil hatte, zeigte sich beim Laufbandtraining in der downhill-Gruppe eine deutlich höhere Kollagendeposition als bei der level-Gruppe.

Die Zellproliferation wurde durch die Orchiektomie nicht beeinflusst, dagegen führte das Laufbandtraining zur Zunahme der proliferierenden Muskelzellen. Dabei

erreichte das uphill-Training gegenüber den anderen beiden Laufgruppen signifikant höhere Proliferationswerte. Auch war die Anzahl der PCNA-positiven Zellen in der uphill- und downhill-Gruppe signifikant höher als in der ruhenden sham-Kontrollgruppe.

Im zeitlichen Verlauf stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen und zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten bei den orchiektomierten ruhenden Tieren höhere Werte im Vergleich zu den Tieren der sham-Gruppe. Das Lauftraining in den Modalitäten level und downhill führte dagegen zur Reduktion der Apoptoserate. Zudem konnte durch das downhill-Laufen eine geringere Muskelzellapoptose gegenüber dem uphill-Laufen gemessen werden.

Die Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht wurde weder durch die Orchiektomie, noch durch das Laufbandtraining statistisch relevant beeinflusst.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Die Ratte als Versuchstier

Die Ratte ist ein etabliertes Modelltier zur Untersuchung des muskuloskelettalen Systems und eignet sich neben Studien zu Osteoporose und Knochenheilung auch zur Untersuchung von Sarkopenie und Muskelverletzungen. Der Vorteil von Nagetieren wie Mäusen und Ratten liegt in ihrem kurzen Fortpflanzungszyklus und der hohen Reproduktionsrate [Seo et al. 2014], sodass auch Studien mit mehreren Gruppen und größerer Anzahl an Tieren durchgeführt werden können. Ihre Haltung unter Laborbedingungen ist einfacher, platzsparender und mit geringeren Kosten und Aufwand verbunden als die größerer Versuchstiere [Histing et al. 2011]. Des Weiteren besteht gegenüber Tierversuchen mit Nagetieren eine größere gesellschaftliche Akzeptanz als bei Verwendung größerer Tiere wie z.B. Hunden, Schweinen oder Schafen.

Durch die kurze Lebenszeit von 2 - 3 Jahren bietet sich die Ratte als Versuchstier an, um Mechanismen und Veränderungen im Alterungsprozess des Skelettmuskels zu erforschen [Ballak et al. 2014]. Während bei Studien am Menschen nur Muskelanteile in Form von Biopsien untersucht werden, besteht bei der Ratte die Möglichkeit den Muskel in toto zu sezieren. Die Muskelmorphologie sowie zelluläre und molekulare Mechanismen können somit am Muskel als „Ganzes“ analysiert werden [Alway et al. 2005].

Zur Untersuchung der Muskelfunktion wird meistens die Wadenmuskulatur der Vorder- oder Hinterläufe verwendet. Vorteil ist die gute chirurgische Zugänglichkeit des Muskels selbst, als auch seiner nervalen Versorgung. Nachteil ist die geringe Muskelgröße, was die Messtechnik erschwert und die Menge des histologisch untersuchbaren Gewebes begrenzt [Pratt et al. 2012]. Für die Messung der Muskelkontraktionskraft können sowohl der M. extensor digitorum longus [Kung et al. 2014] als auch der M. soleus [Stratos et al. 2012] oder der M. gastrocnemius [Betik et al. 2009] verwendet werden.

Neben Nagetieren werden auch Primaten als Sarkopenie-Modell eingesetzt, da ihre anatomischen und physiologischen Gegebenheiten denen des Menschen am ähnlichsten sind. Die genetischen Übereinstimmungen machen sie für die Untersuchung der zellulären und molekularen Grundlagen der Sarkopenie interessant [Feng et al. 2012]. Bedingt durch ihre lange Lebenszeit kommen sie zudem in mehrjährigen Langzeitstudien zum Einsatz [McKiernan et al. 2009]. Limitiert wird ihre Verwendung neben den hohen Kosten und der begrenzten Verfügbarkeit vor allem durch ethische Gesichtspunkte. Auch an wirbellosen Tieren wie der Drosophila-Fliege [Demontis et al. 2013] oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [Fisher 2004] werden Untersuchungen zur Sarkopenie durchgeführt. Als einfache Modellorganismen bieten sie die Möglichkeit groß angelegter Studien zur Analyse intrazellulärer molekularer Signalwege und genetischer Veränderungen. Gegenüber Nagetieren treten sie als Versuchstiere allerdings in den Hintergrund. Diese Vor- und Nachteile abwägend lag es nahe für diese Studie Wistar-Ratten zu verwenden.

5.1.2 Orchiektomie zur Induktion der Andropause

Die Orchiektomie ist ein anerkanntes Modell, um die Andropause im Tierversuch zu simulieren und somit den Einfluss von verringerten Testosteronwerten auf das muskuloskeletale System zu untersuchen. Im Tiermodell kommen verschiedene Methoden zur Induktion der Andropause zum Einsatz. Ein häufig angewendetes Verfahren stellt die chirurgische Kastration dar, die auch in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Diese wird bei männlichen Tieren durch Orchiektomie (ORX) und bei weiblichen durch Ovariektomie herbeigeführt. Bereits wenige Stunden nach chirurgischer Kastration kommt es zum Absinken des Serum-Testosteronspiegels unter die Nachweisgrenze von 0,2 mg/ml [Maatman et al. 1985; Lin et al. 1994]. Bei der chemischen Kastration werden meist Androgenrezeptor- und Östrogenrezeptor-Antagonisten sowie Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMS) oder 5- α -Reduktase-Inhibitoren verwendet. Allerdings ist das Enzym 5- α -Reduktase vor allem im Prostatagewebe und nur zu einem geringen Anteil im Muskel und Knochen aktiv. Durch seine Inhibition wird daher die anabole Testosteronwirkung vor allem an der Prostata und weniger im muskuloskelettalen System gehemmt [Borst et al. 2005]. Neuere Methoden, die alternativ angewendet werden, sind die bilaterale intratestikuläre Injektion von hypertoner Salzlösung [Emir et al. 2008] und die testikuläre Kryoablation [Ozcan et

al. 2015]. Beide Verfahren erreichen vergleichbar niedrige Serum-Testosteronwerte wie die chirurgische Kastration, sind aber weniger invasiv und mit einem geringeren Risiko für Komplikationen behaftet.

Bei männlichen Ratten ist eine kastrations-induzierte Muskelatrophie mit Veränderungen auf zytomorphologischer Ebene je nach Studie ab der 1. bis 5. Woche nach Kastration ersichtlich und quantifizierbar [Jiang und Klueber 1989; Prezant et al. 1997; Jones et al. 2010]. Neben Abweichungen im Sarkomeraufbau mit unregelmäßigen Z-Linien kommt es zu degenerativen Veränderungen der mitochondrialen Strukturen [Oner et al. 2008]. Durch die Androgendeprivation werden intramuskuläre Signalwege gehemmt und anabole Stoffwechselforgänge, wie die myofibrilläre Proteinsynthese und die Expression von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 reduziert [White et al. 2013]. Die verschiedenen Muskelgruppen sprechen unterschiedlich stark auf die Androgendeprivation der Kastration ein. Dies ist unter anderem durch die Variabilität der Androgenrezeptordichte bedingt [Rooy et al. 2016]. So ist die Anzahl der Rezeptoren im testosteronsensiblen M. levator ani und M. bulbocavernosus deutlich höher als in Skelettmuskeln, wie dem M. soleus oder M. extensor digitorum longus [Axell et al. 2006]. Gleichwohl zeigt sich in allen genannten Muskeln eine Abnahme der Muskelmasse nach Kastration, im M. levator ani und M. bulbocavernosus bereits sieben Tage nach Kastration, in der Skelettmuskulatur nach 30 Tagen [Naeyer et al. 2014]. Des Weiteren führt die Kastration bei Nagern bereits nach vier Wochen zur Abnahme der Querschnittsfläche der Muskelfasern von Typ I und Typ IIa [Oner et al. 2008; White et al. 2013]. Ebenso lässt sich eine signifikante Reduktion der Muskelkraft mit Abnahme der maximalen Kraftproduktion in peripheren Skelettmuskeln sowohl *in vivo* [Brown et al. 2001] als auch *in vitro* Messungen feststellen [Axell et al. 2006; Naeyer et al. 2014]. In der Zusammenschau der genannten zytomorphologischen und biomechanischen Veränderungen zeigt sich, dass kastrierte Nagetiere als Modell für die Sarkopenie etabliert und geeignet sind.

5.1.3 Gruppen und Zeitpunkte der Untersuchung

Um eine Kinetik der untersuchten Parameter nach Orchiectomie zu beschreiben, wurden in der vorgestellten Arbeit drei Zeitpunkte ausgewählt. Weiteres Ziel des experimentellen Aufbaus war es, die zytomorphologischen und biomechanischen

Veränderungen der Skelettmuskulatur nach Orchiektomie und Laufbandtraining darzustellen und diese mit einer sham-Orchiektomie zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das Verfahren der chirurgischen Kastration angewendet. Die Kastration führte zur Deprivation des Serum-Testosteronspiegels mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 mg/ml. Auf Grundlage der im vorherigen Abschnitt vorgestellten Literatur ist davon auszugehen, dass 12 Wochen nach Kastration ausreichend sind, um intramuskuläre Veränderungen im Sinne einer Sarkopenie nachweisen zu können. Um die Kinetik der muskulären Veränderungen zu beobachten, wurden die Untersuchungszeitpunkte 4, 8 bzw. 12 Wochen nach Kastration gewählt.

5.1.4 Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen

In der vorliegenden Studie wurde der regenerative Einfluss von uphill-, level- und downhill-Laufen auf die Skelettmuskulatur im Tiermodell der andropausalen Ratte untersucht. Das Laufverhalten des Menschen als Zweibeiner und der Ratte als vierbeinigem Organismus weist zweifelsohne Unterschiede auf, da das quadrupedale Laufen der Ratte eine andere Beweglichkeit der Hüft- und Kniegelenke als das bipedale Laufen des Menschen voraussetzt. Allerdings gibt es auch einige Parallelen im Aktivierungs- und Steuerungsmuster des Bewegungsablaufes. So konnte durch elektromyographische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Muskulatur der unteren Extremitäten, die während der Stand- und Schwungphase des Laufens kontrahiert, bei Mensch und Ratte gleich ist [Hosoido et al. 2013]. Um Übereinstimmungen in der neuronalen Kontrolle von bi- und quadrupedalem Laufen aufzuzeigen, studierten Wada und Kollegen das zweibeinige Laufverhalten von Ratten. Hier zeigte sich, dass die elektrische Aktivität in der Elektromyographie (EMG) des M. longissimus der Rückenmuskulatur als auch des Kniestreckers M. rectus femoris während der Bewegung der Hinterläufe beim bi- und quadrupedalen Laufen gleich ist [Wada et al. 2008]. Die Interaktion zwischen Vorder- und Hinterläufen ist ein Hauptcharakteristikum des quadrupedalen Laufens und erfordert eine genaue Koordination der Muskelkontraktion der einzelnen Beine. Der bipedale Gang des Menschen weist ähnliche Koordinationsmechanismen auf. So zeigten mehrere Studien mit Katzen, dass beiden Gangarten eine gemeinsame Verschaltung und gleiche neuronale Kontrollmechanismen auf spinaler Ebene haben [Dietz 2002]. Weiterhin ist

belegt, dass beim Menschen und der Katze die gleichen Muskelgruppen für den Übergang von der Stand- in die Schwungphase zuständig sind [Duysens und van de Crommert 1998; van de Crommert et al. 1998]. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden weitere Gang-Untersuchungen an Katzen mit spinalen Läsionen durchgeführt, die als Ansatzpunkt für die Behandlung von Patienten mit neuromuskulären Krankheitsbildern wie z.B. Rückenmarkverletzungen dienen [van de Crommert et al. 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurde folglich davon ausgegangen, dass durch das Laufbandtraining bei Ratten die gleichen Muskelgruppen wie beim Menschen beansprucht werden und dadurch ein ähnlicher Reiz am Muskel ausgeübt wird.

Zudem weist der Alterungsprozess der Skelettmuskulatur der Ratte viele Parallelen zu dem der menschlichen Muskulatur auf. So zeigen beide Spezies einen Verlust der Muskelmasse mit Reduktion des Muskelfaserdiameters bei gleichzeitiger Zunahme des intramuskulären Fett- und Bindegewebsanteils [Cartee 1995]. Die Abnahme der Muskelmasse ist auch bei der Ratte vor allem durch den Verlust der schnellen Typ-II-Muskelfasern bedingt und geht mit einer Degeneration von Motoneuronen einher [Ballak et al. 2014; Kung et al. 2014]. Die verringerte neuronale Stimulation der Muskelfasern und ihre raschere Ermüdbarkeit führen auch im Tiermodell zu einer verminderten Kontraktionsgeschwindigkeit mit Abnahme der Muskelkraft. Die pathophysiologischen Mechanismen der Sarkopenie sind somit bei beiden Spezies vergleichbar [Tamaki et al. 2014].

Zur Untersuchung altersbedingter Veränderungen erfolgt die Messung der Muskelmasse und Muskelkraft in den meisten klinischen Studien am M. quadriceps femoris der Oberschenkelmuskulatur. Hingegen wird im tierexperimentellen Modell häufig die Wadenmuskulatur mit M. gastrocnemius und M. soleus verwendet. Mehrere Studien zeigen allerdings, dass der Alterungsprozess und die damit einhergehende Kraftreduktion in beiden Muskelgruppen identisch sind und beim Menschen und der Ratte in sehr ähnlicher Weise verlaufen. Unter dieser Voraussetzung ist der Vergleich und die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen somit möglich [Ballak et al. 2014].

5.1.5 Laufbandtraining

Um den Einfluss von körperlicher Aktivität auf das muskuloskeletale System zu untersuchen, kommen im experimentellen Tiermodell verschiedene Trainingsformen

zum Einsatz. Neben Schwimmen [Nascimento et al. 2008], Klettern bzw. Treppensteigen [Braggion et al. 2016], Ganzkörper-Vibrationstraining [Komrakova et al. 2013] oder Springübungen [Corazza et al. 2013] werden vor allem Laufübungen häufig durchgeführt. Das Laufbandtraining für Nagetiere ist hierbei ein etabliertes Modell und findet in vielen Studienprotokollen Anwendung [Laughlin et al. 2006; Jendzjowsky und DeLorey 2011; Hoshino et al. 2013]. Es bietet den Vorteil, dass die Laufgeschwindigkeit und der Steigungs- bzw. Neigungswinkel individuell an die jeweilige Trainingsgruppe angepasst werden können. Somit ist die Durchführung von Ausdauer-, als auch Intervalltraining möglich. Zudem ermöglicht es mehrere Tiere gleichzeitig zu trainieren. Beispielsweise nutzten Diaz-Herrera und Kollegen ein 12-wöchiges Intervalltraining, mit vier Intervallen und einer Maximalgeschwindigkeit von 48 m/min, um die Zunahme der Skelettmuskelmasse bei männlichen Ratten zu bestimmen [Diaz-Herrera et al. 2001].

In der vorliegenden Studie wurden die regenerativen Eigenschaften von verschiedenen Laufmodalitäten auf den sarkopenen Skelettmuskel untersucht. Uphill-, level- und downhill-Training stellen hierbei unterschiedliche Reize für den Skelettmuskel dar. Beim downhill-Laufen wird der Muskel einem Widerstand ausgesetzt und es kommt vor allem zur exzentrischen Muskelkontraktion [Gault et al. 2012; Rodio und Fattorini 2014]. Der Kniestrecker (M. quadriceps femoris) übernimmt dabei eine Bremsfunktion und hält die Muskelbewegung stabil und unter Kontrolle [Maeo et al. 2015]. Durch das Abbremsen wird der Körperschwerpunkt des Tieres im Lot gehalten, sodass auch bei stärkerer Neigung eine konstante Laufgeschwindigkeit möglich ist [Armstrong et al. 1983]. Dabei ist die mechanische Belastung des Muskels vor allem während des Bodenkontaktes des Fußes erhöht [Assumpcao et al. 2013]. Eine andauernde exzentrische Kontraktion kann durch Destruktion der Muskelfasern zu einem Muskeltrauma führen [Armstrong et al. 1983] und den regenerativen Effekt des Lauftrainings vermindern. Dies zeigt sich neben dem Anstieg von Entzündungsmediatoren und Kreatinkinase [Isanejad et al. 2015] auch in strukturellen Veränderungen des Muskels [Touchberry et al. 2012]. Während des uphill-Laufens werden konzentrische Kontraktionskräfte eingesetzt [Vogt und Hoppeler 2014], Muskelursprung und -ansatz nähern sich einander an und der Muskel verkürzt sich aktiv [Frontera und Ochala 2015]. Die Entstehung eines Muskeltraumas wird hierbei nicht beschrieben [Lynn und Morgan 1994; Lynn et al. 1998]. Das Laufen in der horizontalen Ebene stellt eine Zwischenstufe mit gleichen Anteilen an konzentrischer und exzentrischer Kontraktion dar, sodass die belastenden Auswirkungen auf die

Skelettmuskulatur zwischen denen des uphill- und downhill-Trainings eingestuft werden können.

Der Steigungs- bzw. Neigungswinkel wird in den meisten tierexperimentellen Studien mit 10 - 20° angegeben [Heinemann et al. 2012; Hamann et al. 2014], sodass der in der vorliegenden Studie gewählte Winkel von 10° als moderat angesehen werden kann.

In einigen Studien wurden die Ratten durch negative Verstärkung in Form eines milden elektrischen Schocks zum Laufen motiviert [Tiidus et al. 2005; Noble et al. 2006; Hayes et al. 2008; Kurosaka et al. 2012; Lomonosova et al. 2014]. Da dieser Reiz eine nicht unerhebliche Belastung darstellt und eine Stressreaktion bei den Tieren auslösen kann, wurde auf diese Methode im vorgestellten Studienprotokoll verzichtet. Stattdessen wurde das kontinuierliche Laufen der Tiere durch sachte Berührung des Hinterlaufes bzw. des Schwanzes gewährleistet. Diese Methode kommt in verschiedenen Studienprotokollen im Laufbandtraining von Nagetieren erfolgreich zur Anwendung [Murphy et al. 2004; Shin et al. 2013].

5.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden

5.2.1 Diagnostik der Sarkopenie bei Mensch und Tier

In klinischen Studien kommen verschiedene Messmethoden und Grenzwerte zur Diagnostik der Sarkopenie zur Anwendung, sodass der Vergleich der Ergebnisse oft nur eingeschränkt möglich ist und eine einheitliche Diagnosestellung schwierig ist. Von der EWGSOP wurden daher Empfehlungen hinsichtlich der Diagnostikmethoden gegeben. Für die Messung der Muskelmasse gelten bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) als Goldstandard. In den Schnittbildern ist eine gute Abgrenzung des Muskelgewebes zu Knochen und Fettgewebe möglich. Allerdings sind diese Verfahren mit hohen Kosten, großem Aufwand und einer eingeschränkten Verfügbarkeit verbunden, sodass sie im klinischen Gebrauch eher in den Hintergrund rücken. Ein sowohl in der Forschung als auch im klinischen Alltag verwendetes Verfahren stellt die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (dual energy X-ray absorptiometry, abgekürzt DXA) dar. Ihr Vorteil liegt in der niedrigeren Strahlenbelastung im Vergleich zum CT und den geringeren Kosten [Cruz-Jentoft et al.

2010]. Bei der bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) werden mittels elektrischer Messung die Körperzusammensetzung und damit auch die Muskelmasse bestimmt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren eine Alternative zu den oben genannten darstellt [Chien et al. 2008; Bosaeus et al. 2014]. Andere Verfahren wie Ultraschall, Bestimmung der Kreatininausscheidung, Gesamtkörperkalium-Messung oder antropometrische Messungen treten als Diagnostikmethoden dagegen in den Hintergrund.

Auch im Tiermodell kommen bildgebende Verfahren wie CT oder MRT für die Messung der Muskelmasse bei der Diagnostik der Sarkopenie zur Anwendung [Zancanaro et al. 2007; Bollheimer et al. 2012; Weber et al. 2012; Esposito et al. 2013; Fellner et al. 2014]. Durch Verwendung des Micro-CT können mehrere non-invasive Messungen an einem Tier durchgeführt werden und Veränderungen der Muskelmasse und -größe im zeitlichen Verlauf detektiert werden. Zudem kann mit diesem Verfahren auch der Muskelfaserdiameter bestimmt werden. Da oftmals eine manuelle Bildanalyse notwendig ist, sind die Messungen zeitaufwendig und die Größe des Studienkollektivs begrenzt [Weber et al. 2012]. Mittels MRT-Bildgebung bestimmten Zancanaro und Kollegen den Zuwachs der Muskelmasse nach einem 12-wöchigen Laufbandtraining bei Mäusen. Sie untersuchten dafür sowohl den M. quadriceps femoris, als auch den M. gastrocnemius [Zancanaro et al. 2007]. Allerdings ist die Differenzierung und Abgrenzung der einzelnen Muskeln untereinander von der Auflösungskapazität des Messgerätes abhängig und kann bei kleineren Muskelgruppen schwierig werden [Fellner et al. 2014]. Zudem lässt die Bestimmung der Muskelmasse mittels Bildgebung alleine keine Aussage über die Funktionalität der sarkopenen Muskulatur zu.

Für die Messung der Muskelkraft empfiehlt die EWGSOP die Prüfung der Handdruckstärke. Sie ist im klinischen Alltag unter Verwendung eines Hand-Dynamometers gut umsetzbar und korreliert mit der Muskelkraft der unteren Extremitäten. Der Grenzwert liegt bei Männern unterhalb 30 kg und für Frauen unterhalb 20 kg [Lauretani et al. 2003; Cruz-Jentoft et al. 2010]. Die Messung der körperlichen Leistungsfähigkeit erfolgt häufig unter Anwendung des short physical performance battery-Tests (SPPB-Test), der aus drei einzelnen Tests besteht. Neben der Standsicherheit und der Ganggeschwindigkeit wird hierbei auch die Geschwindigkeit bei mehrmaligem Erheben aus sitzender Position heraus bestimmt. Die Messung der Ganggeschwindigkeit kann dabei auch als Einzeltest angewendet werden. Von einer verminderten Leistungsfähigkeit wird ausgegangen, wenn die Ganggeschwindigkeit bei einer Gehstrecke von vier Metern, weniger als 0,8 m/s beträgt [Guralnik et al. 2000].

Da die Bestimmung der willkürlichen Muskelkraft sowie der körperlichen Leistungsfähigkeit im Tiermodell nur bedingt möglich ist, werden zur Messung der funktionellen Eigenschaften vor allem die *in-vivo*-Muskelkraftmessung eingesetzt [Betik et al. 2009; Kung et al. 2014]. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Studie angewendet und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.2 Muskelkraftmessung

Zur Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften der Skelettmuskulatur wurde in vorliegender Studie ein Versuchsaufbau verwendet, bei dem die Messung der Muskelkraft über isometrische Kontraktion des M. soleus erfolgte. Die Stimulation wurde indirekt über Reizung des N. ischiadicus erreicht. Der Muskel wurde nur an seinem distalen Sehnenansatz abgelöst und war während des gesamten Messvorgangs vaskulär und neuronal versorgt. Die quantitative Messung von Kurzkontraktion und tetanischer Kontraktion diente zur Bestimmung der maximalen Muskelkraft der Ratten nach Orchiektomie und Laufbandtraining. Das hierbei angewendete Messprotokoll wurde in Anlehnung an bereits erfolgreich durchgeführte Studien erstellt [Matziolis et al. 2006; Rotter et al. 2012].

Die Kraftentwicklung des Skelettmuskels ist von vielen Faktoren abhängig. Neben der Größe und dem Aufbau der Muskelfasern spielt die Anzahl der Aktin-Myosin-Verbindungen und nicht zuletzt auch die neuronale Versorgung eine große Rolle. Der neuronale Reiz gelang in Form eines Aktionspotentials an die motorische Endplatte der Muskelzelle und führt intrazellulär zur Freisetzung von Kalzium. Folglich kommt es zur Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten und zur Muskelkontraktion [Frontera und Ochala 2015]. Über die Frequenz der Aktionspotentiale und Rekrutierung der motorischen Einheiten wird die Ausbildung der Kraft gesteuert. Bei der tetanischen Kontraktion summieren sich die Kräfte der Einzelkontraktionen und es kommt zur maximalen Kraftentwicklung. Während beim unvollständigen Tetanus die Einzelzuckungen noch voneinander abgrenzbar sind, verschmelzen sie bei der vollständigen Tetanie miteinander. Die Intervalle zwischen den einzelnen Impulsen sind dann kürzer als die Dauer der einzelnen Zuckung selbst, sodass die aufeinanderfolgenden Kontraktionen überlappen [Raikova et al. 2008; Drzymala-Celichowska et al. 2010].

Vorteil invasiver *in-vivo*-Messverfahren ist die hohe Messgenauigkeit. Durch sorgfältige chirurgische Präparation und Freilegung des Muskels und zugehörigen Nervs kann die Kontraktionskraft eines einzelnen Muskels bei direkter und indirekter Stimulation bestimmt werden [Betik et al. 2009; Weber et al. 2012]. Die Innervation von umliegendem Gewebe und dadurch entstehende Messartefakte wird somit vermieden. Allerdings ist die Erfassung und Bewertung der Kontraktionskraft im zeitlichen Verlauf an einem Tier, der Invasivität des Verfahrens geschuldet, nicht möglich [Chawla et al. 2014]. Bei der direkten Muskelstimulation ist die Masse des aktivierten Muskelgewebes von der Positionierung der Elektroden abhängig. Zwischen den Elektroden kann ein unkontrolliertes Spannungsfeld entstehen, das zur Mitaktivierung von antagonistischen Muskeln führt und Einfluss auf das Messergebnis nimmt. Dagegen wird bei der indirekten Stimulation über den versorgenden Nerv eine vollständige Aktivierung der gesamten Muskelmasse erreicht [Giannesini et al. 2005]. Ein weniger invasives *in-vivo*-Messverfahren ist die Elektromyographie (EMG), bei der die elektrische Muskelaktivität in Form von Potentialänderungen einzelner motorischer Einheiten abgeleitet wird. Sie kann als oberflächen- oder intramuskuläres EMG durchgeführt werden [Kallio et al. 2012; McKinnon et al. 2015]. Allerdings kann die Kraftmessung auch hier durch Innervation von umliegendem Gewebe beeinflusst werden [Chawla et al. 2014]. Weitere Möglichkeiten stellen die Messung der Muskelkraft mittels hydraulischem Drucksensor [Giannesini et al. 2005; Chiu et al. 2011] oder Dynamometer [Ashton-Miller et al. 1992; Cutlip et al. 1997 und 2004; Geronilla et al. 2003] dar. Die *in-vivo*-Messung findet bei physiologisch intakter vaskulärer und neuronaler Versorgung statt. Dagegen wird der Muskel bei *in-vitro*-Untersuchungsverfahren aus seinem physiologischen Umfeld isoliert und die Kontraktionskraft bei direkter Stimulation gemessen [Dutka et al. 2012; Naeyer et al. 2014].

5.2.3 Narkose

Die chirurgische Präparation und biomechanische Messung der Muskelkraft macht eine Anästhesie der Tiere unabdingbar. In der vorliegenden Studie wurde die Narkose mittels Ketamin / Xylazin durchgeführt, was ein etabliertes und weit verbreitetes Anästhesieverfahren im Rahmen von tierexperimentellen Studien darstellt [Stokes et al. 2009]. Ketamin verhindert über die Blockade des NMDA-Rezeptors die Freisetzung von Acetylcholin und führt als dissoziatives Anästhetikum zu einer raschen Bewusstlosigkeit

und suffizienten Analgesie [McGuinness et al. 2011]. Xylazin ist ein zentral und peripher bindender α_2 -Rezeptoragonist, der ebenfalls sedativ und analgetisch wirkt [Veilleux-Lemieux et al. 2013]. Beide Substanzen werden schnell resorbiert, in der Leber verstoffwechselt und über die Nieren ausgeschieden [Hijazi und Boulieu 2002].

Bei Narkoseverfahren kann es durch die systemische Wirkung der Anästhetika zur Depression des respiratorischen und kardiovaskulären Systems, mit Vasodilatation und Reduktion der Körpertemperatur kommen. Allerdings ist die hämodynamische Instabilität bei Ketamin / Xylazin im Vergleich zu anderen Narkotika geringer ausgeprägt [Albrecht et al. 2014]. Durch die Lagerung auf der Heizplatte wurde das Abkühlen der Tiere vermieden und eine konstante Körpertemperatur aufrecht gehalten. Zudem erfolgte die Narkotikagabe über intraperitoneale Injektion, um unerwünschte Nebenwirkungen der intravasalen Gabe zu vermeiden.

Narkotika haben des Weiteren Auswirkung auf die Skelettmuskulatur und können die Kontraktionskraft beeinflussen [Lapointe und Cote 1999]. Allerdings macht die *in-vivo* Untersuchung am vitalen Muskel eine Narkose der Tiere notwendig, auf die aus ethischen und physiologischen Gründen nicht verzichtet werden kann. Dies betrifft die Muskelkraftmessung aller Versuchstiere und kann somit als systematischer Einflussfaktor angesehen werden, der dem Versuchsaufbau geschuldet hingenommen werden muss. Durch die gewichtsadaptierte Dosierung (110 mg/kgKG Ketamin und 7 mg/kgKG Xylazin) wurde eine Überdosierung vermieden und der Einfluss der Narkose auf die biomechanischen und histomorphologischen Ergebnisse so gering wie möglich gehalten.

5.2.4 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte zur Erfassung und Visualisierung der pathophysiologischen und morphologischen Veränderungen des Skelettmuskels neben der Muskelkraftmessung auch die histologische und immunhistochemische Auswertung des Muskelgewebes. Hierfür wurden unterschiedliche Färbetechniken angewendet, um das Muskelpräparat lichtmikroskopisch auszuwerten und planimetrisch zu vermessen.

Mit Hilfe histologischer Schnittbilder ist es möglich, die intramuskulären Strukturen auf zellulärer Ebene abzubilden. Eine hierfür weit verbreitete Färbemethode ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die gerne als konventionelle Übersichtsfärbung verwendet wird. Hämatoxylin ist ein natürlicher kationischer Farbstoff der

basophile Strukturen wie DNA, Zellkern und Ribosomen blau färbt. Eosin als synthetischer, negativ geladener Säurefarbstoff bindet an basische Strukturen wie Proteine, Zytoplasma und Kollagen und färbt diese rot [Fischer et al. 2008; Chan 2014]. Zur Vermessung des Muskelfaserdiameters wurde die HE-Färbung gewählt, da die deutliche Färbung von Zytoplasma, Zellmembran und randständigen Zellkernen eine gute Detektion der genannten Strukturen ermöglicht und sich die einzelnen Muskelfasern so klar voneinander abgrenzen lassen. Zudem erfolgte die Bestimmung der Muskelgewebefraktion an HE-Schnitten, da diese Färbung eine eindeutige Differenzierung zwischen Muskel und restlichen Gewebestrukturen wie Kollagenfasern, Blutgefäßen oder Fettgewebe zulässt.

5.2.4.1 Kollagendeposition

Die Darstellung von Kollagen in histologischen Schnitten und seine quantitative Messung durch computergestützte Bildanalyse stellt ein wichtiges Verfahren zur Beurteilung der Lokalisation und Verteilung von Bindegewebsfasern im Gewebe dar [Segnani et al. 2015]. Sirius-Red ist ein starker anionischer Farbstoff, der mit seinen Sulfongruppen an die basischen Gruppen im Kollagenmolekül bindet und durch die parallele Anheftung entlang der Längsachse die natürliche Doppelbrechung der kollagenen Bindegewebsfasern verstärkt. Dies macht die Sirius-Red-Färbung zu einem einfachen und gleichzeitig spezifischen und sensitiven Verfahren. Lichtmikroskopisch stellen sich die Kollagenfasern rot, die Muskelfasern und das Zytoplasma gelb dar. Unter Verwendung der Polarisationsmikroskopie ist die Auflösung erhöht, sodass auch sehr dünne Kollagenfibrillen detektiert werden können. Dies steigert die Empfindlichkeit und Aussagekraft des Verfahrens [Junqueira et al. 1979]. Alternativ können Trichrom-Färbungen wie Mallory, Masson oder van Giesen verwendet werden. Allerdings ist mit diesen Methoden die Färbung feiner Kollagenfasern erschwert. Zudem zeigen sie häufig variable Färbeergebnisse und sind im Vergleich zu Sirius-Red weniger spezifisch [Whittaker et al. 1994; Huang et al. 2013].

In der vorliegenden Studie diente die Sirius-Red-Färbung dem histologischen Nachweis der interstitiellen Fibrose im Skelettmuskel nach Orchiektomie und Laufbandtraining. Diese Färbemethode wurde gewählt, da sie eine gute Darstellung und Abgrenzung der einzelnen Kollagenfasern vom Muskelgewebe ermöglicht und damit eine genaue Aussage bezüglich der Kollagendeposition zulässt.

5.2.4.2 Muskelzellproliferation

Unter Zellproliferation versteht man den Prozess der Gewebevermehrung, der durch Zellteilung und -wachstum geprägt ist und im Zellzyklus initiiert wird. Innerhalb des Zellzyklus durchläuft die Zelle mehrere Abschnitte. Während der G1-Phase wächst die Zelle und synthetisiert Proteine und RNA. In der S-Phase findet die Replikation der DNA mit der Verdoppelung des genetischen Materials statt. Dem schließt sich die G2-Phase an, in der sich die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet, die dann in der M-Phase (Mitose) stattfindet. Neu gebildete Zellen können nach der Mitose den Zellzyklus verlassen und in der G0-Phase (Ruhephase) verweilen [Urrego et al. 2014]. Die Dauer des Zellzyklus ist je nach Gewebe unterschiedlich und beträgt zwischen einer und mehreren Stunden.

Zur Untersuchung und Auswertung der Zellproliferation stehen verschiedene immunhistochemische und molekularbiologische Verfahren zur Verfügung. Eine Methode, die häufig zur Anwendung kommt, ist der Nachweis von Proteinen wie PCNA (proliferating cell nuclear antigen), welches während des Zellzyklus im Zellkern von proliferierenden Zellen exprimiert wird. PCNA ist ein Hilfsprotein der DNA-Polymerase-Delta und unterstützt den Prozess der DNA-Strangsynthese während der Replikation [Dieckman et al. 2012]. Es ist ein Homotrimer, welcher in gelöster oder gebundener Form vorliegen kann und einen zyklischen Konzentrationsverlauf aufweist [Naryzhny 2008]. Während der G1-Phase kommt es zum Anstieg mit einer maximalen Expression in der S-Phase und einem Konzentrationsabfall während der G2- und M-Phase [Kurki et al. 1988]. Allerdings ist nur ein geringer Anteil an der DNA-Replikation beteiligt [Bravo und Macdonald-Bravo 1987], sodass die PCNA-Konzentration während der S-Phase nur um das 2 - 3 fache ansteigt [Morris und Mathews 1989]. Trotz der zyklischen Synthese bleibt die PCNA-Konzentration dadurch über den gesamten Zellzyklus gesehen relativ konstant [Morris und Mathews 1989]. Die Halbwertszeit von PCNA beträgt etwa 20 Stunden, sodass es auch von Zellen exprimiert wird, die den Zellzyklus bereits wieder verlassen haben [Yu et al. 1992]. Der Nachweis von PCNA kann mittels monoklonalen Antikörpern wie Anti-PCNA PC10 erfolgen, die an die PCNA-Proteine binden, diese markieren und so das Ausmaß der Zellproliferation messbar machen [Bacchi und Gown 1993]. Die Detektion der immunhistochemisch markierten Zellen durch Antikörper kann sowohl in Zellkulturen mittels Durchflusszytometrie als auch in fixierten Geweben mit Lichtmikroskopie durchgeführt werden [Kurki et al. 1988].

Das Protein Ki-67 ist ein weiterer Proliferationsmarker, der in allen Zellzyklusphasen bis auf die G0-Phase exprimiert wird und mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 nachgewiesen werden kann [Scholzen und Gerdes 2000]. Nachteil

dieses Verfahrens ist, dass der Anteil der proliferierenden Zellen oftmals überschätzt wird [Scott et al. 1991] und Ki-67 eine deutlich kürzere Halbwertszeit als PCNA besitzt [Yu und Filipe 1993]. Ein weiteres Verfahren zur Beurteilung der Zellproliferation stellt der Nachweis von BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) da. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Allerdings muss es, im Gegensatz zu PCNA und Ki-67, zuvor *in-vivo* appliziert werden [Yu et al. 1992]. Die Verwendung von PCNA-Antikörpern bietet demgegenüber die Möglichkeit, auch bereits in Paraffin eingebettetes und fixiertes Gewebe zu analysieren, sodass damit auch retrospektive Studien durchführbar sind [Yu und Filipe 1993]. In der vorliegenden Studie wurden die proliferierenden Muskelzellen mittels PCNA-Antikörper markiert und lichtmikroskopisch identifiziert.

5.2.4.3 Muskelzellapoptose

Die Apoptose beschreibt den Vorgang des programmierten Zelltodes, der durch intrinsische und extrinsische Stoffwechselwege initiiert werden kann und über die Aktivierung von proteolytischen Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen) zu einem strukturierten Abbau der Zelle führt. Hierbei kommt es unter Erhalt der Zellmembran zur Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, Fragmentation des Zellkerns und Bildung von apoptotischen Körperchen. Diese morphologischen Zellveränderungen lassen sich licht- und elektronenmikroskopisch darstellen [Huerta et al. 2007; Zeng et al. 2015].

Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen können Proteinen der Signaltransduktionskaskade wie z.B. Cytochrom C, Caspase-3 oder Bcl-2 und Bcl-xL in apoptotischen Zellen sichtbar gemacht werden. Hierbei kommen verschiedene morphologische und biochemische Marker zum Einsatz [Huerta et al. 2007; Cen et al. 2008; Fox und Aubert 2008]. Der Nachweis apoptotischer Zellen kann in Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie oder in fixiertem Gewebe mikroskopisch erfolgen.

Die intravitale Mikroskopie bietet die Möglichkeit apoptotische Veränderungen am lebenden Tier darzustellen. Nach systemischer Applikation binden kernfärbende Substanzen wie Bisbenzimid an adenin- und thymidinreiche DNA-Regionen und machen morphologische Kernveränderungen *in-vivo* sichtbar [Gradl et al. 2004]. Mit Annexin V gelingt die intravitale Detektion von Zellen im frühen Apoptosestadium. Es bindet in

Gegenwart von Kalzium an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das in apoptotischen Zellen an der äußeren Plasmamembran exprimiert wird. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass Annexin vor der Untersuchung in hoher Konzentration systemisch appliziert werden muss [Watanabe et al. 2002; Zeng et al. 2015].

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch Porenbildung in der Mitochondrienmembran gehört zu den frühesten Veränderungen im apoptotischen Prozess und lässt sich mit lipophilen kationischen Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. TMRE, TMRM oder JC-1 nachweisen. Durch das verringerte mitochondriale Membranpotential kommt es zu Verschiebungen im Emissions-Spektrum, welche mittels Durchflusszytometer gemessen werden können [Christensen et al. 2013]. Zwar ist die Sensitivität dieses Verfahrens für frühe apoptotische Ereignisse gut [Wlodkowic et al. 2011], allerdings werden auch nekrotische Zellen detektiert und es kommt zu falsch positiven Ergebnissen.

Der Nachweis apoptotischer Zellen durch Detektion der DNA-Fragmentation mittels TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ist eines der am häufigsten verwendeten Verfahren [Watanabe et al. 2002; Huerta et al. 2007]. Hierbei bindet das Enzym TdT (terminale Desoxynucleotidyl-Transferase) an die endständigen Hydroxygruppen (3'OH-Gruppen) von fragmentierten Einzel- oder Doppelstrang-DNA-Stücken und fügt an diese immunhistochemisch markierte Nukleotide an. Diese können später mittels Durchflusszytometrie oder Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden [Huerta et al. 2007; Zeng et al. 2015]. Nachteil dieser Methode ist die niedrige Spezifität, sodass auch nekrotische Zellen detektiert werden und falsch positive Ergebnisse entstehen [Watanabe et al. 2002; Jakob et al. 2008]. Da es sich um eine Einzelpunktmessung handelt, können zudem keine Aussagen über den zeitlichen Verlauf und die Dynamik der Apoptose getroffen werden [Huerta et al. 2007]. Trotz dieser Einschränkungen wird die TUNEL-Methode häufig angewendet, da es sich um ein sensitives Verfahren handelt [Galluzzi et al. 2009] und die Detektion apoptotischer Zellen sowohl in Zellkulturen als auch an fixierten Geweben durchgeführt werden kann. Zudem kann durch quantitative Bestimmung der TUNEL-positiven Zellen der Apoptose-Index angegeben werden [Huerta et al. 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde die TUNEL-Färbung angewendet, da es sich um eine einfache und zugleich häufig erprobte Methode handelt, um die Apoptoserate und damit das Ausmaß der Gewebeschädigung im peripheren Skelettmuskel zu bestimmen. Die gute farbliche Darstellung der apoptotischen Zellen ermöglicht eine genaue Aussage bezüglich der Apoptoserate nach Orchiektomie und Laufbandtraining.

Bei der ISEL-Technik (in-situ-end-labeling) erfolgt der Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels einer DNA-Polymerase [Ansari et al. 1993; Wijsman et al. 1993]. Allerdings erfasst diese, im Gegensatz zur terminalen Transferase der TUNEL-Technik, nur Einzelstrangbrüche und ist dadurch weniger sensitiv. Die langsamere Enzym-Kinetik macht dieses Verfahren zudem sehr zeitintensiv [Huerta et al. 2007; Archana et al. 2013]. Weitere Methoden zur Detektion von DNA-Fragmenten stellen die ELISA-Analyse und der Einsatz von monoklonalen Antikörpern dar.

In klinischen Studien werden häufig molekulare bildgebende Verfahren angewendet, die es ermöglichen apoptotische Vorgänge *in-vivo* makroskopisch sichtbar zu machen. Hierfür kommen Techniken wie die SPECT (Single-Photon-Emissions-Computertomographie), MRT (Magnetresonanztomographie) oder PET (Positronen-Emissions-Tomographie) in Kombination mit radioaktiv markierten Molekülen zur Anwendung [Zeng et al. 2015].

5.2.5 Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht

Zum Nachweis eines durch Orchiektomie oder Laufbandtraining entstandenen Muskelödems wurde die Ratio aus Trocken- und Feuchtgewicht des M. soleus bestimmt. Diese Methodik lässt Rückschlüsse auf den Proteingehalt und die Wasserkapazität des Muskels zu und kommt in mehreren Studien zur Beurteilung von Muskelödemem nach traumatischen Muskelverletzungen zur Anwendung [Schaser et al. 2006; Bansch et al. 2010; Gierer et al. 2010].

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Muskuläre Veränderungen nach Orchiektomie

In der vorliegenden Arbeit konnten Veränderungen im Sinne einer Sarkopenie nach Orchiektomie nachgewiesen werden. Diese betrafen sowohl den anatomischen Aufbau als auch die biomechanische Funktionalität des peripheren Skelettmuskels.

Zwölf Wochen nach Orchiektomie konnte eine Abnahme der tetanischen Kontraktionskraft des M. soleus gemessen werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit ähnlichen Studien, in denen es sowohl bei *in-vivo* als auch *in-vitro*-Messungen bereits vier Wochen nach Orchiektomie zur Abnahme der Kontraktionskraft in M. soleus und M. extensor digitorum longus kam [Brown et al. 2001; Axell et al. 2006; Naeyer et al. 2014]. In Versuchen mit Mäusen führte die Kastration nach vier Wochen auch zur Abnahmen der Kontraktionskraft in der Muskulatur der Vorderläufe [White et al. 2013]. Studien an weiblichen Ratten zeigten ebenfalls eine Abnahme der Muskelkontraktionskraft nach Ovariektomie. Allerdings wiesen die Ergebnisse eine Heterogenität auf, da abhängig vom untersuchten Muskel teilweise auch größere Kontraktionskräfte als in sham-ovariektomierten Tieren gemessen wurden [Fisher et al. 1998].

Bei der Kurzkontraktion werden vor allem schnell kontrahierende Muskelfasern angespannt. Der in der vorliegenden Studie untersuchte M. soleus ist allerdings ein langsam kontrahierender Muskel, mit einem geringen Anteil an schnell kontrahierenden Muskelfasern [Axell et al. 2006]. Dies zeigte sich auch in der Muskelkraftmessung. So führte die Orchiektomie in der vorliegenden Arbeit zu keiner signifikanten Veränderung in der Kraftentwicklung bei der Kurzkontraktion.

Mit Bestimmung der Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie wurden die Muskelfasertypen des Muskels funktionell ermittelt. Die Ratio spiegelt dabei das Verhältnis der langsam und schnell kontrahierenden Muskelfasern des Skelettmuskels wider. Während bei der tetanische Muskelkontraktion vor allem langsam kontrahierende Muskelfasern aktiv sind, kontrahieren bei der Kurzkontraktion vermehrt schnelle Muskelfasern. Demnach ist die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie umso höher, je mehr schnell kontrahierende Muskelfasern vorhanden sind.

Die Skelettmuskulatur besitzt eine hohe Plastizität und Dynamik, die es dem Muskel ermöglicht seine strukturellen und funktionellen Eigenschaften sowie sein phänotypisches Profil an veränderte Bedingungen und Funktionsanforderungen anzupassen [Pette und Staron 2000 und 2001; Blaauw et al. 2013]. Veränderungen in

der neuromuskulären Aktivität, im Hormonstatus oder der mechanische Beanspruchung können zur Umwandlung der Muskelfasern von langsamen zu schnellen Fasern oder anders herum führen [Pette und Staron 2000]. So zeigen tierexperimentelle Studien, dass die Testosteronsubstitution zu einer Umstrukturierung der Muskelfasern in der Kaumuskulatur (M. masseter) mit Umwandlung langsamer in schnelle Muskelfasern führt [English und Schwartz 2002], wohingegen es bei Testosteronmangel zur Transformation schneller in langsame Muskelfasern kommt [Eason et al. 2000]. Kadi und Kollegen kommen bei Versuchen an ovariectomierten weiblichen Ratten zu ähnlichen Ergebnissen. Hier führt die Ovariectomie zu einem Wechsel von schnellen zu langsamen Muskelfasern sowohl im M. soleus als auch im M. extensor digitorum longus [Kadi et al. 2002]. Es ist daher anzunehmen, dass es auch durch Orchiektomie im M. soleus der männlichen Ratte zu Muskelatrophie und sarkopenen Veränderungen im Muskelaufbau mit einem Wechsel von schnellen zu langsamen Muskelfasern kommt.

Diese Annahme wurde durch die vorliegende Studie jedoch nicht bestätigt. Weder in den sham-orchiektomierten, noch in den orchiektomierten Tieren zeigten sich Unterschiede. Die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie war in den einzelnen Versuchsgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten gleich. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass der M. soleus insgesamt ein langsam kontrahierender Muskel ist [Axell et al. 2006] und der Anteil schneller Fasern, die sich einer Transformation unterziehen können gering ist.

Mit Berechnung der Kontraktionskraft-Ratio wurde die Kontraktionsfähigkeit der Muskelfasern ermittelt und auf diese Weise der Anteil verschiedener Muskelfasertypen funktionell bestimmt. Das Verteilungsverhältnis der Muskelfasertypen kann damit aber nur indirekt und eingeschränkt beurteilt werden. Zur Identifizierung der einzelnen Muskelfasern-Isotypen und Berechnung der genauen Verteilungsverhältnisse sind immunhistochemische Verfahren sensitiver und deshalb zu bevorzugen.

Durch die Orchiektomie kommt es zum Ausfall der testikulären Testosteronsynthese und daraus folgender Reduktion des Serum-Testosteronspiegels. Folglich kommt es auch zu einem Rückgang der Testosteronrezeptor-Expression am Muskel. Die Variabilität der Androgenrezeptordichte bedingt ein unterschiedlich starkes Ansprechen der verschiedenen Muskelgruppen auf die Androgendeprivation der Orchiektomie. So ist die Reduktion der Rezeptordichte im testosteronsensiblen M. levator ani und M. bulbocavernosus höher als in der Skelettmuskulatur [Antonio et al. 1999; Naeyer et al. 2014]. Allerdings lässt sich auch in der Skelettmuskulatur von Mäusen vier Wochen nach Orchiektomie ein deutlicher Rückgang der

Androgenrezeptor-Expression nachweisen [White et al. 2013]. Dies bekräftigt die Auffassung, dass die muskulären Veränderungen der Orchiektomie auch durch einen Rückgang der Androgenrezeptor-Expression ausgelöst werden können.

Die allgemeine Annahme, dass es durch Orchiektomie zum Verlust der Muskelmasse und daraus resultierend zur Reduktion der Muskelkraft kommt, konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. So führte die Orchiektomie im vorliegenden Fall zwar zu einer Abnahme der tetanischen Muskelkontraktionskraft, allerdings nicht in Zusammenhang mit Veränderungen der Muskelmasse. Sowohl der Anteil der Muskelgewebefraktion, als auch die Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht blieben nach Orchiektomie stabil. Ein quantitativer Verlust von Muskelgewebe war somit nicht gegeben. In Anbetracht dieser Ergebnisse, ist davon auszugehen, dass die Orchiektomie einen stärkeren Einfluss auf die funktionelle Muskelfunktion, als auf den strukturellen Muskelaufbau hat. Diese Annahme bestätigen auch andere Studien, in denen es nach Orchiektomie ebenfalls zu einer Abnahme der Muskelkraft bei gleichbleibender Muskelmasse kam [Brown et al. 2001]. Allerdings ist die Datenlage nicht eindeutig, da es auch Studien gibt, in denen es sowohl zur Abnahme der Muskelmasse, als auch der Muskelkraft kam [Axell et al. 2006; White et al. 2013; Naeyer et al. 2014].

Zwar kam es durch die Orchiektomie in der vorliegenden Studie zu keinem quantitativen Verlust von Muskelgewebe, allerdings zeigten sich bereits vier Wochen postoperativ Veränderungen im anatomischen Aufbau des Skelettmuskels in Form reduzierter Muskelfaserdiameter. Die Differenzierung der einzelnen Muskelfasertypen wurde in der hier vorgestellten Studie nicht vorgenommen. Vergleichbare tierexperimentelle Arbeiten zeigen aber, dass es durch den Testosteronmangel zur Reduktion des Muskelfaserdiameters in den Muskelfasern kommt. Sowohl im langsamen Typ I, als auch im schnellen Typ IIa [Borst et al. 2007; Oner et al. 2008; White et al. 2013]. Somit lassen sich die sarkopenen Auswirkungen der Orchiektomie zwar auf intramuskulärer Ebene im Aufbau der einzelnen Muskelfasern nachweisen, der Einfluss auf die Gesamtmuskelmasse zeigte sich aber in der vorliegenden Studie nicht in dieser Deutlichkeit.

Es ist bekannt, dass Androgene das Wachstum der Skelettmuskelzellen fördern und zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren wie IGF-1 oder GH proliferative Vorgänge im Muskelgewebe stimulieren [Rooy et al. 2016]. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Substitution von Testosteron zu einer Zunahme der Satellitenzellen sowohl bei Menschen, als auch im Tiermodell führt [Sinha-Hikim et al.

2003 und 2006; Kadi 2008; Serra et al. 2013]. Daher ist davon auszugehen, dass es durch den Testosteronmangel der Orchiektomie zu einer verminderten Zellproliferation kommt.

Diese Annahme konnte in vorliegender Studie nicht bestätigt werden. Bei den orchiectomierten Tieren zeigte sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Abnahme der PCNA-positiven proliferierenden Zellen. Dies könnte darin begründet liegen, dass sich ein Rückgang der Zellproliferation generell eher in schnellen Muskelfasern und weniger in langsamen Muskeln, wie dem M. soleus zeigt [Gibson und Schultz 1983; Shefer et al. 2006].

Als Zeichen eines verstärkten Zelluntergangs konnte in der vorliegenden Studie bei den orchiectomierten Tieren eine hohe Rate an apoptotischen TUNEL-positiven Muskelzellen verzeichnet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Orchiektomie zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen proliferativen und degenerativen Prozessen führt und der Testosteronmangel einen verstärkten Zellabbau fördert.

In der Literatur werden durch Androgendeprivationstherapie oder Orchiektomie induzierte Umbauvorgänge mit Einwanderung von Fett- und Bindegewebszellen in die Muskulatur beschrieben [Chang et al. 2014; Cheung et al. 2014]. Dabei steigt die Kollagenproduktion der muskulären Fibroblasten an. In der vorliegenden Studie konnte bei den orchiectomierten Tieren keine erhöhte Kollagendeposition im Sinne einer interstitiellen Fibrose im Skelettmuskel festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich gegenüber den sham-orchiectomierten Kontrolltieren eine dezente, wenn auch nicht statistisch relevante Reduktion des muskulären Kollagenanteils. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Fonseca und Kollegen wider, bei denen die Ovariektomie in weiblichen Wistar-Ratten ebenfalls keinen Einfluss auf den intramuskulären Kollagenanteil des M. soleus hat [Fonseca et al. 2012]. Allerdings zeigt eine andere Studie auch eine Zunahme der Bindegewebsbildung im medialen M. gastrocnemius nach Ovariektomie [Braggion et al. 2016].

5.3.2 Muskuläre Veränderungen nach Laufbandtraining

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der unterschiedlichen Trainingsmodalitäten uphill-, level- und downhill-Laufen auf den Skelettmuskel in orchiectomierten Ratten untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob die unterschiedlichen Trainingsarten mit ihren verschiedenen Muskelkontraktionsformen

bzw. mechanischen Beanspruchungsmustern einen jeweils anderen regenerativen Effekt auf den M. soleus im Rattenmodell ausüben. Nach Zusammenschau der Literatur gibt es bislang keine Studien, die den regenerativen Effekt der drei Laufmodalitäten auf den Skelettmuskel im andropausalen Organismus verglichen haben und zeigen, welche Trainingsform am effizientesten ist, um die Muskelkraft und Muskelmasse im sarkopenen Skelettmuskel zu erhöhen.

Die vorgestellte Studie zeigte eine Zunahme der tetanischen Muskelkontraktionskraft bei orchiektomierten Ratten nach Laufbandtraining in allen drei Trainingsformen. Dabei konnte die durch Orchiektomie induzierte Kraftreduktion kompensiert werden. Durch das uphill- und downhill-Laufen konnte die Muskelkontraktionskraft zudem über den Referenzwert der sham-orchiektomierten Kontrollgruppe angehoben werden. Auch in Studien mit ovariektomierten Ratten kam es zur Zunahme der Muskelkontraktionskraft des M. soleus nach Laufbandtraining [Widrick et al. 2007]. Versuche mit eugonadalen Ratten und Mäusen, in denen der Effekt von Laufbandtraining auf die Kontraktionskraft von peripheren Skelettmuskeln untersucht wurde, zeigen allerdings widersprüchliche Ergebnisse. In der Arbeit von Furrer und Kollegen führte ein Intervalltraining mit uphill-Laufen zur Zunahme der Muskelkontraktionskraft im M. gastrocnemius [Furrer et al. 2013], ebenso kam es in der Arbeit von Call und Kollegen zur Zunahme der tetanischen Kontraktionskraft des M. soleus nach Laufrad-Training bei Mäusen [Call et al. 2010]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen, die keine Veränderungen der Muskelkraft durch Lauftraining aufweisen können [Lubek 1984; Lynch et al. 1997; Vrabas et al. 1999; Plant et al. 2003]. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann durch Unterschiede im Alter und Stamm der Versuchstiere sowie in der Art und Dauer des Trainings begründet sein. Ebenso spielt die Auswahl des analysierten Muskels sowie die Durchführung der Muskelkraftmessung eine Rolle und muss bei der Interpretation und Bewertung der Studienergebnisse beachtet werden. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit bei orchiektomierten Tieren durch Laufbandtraining eine Zunahme der tetanischen Muskelkontraktionskraft erreicht werden konnte, spricht dafür, dass der andropausale Organismus sensibel auf eine erhöhte Muskelaktivität reagiert. So werden sowohl die konzentrischen Kontraktionskräfte beim uphill-Laufen, als auch die exzentrischen Kontraktionskräfte beim downhill-Laufen reaktiv verstärkt.

Wie bereits erwähnt, besitzt die Skelettmuskulatur die Eigenschaft sich an veränderte Bedingungen und Funktionsanforderungen anzupassen. Sportliches Training stellt dabei eine hohe mechanische Beanspruchung für den Muskel dar, auf

welche dieser mit einem Wechsel der Muskelfasern von schnellen zu langsamen reagieren kann. Als Ursache dieser Transformation wird eine erhöhte neuromuskuläre Aktivität diskutiert, die zu Veränderungen in der Genexpression der Muskelfasern und folglich zum Wechsel des Muskelfaser-Phänotyps führt [Pette 1998 und 2001]. Die genauen Regulationsmechanismen sind aber bislang nicht bekannt [Wilson et al. 2012]. Nach einem mehrwöchigen Laufbandtraining bei männlichen Wistar-Ratten zeigte sich unter anderem eine Zunahme der langsamen Muskelfasern im M. plantaris [Sugiura et al. 1992] und M. vastus lateralis [Wada et al. 2003] bei gleichzeitiger Reduktion der schnellen Muskelfasern.

In der vorliegenden Studie konnte dagegen kein Einfluss des Laufbandtrainings auf die Ratio der schnell und langsam kontrahierenden Muskelfasern nachgewiesen werden. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich beim untersuchten M. soleus um einen insgesamt langsam kontrahierenden Muskel handelt und der Anteil schneller Muskelfasern, die sich einer Transformation unterziehen können, gering ist. Einen weiteren Hinweis für diese Annahme gibt die Studie von Luginbuhl und Kollegen, bei der es zwar im M. plantaris und M. vastus lateralis von Sprague-Dawley-Ratten, nicht aber im M. soleus zu Veränderungen der Muskelfasertypen nach Laufbandtraining kam [Luginbuhl et al. 1984]. Eine Studie mit Mäusen zeigt aber auch im M. soleus eine Fasertransformation mit Zunahme von langsamen Muskelfasern nach Laufbandtraining [Krüger et al. 2013]. Allerdings erfolgte die Messung der Ratio hierbei mit immunhistochemischen Verfahren und nicht wie in der vorgestellten Arbeit mittels Muskelkraftmessung. Die Differenz der Ergebnisse kann somit auch durch die Anwendung unterschiedlicher Messverfahren bedingt sein.

Es ist allgemein bekannt, dass körperliche Aktivität grundsätzlich einen positiven Effekt auf das muskuloskeletale System hat und ein regelmäßiges physisches Training zur Regeneration des Skelettmuskels beiträgt. Sowohl in eugonadalen, als auch in ovariektomierten Ratten und Mäusen lässt sich eine Zunahme des Muskelfaserdiameters nach Laufbandtraining in verschiedenen Skelettmuskeln feststellen [Allen et al. 2001; Diaz-Herrera et al. 2001; Zancanaro et al. 2007; Fonseca et al. 2012; Krüger et al. 2013].

In der vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass das Laufbandtraining in allen drei Modalitäten zu einer Zunahme des Muskelfaserdiameters bei orchiektomierten Ratten führt. Dabei zeigte sich beim Laufen im downhill-Modus der größte Effekt. Hier konnte die durch Orchiektomie bedingte Abnahme des Muskelfaserdiameters vollständig kompensiert und die Messwerte über das Maß der sham-orchiektomierten Kontrolltiere

angehoben werden. Downhill-Laufen stellt somit gegenüber den anderen Laufmodalitäten einen Vorteil hinsichtlich der Regenerationskapazität der Muskelfasern dar. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der Arbeit von Lynch und Kollegen, bei denen es nach zweiwöchigem downhill-Laufbandtraining ebenfalls zur Zunahme des Muskelfaserdiameters im M. soleus kam [Lynch et al. 1997].

Zwar konnte in der vorgestellten Arbeit durch das Laufbandtraining eine Zunahme des Muskelfaserdiameters erreicht werden, allerdings ohne Veränderungen der Muskelgesamtmasse. Der Anteil der Muskelgewebefraktion und das Verhältnis von Trocken- zu Feuchtgewicht zeigten nach dem Laufbandtraining keine Unterschiede gegenüber den ruhenden orchiectomierten Tieren der Kontrollgruppe. Eine quantitative Zunahme des Muskelgewebes war nicht gegeben. Somit ist davon auszugehen, dass das Laufbandtraining tendenziell einen stärkeren Einfluss auf die funktionelle Muskelfunktion als auf den strukturellen Muskelaufbau hat.

Die verminderte Regenerationsfähigkeit und der Verlust proliferierender Muskelzellen ist ein Prozess des alternden Muskels und stellt einen wichtigen Faktor in der Pathogenese der Sarkopenie dar. Körperliche Aktivität kann dem entgegenwirken, indem es die Regenerationseigenschaften der Muskulatur fördert und zu einer verstärkten Zellproliferation führt. Laufbandtraining wird dabei ein hohes myogenes Potential zugesprochen, was auch in vielen Studien nachgewiesen werden konnte. Die genauen intrazellulären Mechanismen sind dabei noch nicht genau bekannt [Kurosaka et al. 2012]. In einer Studie von Fujimaki und Kollegen konnte gezeigt werden, dass durch Lauftraining bei Mäusen Signaltransduktionswege wie der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert werden. Die verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren wie Wnt 3 und Wnt 5 führt dazu, dass Satellitenzellen, die sich im Ruhezustand befinden, reaktiviert werden und in einen aktiven Zustand übergehen [Fujimaki et al. 2014].

In Versuchen mit jungen und alten Ratten und Mäusen zeigte sich, dass mehrwöchiges Laufen in der Horizontalen mit langsamer Geschwindigkeiten (8 bzw. 11 m/min für 20 bzw. 30 Minuten) zur Zunahme der Satellitenzellen im Skelettmuskel führt, unabhängig vom Alter der Versuchstiere und dem untersuchten Muskel [Shefer et al. 2010 und 2013]. Dieser Effekt lässt sich auch durch ein einmaliges 90-minütiges downhill-Laufen bei moderater Laufgeschwindigkeit (17 m/min) erreichen [Tiidus et al. 2005; Enns und Tiidus 2008]. Auch die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen demonstrieren eine verstärkte Zellproliferation unter dem Einfluss von Laufbandtraining im Sinne einer signifikanten Zunahme der PCNA-positiven proliferierenden Zellen. Hierbei ließ sich erkennen, dass das uphill-Laufen mit

seiner konzentrischen Muskelkontraktion einen deutlich stärkeren Proliferationsreiz als die Laufmodalitäten downhill und level auf das Muskelgewebe ausübt. Kurosaka und Kollegen untersuchten die Auswirkung von Laufbandtraining mit unterschiedlicher Intensität und Dauer auf die Satellitenzellzahl im Skelettmuskel. Sie konnten nachweisen, dass die Intensität des Trainings einen größeren Einfluss als die Trainingsdauer auf die Zellproliferation hat [Kurosaka et al. 2012]. Dies spricht dafür, dass die einzelnen Laufmodalitäten in der vorliegenden Studie eine unterschiedliche Belastungsintensität für den Muskel dargestellt haben und das Proliferationspotential beim Intervalltraining mit uphill-Laufen am höchsten war.

In einigen Studien wurde beschrieben, dass die exzentrische Muskelkontraktion beim downhill-Laufen zur Destruktion der Muskelfasern mit strukturellen Veränderungen und Anstieg von Entzündungsmediatoren führt [Armstrong et al. 1983; Tsivitse et al. 2003; Touchberry et al. 2012; Lomonosova et al. 2014] und dadurch der regenerative Effekt des Lauftrainings vermindert wird. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich hier, dass Laufbandtraining in allen Laufmodalitäten die durch Orchiektomie induzierte Muskelzellapoptose reduzieren kann. Bei den Tieren der downhill-Gruppe konnte dabei die größte Abnahme der TUNEL-positiven Zellen gegenüber den orchiektomierten ruhenden Tieren ausgemacht werden. Diese Diskrepanz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die proapoptischen Parameter in den genannten Studien bereits nach einem einmaligen Laufen bestimmt wurden, wohingegen das Laufprogramm der hier vorgestellten Studie über einen deutlich längeren Zeitraum von insgesamt 12 Wochen ging. Dies könnte darauf schließen lassen, dass es durch die andauernde Belastung des mehrwöchigen Laufbandtrainings zu einer Adaptation des Muskels an die Belastung mit nachfolgender verstärkter Satellitenzellproliferation und gleichzeitig verminderter Zellapoptose kam. Zudem zeigen auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen nach mehrwöchigem Laufbandtraining keine oder im Vergleich zu ruhenden Tieren verminderte apoptotische Veränderungen im Skelettmuskel [Siu et al. 2004; Zancanaro et al. 2007; Marzetti et al. 2008; Tsalouhidou et al. 2009; Fonseca et al. 2012; McMillan et al. 2012]. Des Weiteren konnten Song und Kollegen nachweisen, dass es durch mehrwöchiges Laufbandtraining zur Abnahme der Muskelzellapoptose in älteren eugonadalen Ratten kommt, indem Signalwege mit proapoptischen Proteinen wie Bcl-2 gehemmt werden [Song et al. 2006]. In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse legen die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit somit nahe, dass Laufbandtraining dazu geeignet ist, die durch Andropause entstandene Muskeldegeneration aufzuhalten.

Die nur geringe Abnahme der apoptotischen Zellen der uphill-Gruppe gegenüber der 12-Wo-ORX-Gruppe in Verbindung mit der deutlichen Zunahme der Zellproliferation nach uphill-Training deutet auf ein erhöhtes zelluläres Turnover hin. Dies kann als Zeichen der Muskelregeneration gewertet werden, wie man es beispielsweise auch nach einem Muskeltrauma nachweisen kann und dient der Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im Muskel [Stratos et al. 2007 und 2010].

Fonseca und Kollegen konnten zeigen, dass es durch körperliche Aktivität zu intramuskulären strukturellen Veränderungen mit Abnahme des fibrotischen Gewebeanteils kommt. Ein mehrwöchiges Laufen im Laufrad senkte den intramuskulären Kollagenanteil in ovariectomierten Ratten [Fonseca et al. 2012]. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hier zeigten sich durch Laufbandtraining in der Horizontalen, was dem Laufrad-Training gleichzusetzten ist, ebenfalls geringere Kollagenwerte. Allerdings wurde durch das downhill-Laufen eine Zunahme des Kollagenanteils erzielt. Ähnliche Ergebnisse liefern weitere Studien, in denen es bei weiblichen Wistar-Ratten nach einem einmaligen Intervalltraining im downhill-Modus zu einem Anstieg des intramuskulären Kollagenanteils kam, was sich unter anderem in einer erhöhten Genexpression verschiedener Kollagenfasern zeigte [Han et al. 1999; Koskinen et al. 2001; Kato et al. 2016]. Dies könnte darin begründet liegen, dass das downhill-Laufen im Vergleich zu den anderen Laufmodalitäten eine größere mechanische Belastung für den Muskel darstellt und dieser reaktiv die Kollagensynthese verstärkt.

Interessanterweise führte der erhöhte intramuskuläre Kollagenanteil in der vorliegenden Studie aber zu keiner Einbuße der biomechanischen Funktionalität des Muskels. Vielmehr konnte durch das downhill-Laufen eine größere Kraftentwicklung und höhere tetanischen Kontraktionswerte als durch das level-Laufen erreicht werden.

5.3.3 Klinische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit konnte der therapeutische Effekt von uphill-, level- und downhill-Laufen auf den sarkopen veränderten Muskel im Tiermodell gezeigt werden. Mehrere große Gesundheitssurveys und Studien bestätigen, dass die Inzidenz für Sarkopenie bei Patienten mit erhöhter körperlicher Aktivität geringer ist und die Prävalenz mit dem Grad der körperlichen Aktivität abnimmt [Baumgartner et al. 1998; Szulc et al. 2004; Park et al. 2010; Ryu et al. 2013]. Allerdings gibt es bislang keine

klinische Studie, in der Lauftraining explizit bei Patienten mit Sarkopenie zum Einsatz kommt. Grund dafür könnte die fehlende einheitlich gültige Definition der Erkrankung, sowie unterschiedliche Diagnostikmethoden sein, welche die Einschlusskriterien für klinische Studien erschweren.

In Zusammenhang mit neuromuskulären Krankheiten wie Schlaganfall und inkompletter Querschnittslähmung kommt Laufbandtraining bereits als therapeutische Maßnahme zur Anwendung. Durch mehrwöchiges Laufbandtraining kann bei hemiparetischen Patienten die Muskelkraft und der Muskelfaseranteil in der peripheren Skelettmuskulatur erhöht werden [Stewart et al. 2004; Andersen et al. 2011; Liu et al. 2014].

Weitere klinische Studien konnten bereits erfolgreich Trainingsprotokolle für das Laufband umsetzen und eine Verbesserung der funktionellen Muskeleigenschaften nachweisen. Gault und Kollegen zeigen, dass ein dreimonatiges Laufbandtraining die isometrische Muskelkontraktionskraft bei älteren Männern erhöht. Sie verwendeten hierfür folgendes Laufprotokoll: downhill-Laufen mit individueller Gehgeschwindigkeit bei -10° Neigung, 30 Minuten / Tag, 3 Tage / Woche, 12 Wochen [Gault und Willems 2013]. Zudem wird dadurch die funktionelle Mobilität sowie das Gleichgewicht und die Koordination verbessert [Gault et al. 2012]. Eine Zunahme der Muskelkontraktionskraft zeigte sich bei jungen Frauen bereits nach einem sechswöchigen Training unter ähnlichen Bedingungen (-20° Neigung, 30 Minuten / Tag, 3 Tage / Woche, 1,36 m/s) [Rodio und Fattorini 2014]. Klinische Studien, die intramuskuläre Veränderungen aufzeigen, sind dagegen selten, da hierfür in den meisten Fällen invasive Messungen und Muskelbiopsien notwendig sind. Allerdings zeigen Coggan und Kollegen, dass ein intensives Laufbandtraining über 9 - 12 Monate (45 Minuten / Tag, 4 Tage / Woche) bei älteren Patienten zur vermehrten Kapillarisierung und erhöhten Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) des Muskels führt. Zudem erfolgt eine Muskelfasertransformation von schnellen zu langsamen Muskelfasern und die Zunahme des Muskelfaserdiameters [Coggan et al. 1992]. Des Weiteren konnten Liu und Kollegen mittels nicht invasiver Ultraschalluntersuchung bei Patienten mit subakutem Schlaganfall nach einem dreiwöchigen Laufbandtraining architektonische Veränderungen im Muskelaufbau nachweisen [Liu et al. 2014].

Diese klinischen Studien sind exemplarische Beispiele dafür, dass der tierexperimentelle Ansatz aus der vorliegenden Arbeit durchaus auf den Menschen übertragbar ist und eine hohe Praxisrelevanz besitzt. Somit kann Laufbandtraining einen attraktiven Therapieansatz in der Behandlung der Sarkopenie darstellen und durch

Unterstützung der muskulären Regeneration zur Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustandes sarkopener Patienten beitragen.

5.3.4 Limitation und Ausblick

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersuchte die Pathophysiologie der sarkopenen Veränderungen nach Testosteronmangel im andropausalen Organismus der männlichen Wistar-Ratte sowie den regenerativen Einfluss von körperlicher Aktivität auf den peripheren Skelettmuskel. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf strukturellen und funktionellen Parametern nach Orchiektomie und der Durchführung des Laufbandtrainings in verschiedenen Trainingsmodalitäten. Die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge der Regeneration wurden dabei nicht untersucht.

Weiterhin wurde nur die hintere Extremität anhand des M. soleus untersucht. Da beim quadrupedalen Laufen auch die vordere Extremität beansprucht wird, könnten in weiterführenden Untersuchungen auch Muskeln des Vorderlaufes untersucht werden. Des Weiteren könnten die Adaptations- und Regenerationsfähigkeit verschiedener Muskeltypen, wie z.B. des langsamen M. soleus und des schnellen M. extensor digitorum longus gegenübergestellt werden.

Die jeweilige Maximalgeschwindigkeit der Laufgruppen wurde nur subjektiv anhand des individuellen Laufverhaltens der Tiere festgelegt. In folgenden Arbeiten könnte die Leistungsfähigkeit der Versuchstiere mittels geeigneter Parameter wie z.B. der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) quantifiziert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Laufbandtraining einen positiven Effekt und eine regenerative Wirkung auf den sarkopenen Skelettmuskel besitzt. Als vorteilhaft haben sich hierbei uphill- und downhill-Laufen gezeigt.

6 THESEN

Thema:

Regenerative Eigenschaften von Laufbandtraining auf die Struktur des peripheren Skelettmuskels der orchiektomierten Ratte

- Sarkopenie und deren Folgezustände stellen im Hinblick des demographischen Wandels und der zunehmend älter werdenden Bevölkerung ein wesentliches Problem im Gesundheitswesen dar.
- Aufgrund einer fehlenden einheitlich gültigen Definition ist die Diagnosestellung der Sarkopenie erschwert und die Prävalenz der Erkrankung unterschätzt.
- Neben mangelnder körperlicher Aktivität ist der Abfall des Serum-Testosteronspiegels ein entscheidender Faktor für die Entstehung von Sarkopenie im Rahmen der Andropause.
- Die chirurgische Kastration (Orchiektomie) der männlichen Ratte führt zu einer Deprivation des Serum-Testosteronspiegels unterhalb der Nachweisgrenze und ist das am häufigsten angewendete Verfahren zur Induktion der Andropause bzw. Sarkopenie im Tiermodell.
- Körperliche Aktivität in Form von sportlicher Betätigung ist die wichtigste präventive Maßnahme, um die Entstehung von Sarkopenie zu vermeiden.
- Die Laufmodelle uphill, level und downhill stellen durch die verschiedenen Anteile an konzentrischer und exzentrischer Muskelkontraktion jeweils ein anderes Reizmuster für den Skelettmuskel dar und haben einen positiven Einfluss auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Muskels.

-
- Die Orchiektomie führt 4, 8 und 12 Wochen postoperativ zu einem Abfall des Serum-Testosteronspiegels unterhalb der Nachweisgrenze.
 - Die Reduktion der biomechanischen Eigenschaften des Skelettmuskels nach Orchiektomie drückt sich in einer Abnahme der tetanischen Kontraktionskraft 12 Wochen postoperativ aus. Durch alle drei Laufmodalitäten kann der durch Orchiektomie bedingte Verlust der tetanischen Kontraktionskraft kompensiert werden. Zudem kann durch uphill- und downhill-Laufen die Kontraktionskraft auf das Niveau von sham-orchiektomierten Kontrolltieren wiederhergestellt werden.
 - Die Muskelkraft bei Kurzkontraktion wird weder durch Orchiektomie, noch durch Laufbandtraining beeinflusst. Die Ratio von Kurzkontraktion zu Tetanie zeigt ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen und den Untersuchungszeitpunkten.
 - Durch die Orchiektomie bedingt kommt es 4, 8 und 12 Wochen postoperativ zur Abnahme des Muskelfaserdiameters. Alle drei Trainingsmodalitäten führen zur Zunahme des Muskelfaserdiameters. Mittels downhill-Laufen kann der Muskelfaserdiameter über das Niveau von sham-orchiektomierten Tieren hinaus erhöht werden.
 - Der prozentuale Anteil des Muskelgewebes wird durch die Orchiektomie und das Laufbandtraining nicht beeinflusst.
 - Die Orchiektomie hat keinen Einfluss auf die Kollagenproduktion der muskulären Fibroblasten. Durch level-Training kann der Kollagenanteil des Muskelgewebes reduziert werden. Downhill-Training führt dagegen zu einer verstärkten Kollagenproduktion.
 - Die Muskelzellproliferation wird durch die Orchiektomie nicht beeinflusst. Dagegen stellen uphill- und downhill-Laufen einen Reiz zur Bildung neuer Muskelzellen dar. Uphill-Laufen ist dabei den beiden anderen Laufmodalitäten überlegen.

- Die Orchiektomie führt nach 4, 8 und 12 Wochen zum verstärkten Untergang von Skelettmuskelzellen. Laufbandtraining in den Modalitäten level und downhill kann die durch Orchiektomie bedingte Zellapoptose reduzieren.
- Die Ratio von Trocken- zu Feuchtgewicht des Muskels wird weder durch Orchiektomie noch durch Laufbandtraining beeinflusst.
- Laufbandtraining ist geeignet, den Muskelschwund bei Sarkopenie aufzuhalten und stellt einen attraktiven Behandlungsansatz in der Prävention und Therapie der Sarkopenie dar. Da die verschiedenen Laufmodalitäten die Skelettmuskulatur auf unterschiedliche Weise beeinflussen, ist ein Training, das alle Laufmodalitäten beinhaltet, am effektivsten.

7 LITERATUR

- Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. 2014. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC veterinary research* 10:198.
- Alibhai SMH, Breunis H, Timilshina N, Johnston C, Tomlinson G, Tannock I, Krahn M, Fleshner NE, Warde P, Canning SD, Klotz L, Naglie G. 2010. Impact of androgen-deprivation therapy on physical function and quality of life in men with nonmetastatic prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28:5038–5045.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. 2001. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 90:1900–1908.
- Always SE, Siu PM, Murlasits Z, Butler DC. 2005. Muscle hypertrophy models: applications for research on aging. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 30:591–624.
- Andersen LL, Zeeman P, Jorgensen JR, Bech-Pedersen DT, Sorensen J, Kjaer M, Andersen JL. 2011. Effects of intensive physical rehabilitation on neuromuscular adaptations in adults with poststroke hemiparesis. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* 25:2808–2817.
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. 1993. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *The Journal of pathology* 170:1–8.
- Antonio J, Wilson JD, George FW. 1999. Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 87:2016–2019.
- Archana M, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. 2013. Various methods available for detection of apoptotic cells- a review. *Indian journal of cancer* 50:274–283.
- Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. 1983. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 54:80–93.
- Arnold P, Bautmans I. 2014. The influence of strength training on muscle activation in elderly persons: a systematic review and meta-analysis. *Experimental gerontology* 58:58–68.
- Ashton-Miller JA, He Y, Kadhiresan VA, McCubbrey DA, Faulkner JA. 1992. An apparatus to measure in vivo biomechanical behavior of dorsi- and plantarflexors of mouse ankle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 72:1205–1211.
- Assumpcao CdO, Lima LCR, Oliveira FBD, Greco CC, Denadai BS. 2013. Exercise-induced muscle damage and running economy in humans. *The Scientific World Journal* 2013:189149.

- Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzingler LJ, Zilch H. 2014. *Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Axell, MacLean HE, Plant, Harcourt LJ, Davis JA, Jimenez M, Handelsman DJ, Lynch GS, Zajac JD. 2006. Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 291:E506-16.
- Bacchi CE, Gown AM. 1993. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 26:677–687.
- Ballak SB, Degens H, Haan A de, Jaspers RT. 2014. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: a comparison of muscle aging in men and male rodents. *Ageing research reviews* 14:43–55.
- Bansch P, Lundblad C, Grande P, Bentzer P. 2010. A model for evaluating the effects of blunt skeletal muscle trauma on microvascular permeability and plasma volume in the rat. *Shock* 33:399–404.
- Barbieri E, Agostini D, Polidori E, Potenza L, Guescini M, Lucertini F, Annibalini G, Stocchi L, Santi M de, Stocchi V. 2015. The pleiotropic effect of physical exercise on mitochondrial dynamics in aging skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015:917085.
- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD. 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American journal of epidemiology* 147:755–763.
- Betik AC, Thomas MM, Wright KJ, Riel CD, Hepple RT. 2009. Exercise training from late middle age until senescence does not attenuate the declines in skeletal muscle aerobic function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297:R744-55.
- Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, Montori VM, Gao W, Dalton JT. 2006. Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 2:146–159.
- Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. 2013. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology* 3:1645–1687.
- Bollheimer LC, Buettner R, Pongratz G, Brunner-Ploss R, Hechtl C, Banas M, Singler K, Hamer OW, Stroszczyński C, Sieber CC, Fellner C. 2012. Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology* 13:609–620.
- Borst SE, Conover CF, Carter CS, Gregory CM, Marzetti E, Leeuwenburgh C, Vandeborne K, Wronski TJ. 2007. Anabolic effects of testosterone are preserved during inhibition of 5alpha-reductase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293:E507-14.
- Borst SE, Lee JH, Conover CF. 2005. Inhibition of 5alpha-reductase blocks prostate effects of testosterone without blocking anabolic effects. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288:E222-7.

- Bosaeus I, Wilcox G, Rothenberg E, Strauss BJ. 2014. Skeletal muscle mass in hospitalized elderly patients: comparison of measurements by single-frequency BIA and DXA. *Clinical nutrition* 33:426–431.
- Braggion G., Ornelas E, Carmona SCJ, Edvigis ALN, Aquino RC, Affonso FFL, Maifrino LB. 2016. Morphological and Biochemical Effects on the Skeletal Muscle of Ovariectomized Old Female Rats Submitted to the Intake of Diets with Vegetable or Animal Protein and Resistance Training. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016:9251064.
- Bravo R, Macdonald-Bravo H. 1987. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *The Journal of cell biology* 105:1549–1554.
- Bremner WJ. 2010. Testosterone deficiency and replacement in older men. *The New England journal of medicine* 363:189–191.
- Brotto M, Johnson ML. 2014. Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Current osteoporosis reports* 12:135–141.
- Brown M, Fisher JS, Hasser EM. 2001. Gonadectomy and reduced physical activity: effects on skeletal muscle. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 82:93–97.
- Burton LA, Sumukadas D. 2010. Optimal management of sarcopenia. *Clinical interventions in aging* 5:217–228.
- Call JA, McKeehen JN, Novotny SA, Lowe DA. 2010. Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse. *Muscle & nerve* 42:871–880.
- Cartee GD. 1995. What insights into age-related changes in skeletal muscle are provided by animal models? *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 50 Spec No:137–141.
- Cen H, Mao F, Aronchik I, Fuentes RJ, Firestone GL. 2008. DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:2243–2252.
- Chan JKC. 2014. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International journal of surgical pathology* 22:12–32.
- Chang D, Joseph DJ, Ebert MA, Galvao DA, Taaffe DR, Denham JW, Newton RU, Spry NA. 2014. Effect of androgen deprivation therapy on muscle attenuation in men with prostate cancer. *Journal of medical imaging and radiation oncology* 58:223–228.
- Chawla A, Spinner RJ, Torres LM, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. 2014. Non-invasive isometric force measurement of plantar flexors in rats. *Muscle & nerve* 50:812–821.
- Cheung AS, Zajac JD, Grossmann M. 2014. Muscle and bone effects of androgen deprivation therapy: current and emerging therapies. *Endocrine-related cancer* 21:R371-94.
- Chien M, Huang T, Wu Y. 2008. Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan. *Journal of the American Geriatrics Society* 56:1710–1715.
- Chiu CS, Weber H, Adamski S, Rauch A, Gentile MA, Alves SE, Kath G, Flores O, Wilkinson HA. 2011. Non-invasive muscle contraction assay to study rodent models of sarcopenia. *BMC musculoskeletal disorders* 12:246.

- Christensen ME, Jansen ES, Sanchez W, Waterhouse NJ. 2013. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods* 61:138–145.
- Clarke BL, Khosla S. 2009. Androgens and bone. *Steroids* 74:296–305.
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO. 1992. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 72:1780–1786.
- Corazza AV, Paolillo FR, Groppo FC, Bagnato VS, Caria PHF. 2013. Phototherapy and resistance training prevent sarcopenia in ovariectomized rats. *Lasers in medical science* 28:1467–1474.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel J, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M, Zamboni M. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* 39:412–423.
- Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Schneider SM, Zuniga C, Arai H, Boirie Y, Chen L, Fielding RA, Martin FC, Michel J, Sieber C, Stout JR, Studenski SA, Vellas B, Woo J, Zamboni M, Cederholm T. 2014. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age and ageing* 43:748–759.
- Cutlip RG, Geronilla KB, Baker BA, Kashon ML, Miller GR, Schopper AW. 2004. Impact of muscle length during stretch-shortening contractions on real-time and temporal muscle performance measures in rats in vivo. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 96:507–516.
- Cutlip RG, Stauber WT, Willison RH, McIntosh TA, Means KH. 1997. Dynamometer for rat plantar flexor muscles in vivo. *Medical & biological engineering & computing* 35:540–543.
- Davis ME, Gumucio JP, Sugg KB, Bedi A, Mendias CL. 2013. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 115:884–891.
- Dehghan F, Haerian BS, Muniandy S, Yusof A, Dragoo JL, Salleh N. 2014a. The effect of relaxin on the musculoskeletal system. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 24:e220-9.
- Dehghan F, Muniandy S, Yusof A, Salleh N. 2014b. Sex-steroid regulation of relaxin receptor isoforms (RXFP1 & RXFP2) expression in the patellar tendon and lateral collateral ligament of female WKY rats. *International journal of medical sciences* 11:180–191.
- Dehghan F, Muniandy S, Yusof A, Salleh N. 2014c. Testosterone reduces knee passive range of motion and expression of relaxin receptor isoforms via 5 α -dihydrotestosterone and androgen receptor binding. *International journal of molecular sciences* 15:4619–4634.
- Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL, Perrimon N. 2013. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Disease models & mechanisms* 6:1339–1352.

- Diaz-Herrera P, Garcia-Castellano JM, Torres A, Morcuende JA, Calbet JA, Serrat R. 2001. Effect of high-intensity running in rectus femoris muscle fiber in rats. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 19:229–232.
- Dieckman LM, Freudenthal BD, Washington MT. 2012. PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Sub-cellular biochemistry* 62:281–299.
- Dietz V. 2002. Do human bipeds use quadrupedal coordination? *Trends in neurosciences* 25:462–467.
- Drey M, Krieger B, Sieber CC, Bauer JM, Hettwer S, Bertsch T. 2014. Motoneuron loss is associated with sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association* 15:435–439.
- Drzymala-Celichowska H, Krutki P, Celichowski J. 2010. Summation of motor unit forces in rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* 20:599–607.
- Dutka TL, Verburg E, Larkins N, Hortemo KH, Lunde PK, Sejersted OM, Lamb GD. 2012. ROS-mediated decline in maximum Ca²⁺-activated force in rat skeletal muscle fibers following in vitro and in vivo stimulation. *PLoS one* 7:e35226.
- Duysens, van de Crommert HW. 1998. Neural control of locomotion; The central pattern generator from cats to humans. *Gait & posture* 7:131–141.
- Eason JM, Schwartz GA, Pavlath GK, English AW. 2000. Sexually dimorphic expression of myosin heavy chains in the adult mouse masseter. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 89:251–258.
- Emir L, Dadali M, Sunay M, Erol D, Caydere M, Ustun H. 2008. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: a minimally invasive method. *Urologic oncology* 26:392–396.
- English AW, Schwartz G. 2002. Development of sex differences in the rabbit masseter muscle is not restricted to a critical period. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 92:1214–1222.
- Enns DL, Tiidus PM. 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 104:347–353.
- Esposito A, Campana L, Palmisano A, Cobelli F de, Canu T, Santarella F, Colantoni C, Monno A, Vezzoli M, Pezzetti G, Manfredi AA, Rovere-Querini P, Del Maschio A. 2013. Magnetic resonance imaging at 7T reveals common events in age-related sarcopenia and in the homeostatic response to muscle sterile injury. *PLoS one* 8:e59308.
- Fellner C, Schick F, Kob R, Hechtl C, Vorbuchner M, Buttner R, Hamer OW, Sieber CC, Stroszczynski C, Bollheimer LC. 2014. Diet-induced and age-related changes in the quadriceps muscle: MRI and MRS in a rat model of sarcopenia. *Gerontology* 60:530–538.
- Feng X, Zhang T, Xu Z, Choi SJ, Qian J, Furdui CM, Register TC, Delbono O. 2012. Myosin heavy chain isoform expression in the Vastus Lateralis muscle of aging African green vervet monkeys. *Experimental gerontology* 47:601–607.

- Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Gilkison C, Jiang J, Achacosa A, Lieberman SA, Tipton K, Wolfe RR, Urban RJ. 2002. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 282:E601-7.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols* 2008:pdb.prot4986.
- Fisher AL. 2004. Of worms and women: sarcopenia and its role in disability and mortality. *Journal of the American Geriatrics Society* 52:1185–1190.
- Fisher JS, Hasser EM, Brown M. 1998. Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 85:1316–1321.
- Fonseca H, Powers SK, Goncalves D, Santos A, Mota MP, Duarte JA. 2012. Physical inactivity is a major contributor to ovariectomy-induced sarcopenia. *International journal of sports medicine* 33:268–278.
- Fox R, Aubert M. 2008. Flow cytometric detection of activated caspase-3. *Methods in molecular biology* 414:47–56.
- Frontera WR, Ochala J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* 96:183–195.
- Fujimaki S, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. 2014. Wnt protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. *The Journal of biological chemistry* 289:7399–7412.
- Furrer R, Jaspers RT, Baggerman HL, Bravenboer N, Lips P, Haan A de. 2013. Attenuated increase in maximal force of rat medial gastrocnemius muscle after concurrent peak power and endurance training. *BioMed research international* 2013:935671.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Laurenzi V de, Maria R de, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon M, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JW, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon H, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation* 16:1093–1107.
- Galvao DA, Taaffe DR, Spry N, Joseph D, Turner D, Newton RU. 2009. Reduced muscle strength and functional performance in men with prostate cancer undergoing androgen suppression: a comprehensive cross-sectional investigation. *Prostate cancer and prostatic diseases* 12:198–203.
- Gault ML, Clements RE, Willems MET. 2012. Functional mobility of older adults after concentric and eccentric endurance exercise. *European journal of applied physiology* 112:3699–3707.

- Gault ML, Willems MET. 2013. Isometric strength and steadiness adaptations of the knee extensor muscles to level and downhill treadmill walking in older adults. *Biogerontology* 14:197–208.
- Geronilla KB, Miller GR, Mowrey KF, Wu JZ, Kashon ML, Brumbaugh K, Reynolds J, Hubbs A, Cutlip RG. 2003. Dynamic force responses of skeletal muscle during stretch-shortening cycles. *European journal of applied physiology* 90:144–153.
- Giannesini B, Izquierdo M, Le Fur Y, Cozzone PJ, Fingerle J, Himber J, Kunnecke B, Kienlin M von, Bendahan D. 2005. New experimental setup for studying strictly noninvasively skeletal muscle function in rat using ¹H-magnetic resonance (MR) imaging and ³¹P-MR spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine* 54:1058–1064.
- Gibson MC, Schultz E. 1983. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle & nerve* 6:574–580.
- Gierer P, Rother J, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. 2010. Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat. *The Journal of trauma* 68:853–858.
- Goodpaster BH, Chomentowski P, Ward BK, Rossi A, Glynn NW, Delmonico MJ, Kritchevsky SB, Pahor M, Newman AB. 2008. Effects of physical activity on strength and skeletal muscle fat infiltration in older adults: a randomized controlled trial. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 105:1498–1503.
- Gradl G, Gaida S, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. 2004. In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in the hindlimb muscle of neuropathic rats. *Pain* 112:121–130.
- Guralnik JM, Ferrucci L, Pieper CF, Leveille SG, Markides KS, Ostir GV, Studenski S, Berkman LF, Wallace RB. 2000. Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 55:M221-31.
- Haehling S von, Morley JE, Anker SD. 2010. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 1:129–133.
- Hamann N, Zaucke F, Heilig J, Oberlander KD, Bruggemann G, Niehoff A. 2014. Effect of different running modes on the morphological, biochemical, and mechanical properties of articular cartilage. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 24:179–188.
- Hamlet WP, Liu SH, Panossian V, Finerman GA. 1997. Primary immunolocalization of androgen target cells in the human anterior cruciate ligament. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 15:657–663.
- Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V, Trackman PC, Takala TE. 1999. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 437:857–864.
- Hanna F, Ebeling PR, Wang Y, O'Sullivan R, Davis S, Wluka AE, Cicuttini FM. 2005. Factors influencing longitudinal change in knee cartilage volume measured from magnetic resonance imaging in healthy men. *Annals of the rheumatic diseases* 64:1038–1042.

- Harber MP, Konopka AR, Udem MK, Hinkley JM, Minchev K, Kaminsky LA, Trappe TA, Trappe S. 2012. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 113:1495–1504.
- Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez DF, Ding Y. 2008. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta neuropathologica* 115:289–296.
- Heinemeier KM, Skovgaard D, Bayer ML, Qvortrup K, Kjaer A, Kjaer M, Magnusson SP, Kongsgaard M. 2012. Uphill running improves rat Achilles tendon tissue mechanical properties and alters gene expression without inducing pathological changes. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 113:827–836.
- Hijazi Y, Boulieu R. 2002. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 30:853–858.
- Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. 2011. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599.
- Hitachi K, Tsuchida K. 2013. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in physiology* 4:408.
- Hoshino D, Yoshida Y, Kitaoka Y, Hatta H, Bonen A. 2013. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 38:326–333.
- Hosoido T, Mori F, Kiyoto K, Takagi T, Sano Y, Goto M, Nakajima K, Wada N. 2013. Qualitative Comparison between Rats and Humans in Quadrupedal and Bipedal Locomotion. *JBBS* 03:137–149.
- Huang Y, Boer WB de, Adams LA, MacQuillan G, Rossi E, Rigby P, Raftopoulos SC, Bulsara M, Jeffrey GP. 2013. Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33:1249–1256.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. 2007. Screening and detection of apoptosis. *The Journal of surgical research* 139:143–156.
- Huhtaniemi I. 2014. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Asian journal of andrology* 16:192–202.
- Huxley AF, Niedergerke R. 1954. Measurement of muscle striations in stretch and contraction. *The Journal of physiology* 124:46-7P.
- Irie T, Aizawa T, Kokubun S. 2005. The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. A study in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 87:1278–1284.
- Isanejad A, Saraf ZH, Mahdavi M, Gharakhanlou R, Shamsi MM, Paulsen G. 2015. The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha and HSP72 in rat skeletal muscle. *Cytokine* 73:302–308.

- Jakob S, Corazza N, Diamantis E, Kappeler A, Brunner T. 2008. Detection of apoptosis in vivo using antibodies against caspase-induced neo-epitopes. *Methods (San Diego, Calif.)* 44:255–261.
- Janssen I. 2011. The epidemiology of sarcopenia. *Clinics in geriatric medicine* 27:355–363.
- Jendzjowsky NG, DeLorey DS. 2011. A prospective evaluation of non-interval- and interval-based exercise training progressions in rodents. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 36:723–729.
- Jiang B, Klueber KM. 1989. Structural and functional analysis of murine skeletal muscle after castration. *Muscle & nerve* 12:67–77.
- Johnson ML, Irving BA, Lanza IR, Vendelbo MH, Konopka AR, Robinson MM, Henderson GC, Klaus KA, Morse DM, Heppelmann C, Bergen HR3, Dasari S, Schimke JM, Jakaitis DR, Nair KS. 2015. Differential Effect of Endurance Training on Mitochondrial Protein Damage, Degradation, and Acetylation in the Context of Aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 70:1386–1393.
- Johnson ML, Lanza IR, Short DK, Asmann YW, Nair KS. 2014. Chronically endurance-trained individuals preserve skeletal muscle mitochondrial gene expression with age but differences within age groups remain. *Physiological reports* 2.
- Jones A, Hwang DJ, Narayanan R, Miller DD, Dalton JT. 2010. Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 151:3706–3719.
- Juel C. 2006. Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *European journal of applied physiology* 96:627–635.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* 11:447–455.
- Kadi F. 2008. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *British journal of pharmacology* 154:522–528.
- Kadi F, Karlsson C, Larsson B, Eriksson J, Larval M, Billig H, Jonsdottir IH. 2002. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *Journal of muscle research and cell motility* 23:335–339.
- Kallio J, Sogaard K, Avela J, Komi P, Selanne H, Linnamo V. 2012. Age-related decreases in motor unit discharge rate and force control during isometric plantar flexion. *Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* 22:983–989.
- Kato H, Suzuki H, Inoue Y, Suzuki K, Kobayashi H. 2016. Leucine-Enriched Essential Amino Acids Augment Mixed Protein Synthesis, But Not Collagen Protein Synthesis, in Rat Skeletal Muscle after Downhill Running. *Nutrients* 8.
- Khosla S. 2013. Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68:1226–1235.
- Knuttgen HG. 2007. Strength training and aerobic exercise: comparison and contrast. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* 21:973–978.

- Koelling S, Miosge N. 2010. Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 62:1077–1087.
- Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM, Stuermer EK. 2013. Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcified tissue international* 92:509–520.
- Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjaer M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, Takala TE. 2001. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 280:R1292-300.
- Krieger JW. 2010. Single vs. multiple sets of resistance exercise for muscle hypertrophy: a meta-analysis. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* 24:1150–1159.
- Krüger K, Gessner DK, Seimetz M, Banisch J, Ringseis R, Eder K, Weissmann N, Mooren FC. 2013. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. *PLoS one* 8:e79069.
- Kung TA, Cederna PS, van der Meulen JH, Urbanek MG, Kuzon WM, JR, Faulkner JA. 2014. Motor unit changes seen with skeletal muscle sarcopenia in oldest old rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69:657–665.
- Kurki P, Ogata K, Tan EM. 1988. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *Journal of immunological methods* 109:49–59.
- Kurosaka M, Naito H, Ogura Y, Machida S, Katamoto S. 2012. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. *Acta physiologica* 205:159–166.
- Landi F, Cruz-Jentoft AJ, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, Capoluongo E, Bernabei R, Onder G. 2013. Sarcopenia and mortality risk in frail older persons aged 80 years and older: results from iI-SIRENTE study. *Age and ageing* 42:203–209.
- Lapointe BM, Cote CH. 1999. Anesthetics can alter subsequent in vitro assessment of contractility in slow and fast skeletal muscles of rat. *The American journal of physiology* 277:R917-21.
- Laughlin MH, Cook JD, Tremble R, Ingram D, Colleran PN, Turk JR. 2006. Exercise training produces nonuniform increases in arteriolar density of rat soleus and gastrocnemius muscle. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 13:175–186.
- Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, Corsi AM, Rantanen T, Guralnik JM, Ferrucci L. 2003. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 95:1851–1860.
- Lin BJ, Chen KK, Chen MT, Chang LS. 1994. The time for serum testosterone to reach castrate level after bilateral orchietomy or oral estrogen in the management of metastatic prostatic cancer. *Urology* 43:834–837.
- Linseisen. 2011. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Ernährung.
- Liu P, Wang Y, Hu H, Mao Y, Huang D, Le Li. 2014. Change of muscle architecture following body weight support treadmill training for persons after subacute stroke: evidence from ultrasonography. *BioMed research international* 2014:270676.

- Lomonosova YN, Shenkman BS, Kalamkarov GR, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL. 2014. L-arginine supplementation protects exercise performance and structural integrity of muscle fibers after a single bout of eccentric exercise in rats. *PLoS one* 9:e94448.
- Loo DT. 2011. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in molecular biology* 682:3–13.
- Lovering RM, Romani WA. 2005. Effect of testosterone on the female anterior cruciate ligament. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289:R15-22.
- Lubek BM. 1984. Contractile responses of rat lateral gastrocnemius and soleus to dianabol (17 beta-hydroxy-17-methyl-1,4-androstadien-3-one) and exercise. *Steroids* 44:485–495.
- Luginbuhl AJ, Dudley GA, Staron RS. 1984. Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry* 81:55–58.
- Lynch GS, Fary CJ, Williams DA. 1997. Quantitative measurement of resting skeletal muscle Ca²⁺i following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell calcium* 22:373–383.
- Lynn R, Morgan DL. 1994. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 77:1439–1444.
- Lynn R, Talbot JA, Morgan DL. 1998. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 85:98–104.
- Maatman TJ, Gupta MK, Montie JE. 1985. Effectiveness of castration versus intravenous estrogen therapy in producing rapid endocrine control of metastatic cancer of the prostate. *The Journal of urology* 133:620–621.
- Maeo S, Yamamoto M, Kanehisa H. 2015. Muscular Adaptations to Short-term Low-frequency Downhill Walking Training. *Int J Sports Med* 36:150–156.
- Marie PJ, Kassem M. 2011. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 165:1–10.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. 2006. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. *The American journal of sports medicine* 34:1274–1280.
- Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OHP, Perez SEA, Nakagaki WR, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS. 2011. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 21:e91-9.
- Marzetti E, Groban L, Wohlgemuth SE, Lees HA, Lin M, Jobe H, Giovannini S, Leeuwenburgh C, Carter CS. 2008. Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294:R558-67.
- Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. 2006. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue engineering* 12:361–367.

- McGuinness SK, Wasiak J, Cleland H, Symons J, Hogan L, Hucker T, Mahar PD. 2011. A systematic review of ketamine as an analgesic agent in adult burn injuries. *Pain medicine* 12:1551–1558.
- McKiernan SH, Colman R, Lopez M, Beasley TM, Weindruch R, Aiken JM. 2009. Longitudinal analysis of early stage sarcopenia in aging rhesus monkeys. *Experimental gerontology* 44:170–176.
- McKinnon NB, Montero-Odasso M, Doherty TJ. 2015. Motor unit loss is accompanied by decreased peak muscle power in the lower limb of older adults. *Experimental gerontology* 70:111–118.
- McMillan EM, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. 2012. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 113:1048–1057.
- Montero-Fernandez N, Serra-Rexach JA. 2013. Role of exercise on sarcopenia in the elderly. *European journal of physical and rehabilitation medicine* 49:131–143.
- Morley JE. 2012. Sarcopenia in the elderly. *Family practice* 29 Suppl 1:i44-i48.
- Morris GF, Mathews MB. 1989. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *The Journal of biological chemistry* 264:13856–13864.
- Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Mayer EP, Ghaffar A. 2004. Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 97:955–959.
- Naeyer H de, Lamon S, Russell AP, Everaert I, Spaey A de, Vanheel B, Taes Y, Derave W. 2014. Androgenic and estrogenic regulation of Atrogin-1, MuRF1 and myostatin expression in different muscle types of male mice. *European journal of applied physiology* 114:751–761.
- Naryzhny SN. 2008. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 65:3789–3808.
- Nascimento CC, Padula N, Milani JG, Shimano AC, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. 2008. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 41:818–824.
- Nilsson O, Marino R, Luca F de, Phillip M, Baron J. 2005. Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone research* 64:157–165.
- Noble EG, Ho R, Dzialoszynski T. 2006. Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. *Acta physiologica* 187:495–501.
- Oner J, Oner H, Sahin Z, Demir R, Ustunel I. 2008. Melatonin is as effective as testosterone in the prevention of soleus muscle atrophy induced by castration in rats. *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)* 291:448–455.
- Ozcan S, Huri E, Doluoglu OG, Karakan T, Ozer E, Fidanci V, Eroglu M, Hucumenoglu S. 2015. The Effect of Testicular Cryoablation on Testosterone Level in Rats: An Experimental Model of Histopathological Orchiectomy. *Urology journal* 12:2256–2260.

- Park H, Park S, Shephard RJ, Aoyagi Y. 2010. Yearlong physical activity and sarcopenia in older adults: the Nakanojo Study. *European journal of applied physiology* 109:953–961.
- Pette D. 1998. Training effects on the contractile apparatus. *Acta physiologica Scandinavica* 162:367–376.
- Pette D. 2001. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 90:1119–1124.
- Pette D. 2002. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 27:423–448.
- Pette D, Staron RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* 50:500–509.
- Pette D, Staron RS. 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemistry and cell biology* 115:359–372.
- Plant DR, Gregorevic P, Warmington SA, Williams DA, Lynch GS. 2003. Endurance training adaptations modulate the redox-force relationship of rat isolated slow-twitch skeletal muscles. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30:77–81.
- Pratt SJ, Lawlor MW, Shah SB, Lovering RM. 2012. An in vivo rodent model of contraction-induced injury in the quadriceps muscle. *Injury* 43:788–793.
- Prezant DJ, Karwa ML, Kim HH, Maggiore D, Chung V, Valentine DE. 1997. Short- and long-term effects of testosterone on diaphragm in castrated and normal male rats. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md: 1985) 82:134–143.
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. 2011. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377:1276–1287.
- Raikova R, Pogrzebna M, Drzymala H, Celichowski J, Aladjov H. 2008. Variability of successive contractions subtracted from unfused tetanus of fast and slow motor units. *Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* 18:741–751.
- Rodio A, Fattorini L. 2014. Downhill walking to improve lower limb strength in healthy young adults. *European Journal of Sport Science* 14:806–812.
- Rolland Y, Czerwinski S, van Abellan Kan G, Morley JE, Cesari M, Onder G, Woo J, Baumgartner R, Pillard F, Boirie Y, Chumlea WMC, Vellas B. 2008. Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *The journal of nutrition, health & aging* 12:433–450.
- Rooy C de, Grossmann M, Zajac JD, Cheung AS. 2016. Targeting muscle signaling pathways to minimize adverse effects of androgen deprivation. *Endocrine-related cancer* 23:R15-26.
- Rosenberg IH. 1997. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition* 127:990S–991.
- Rotter R, Kuhn C, Stratos I, Beck M, Mittlmeier T, Vollmar B. 2012. Erythropoietin enhances the regeneration of traumatized tissue after combined muscle-nerve injury. *The journal of trauma and acute care surgery* 72:1567–1575.
- Ryu M, Jo J, Lee Y, Chung Y, Kim K, Baek W. 2013. Association of physical activity with sarcopenia and sarcopenic obesity in community-dwelling older adults: the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Age and ageing* 42:734–740.

- Sakuma K, Yamaguchi A. 2012. Sarcopenia and age-related endocrine function. *International journal of endocrinology* 2012:127362.
- Sartiani L, Spinelli V, Laurino A, Blescica S, Raimondi L, Cerbai E, Mugelli A. 2015. Pharmacological perspectives in sarcopenia: a potential role for renin-angiotensin system blockers? *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* 12:135–138.
- Sayer AA, Robinson SM, Patel HP, Shavlakadze T, Cooper C, Grounds MD. 2013. New horizons in the pathogenesis, diagnosis and management of sarcopenia. *Age and ageing* 42:145–150.
- Schaser K, Stover JF, Melcher I, Lauffer A, Haas NP, Bail HJ, Stockle U, Puhl G, Mittlmeier TW. 2006. Local cooling restores microcirculatory hemodynamics after closed soft-tissue trauma in rats. *The Journal of trauma* 61:642–649.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal* 280:4294–4314.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* 91:1447–1531.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182:311–322.
- Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. 1991. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *The Journal of pathology* 165:173–178.
- Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Pellegrini C, Blandizzi C, Dolfi A, Bernardini N. 2015. Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PloS one* 10:e0144630.
- Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. 2014. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466:1673–1687.
- Serra C, Tangherlini F, Rudy S, Lee D, Toraldo G, Sandor NL, Zhang A, Jasuja R, Bhasin S. 2013. Testosterone improves the regeneration of old and young mouse skeletal muscle. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68:17–26.
- Shefer G, Rauner G, Stuelsatz P, Benayahu D, Yablonka-Reuveni Z. 2013. Moderate-intensity treadmill running promotes expansion of the satellite cell pool in young and old mice. *The FEBS journal* 280:4063–4073.
- Shefer G, Rauner G, Yablonka-Reuveni Z, Benayahu D. 2010. Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PloS one* 5:e13307.
- Shefer G, Van de Mark, Daniel P, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z. 2006. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Developmental biology* 294:50–66.
- Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Casperson SL, Gilkison C, Volpi E, Wolf SE, Jiang J, Rosenblatt JI, Urban RJ. 2006. Androgen therapy induces muscle protein anabolism in older women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:3844–3849.

- Shin MS, Ko IG, Kim SE, Kim BK, Kim TS, Lee SH, Hwang DS, Kim CJ, Park JK, Lim BV. 2013. Treadmill exercise ameliorates symptoms of methimazole-induced hypothyroidism through enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31:214–223.
- Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. 2003. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 144:5081–5088.
- Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. 2002. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283:E154-64.
- Sinha-Hikim I, Cornford M, Gaytan H, Lee ML, Bhasin S. 2006. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:3024–3033.
- Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285:E197-205.
- Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. 2004. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:1150–1152.
- Song W, Kwak H, Lawler JM. 2006. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling* 8:517–528.
- Srinivas-Shankar U, Wu FCW. 2009. Frailty and muscle function: role for testosterone? *Frontiers of hormone research* 37:133–149.
- Stewart BG, Tarnopolsky MA, Hicks AL, McCartney N, Mahoney DJ, Staron RS, Phillips SM. 2004. Treadmill training-induced adaptations in muscle phenotype in persons with incomplete spinal cord injury. *Muscle & nerve* 30:61–68.
- Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. 2009. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Laboratory animals* 43:149–154.
- Stratos I. 2009. Einfluss von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor auf die traumatisierte periphere Skelettmuskulatur der Ratte.
- Stratos I, Graff J, Rotter R, Mittlmeier T, Vollmar B. 2010. Open blunt crush injury of different severity determines nature and extent of local tissue regeneration and repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28:950–957.
- Stratos I, Richter N, Rotter R, Li Z, Zechner D, Mittlmeier T, Vollmar B. 2012. Melatonin restores muscle regeneration and enhances muscle function after crush injury in rats. *Journal of pineal research* 52:62–70.

- Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 103:1857–1863.
- Sugiura T, Morimoto A, Murakami N. 1992. Effects of endurance training on myosin heavy-chain isoforms and enzyme activity in the rat diaphragm. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 421:77–81.
- Szulc P, Duboeuf F, Marchand F, Delmas PD. 2004. Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *The American journal of clinical nutrition* 80:496–503.
- Tamaki T, Hirata M, Uchiyama Y. 2014. Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats. *Frontiers in aging neuroscience* 6:296.
- Tiidus PM, Deller M, Liu XL. 2005. Oestrogen influence on myogenic satellite cells following downhill running in male rats: a preliminary study. *Acta physiologica Scandinavica* 184:67–72.
- Touchberry CD, Gupte AA, Bomhoff GL, Graham ZA, Geiger PC, Gallagher PM. 2012. Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell stress & chaperones* 17:693–705.
- Travison TG, Basaria S, Storer TW, Jette AM, Miciek R, Farwell WR, Choong K, Lakshman K, Mazer NA, Coviello AD, Knapp PE, Ulloor J, Zhang A, Brooks B, Nguyen A, Eder R, LeBrasseur N, Elmi A, Appleman E, Hede-Brierley L, Bhasin G, Bhatia A, Lazzari A, Davis S, Ni P, Collins L, Bhasin S. 2011. Clinical meaningfulness of the changes in muscle performance and physical function associated with testosterone administration in older men with mobility limitation. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 66:1090–1099.
- Tsalouhidou S, Petridou A, Mougios V. 2009. Effect of chronic exercise on DNA fragmentation and on lipid profiles in rat skeletal muscle. *Experimental physiology* 94:362–370.
- Tsivitse SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ, Pizza FX. 2003. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. *European journal of applied physiology* 90:633–638.
- Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stuhmer W, Pardo LA. 2014. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369:20130094.
- van Abellan Kan G. 2009. Epidemiology and consequences of sarcopenia. *The journal of nutrition, health & aging* 13:708–712.
- van de Crommert HW, Mulder, Duysens. 1998. Neural control of locomotion: sensory control of the central pattern generator and its relation to treadmill training. *Gait & posture* 7:251–263.
- Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, Borjesson AE, Ohlsson C. 2014. Sex steroid actions in male bone. *Endocrine reviews* 35:906–960.
- Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, Vachon P. 2013. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 52:567–570.

- Vogt M, Hoppeler HH. 2014. Eccentric exercise: mechanisms and effects when used as training regime or training adjunct. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 116:1446–1454.
- Vrabas IS, Dodd SL, Powers SK, Hughes M, Coombes J, Fletcher L, Demirel H, Reid MB. 1999. Endurance training reduces the rate of diaphragm fatigue in vitro. *Medicine and science in sports and exercise* 31:1605–1612.
- Wada M, Inashima S, Yamada T, Matsunaga S. 2003. Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 94:923–929.
- Wada N, Toba Y, Iwamoto W, Goto M, Miyata H, Mori F, Morita F. 2008. Investigation and characterization of rat bipedal walking models established by a training program. *Brain research* 1243:70–77.
- Wagatsuma A, Sakuma K. 2014. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. *BioMed research international* 2014:121254.
- Walston JD. 2012. Sarcopenia in older adults. *Current opinion in rheumatology* 24:623–627.
- Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KKH, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen A. 2002. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 8:375–391.
- Weber H, Rauch A, Adamski S, Chakravarthy K, Kulkarni A, Dogdas B, Bendtsen C, Kath G, Alves SE, Wilkinson HA, Chiu CS. 2012. Automated rodent in situ muscle contraction assay and myofiber organization analysis in sarcopenia animal models. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 112:2087–2098.
- Wen CP, Wai JPM, Tsai MK, Yang YC, Cheng TYD, Lee M, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X. 2011. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet* (London, England) 378:1244–1253.
- White JP, Gao S, Puppa MJ, Sato S, Welle SL, Carson JA. 2013. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology* 365:174–186.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. 1994. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic research in cardiology* 89:397–410.
- Widrick JJ, Fuchs R, Maddalozzo GF, Marley K, Snow C. 2007. Relative effects of exercise training and alendronate treatment on skeletal muscle function of ovariectomized rats. *Menopause* (New York, N.Y.) 14:528–534.
- Wiggs MP. 2015. Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Frontiers in physiology* 6:63.
- Wijisman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde, C J, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 41:7–12.

- Wilson JM, Loenneke JP, Jo E, Wilson GJ, Zourdos MC, Kim J. 2012. The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* 26:1724–1729.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. 2011. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods in cell biology* 103:55–98.
- Wu FCW, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean MEJ, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT. 2010. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *The New England journal of medicine* 363:123–135.
- Yan Z, Lira VA, Greene NP. 2012. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exercise and sport sciences reviews* 40:159–164.
- Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. 2011. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 110:264–274.
- Yu CC, Filipe MI. 1993. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *The Histochemical journal* 25:843–853.
- Yu CC, Woods AL, Levison DA. 1992. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *The Histochemical journal* 24:121–131.
- Zancanaro C, Mariotti R, Perdoni F, Nicolato E, Malatesta M. 2007. Physical training is associated with changes in nuclear magnetic resonance and morphometrical parameters of the skeletal muscle in senescent mice. *European journal of histochemistry : EJH* 51:305–310.
- Zeng W, Wang X, Xu P, Liu G, Eden HS, Chen X. 2015. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro. *Theranostics* 5:559–582.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. habil. Ioannis Stratos für die hervorragende Betreuung und große Hilfsbereitschaft vor allem in der Planung und Fertigstellung meiner Arbeit. Seine fachlichen Anregungen und konstruktive Kritik haben mich immer wieder aufs Neue ermutigt und motiviert und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, für ihre stets freundliche und wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Institut durchführen zu können.

Mein Dank gilt zudem allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Chirurgie für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Dorothea Frenz für die Erstellung der histologischen Präparate und Berit Blendow für die Durchführung der Laboranalyse. Zudem danke ich den Tierpflegern für die verantwortungsvolle Betreuung und Pflege der Versuchstiere.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier, dem Direktor der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universität Rostock, sowie Herrn Prof. Dr. Sven Bruhn vom Institut für Sportwissenschaften der Universität Rostock und Herrn Mario Bäumlner vom Olympiastützpunkt Mecklenburg-Vorpommern, die bei der Ausarbeitung des Trainingsprotokolls einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

Danke dir, lieber Thorsten, für dein gewissenhaftes und konstruktives Korrekturlesen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch von ganzem Herzen bei meiner wunderbaren Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe, mit der sie mich auf all meinen Wegen begleiten und mir meine Ausbildung ermöglicht haben.

Rostock, September 2016

Katharina Hink

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, September 2016

Katharina Hink