Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie (Prof. Dr. med. W. Lehmann) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von vertikaler Ganzkörpervibration, Alendronat und 8-Prenylnaringenin auf die Muskulatur der ovariektomierten Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Charlotte Hanna Maren Rechholtz

aus

Windhoek (Namibia)

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer	
Referent:	Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch	
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke	
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön	
Detune den mündlich en Drüfunge	21 05 2017	

Datum der mündlichen Prüfung: 31.05.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von vertikaler Ganzkörpervibration, Alendronat und 8-Prenylnaringenin auf die Muskulatur der ovariektomierten Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

A	AbkürzungsverzeichnisV				
1	Einl	eitur	ng1		
2	Hint	tergr	und3		
	2.1	Mu.	skulatur3		
	2.1.	1	Aufbau und Charakteristika der Muskulatur3		
	2.1.	2	Muskelfasertypen und Klassifikationen10		
	2.1.	3	Fasertypanteile in verschiedenen Muskeln12		
	2.2	Ver	änderungen in der Postmenopause13		
	2.3	Sari	kopenie und Osteoporose14		
	2.4	Ost	eoporosetherapien - Effekte auf den Muskel16		
	2.4.	1	Vertikale Ganzkörpervibrationstherapie16		
	2.4.2		Alendronat		
	2.4.	3	8-Prenylnaringenin18		
	2.5	Die	Ratte als Versuchsmodell20		
	2.6	Ziel	e und Fragestellung21		
3	Mat	eria	und Methoden23		
	3.1	Ver	suchsablauf23		
	3.2	Ver	suchstiere		
	3.3	Ova	ariektomie		
	3.4	Beh	andlung28		
	3.4.	1	Vertikale Ganzkörpervibration28		
	3.4.	2	Alendronat29		
	3.4.	3	8-Prenylnaringenin		
	3.5	Ost	eotomie und Osteosynthese		

3.6	Poly	chrome Sequenzmarkierung	31
3.7	Obd	uktion und Muskelpräparation	31
3.8	Ausı	vertungsmethoden	33
3.8.1	1	Serumanalyse	33
3.8.2	2	Muskelschnitte	33
3.8.3	3	Histologische Färbungen	34
3.	8.3.1	Myofibrilläre-ATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase	34
3.	8.3.2	Amylase-PAS-Färbung	35
3.8.4	4	Histologische Auswertung	36
3.8.5	5	Statistische Auswertung	40
Erge	bniss	se	41
<i>4</i> 1	Körr	peraewichtsverlauf und Eutteraufnahme der Versuchstiere üher den aesan	nten
Versuc	hszei	traum	42
versue.			/2
4.2	Alen	dronat-Dosisaufnahme	44
4.3	Uter	usgewichte zum Versuchsende	45
4.4	Gew	ichte des M. gastrocnemius und M. soleus zum Versuchsende	45
4.5	Korr	elation zwischen Körpergewicht und Muskelgewicht der Versuchstiere	48
4.6	Krea	itinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende	49
4.7	Erge	bnisse zur mATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase: Fläche,	
Verhält	tnis v	on Fläche zu Körpergewicht, Durchmesser und Verhältnis von Durchmesse	er zu
Körper	gewi	cht	49
4.7.1	1	Ergebnisse zum M. longissimus	50
4.	7.1.1	Ergebnisse der glykolytischen Fasern	50
4.	7.1.2	Ergebnisse der intermediären Fasern	52
4.	7.1.3	Ergebnisse der oxidativen Fasern	54
4.7.2	2	Ergebnisse zum M. gastrocnemius	56
4.	7.2.1	Ergebnisse der glykolytischen Fasern	56
4.	7.2.2	Ergebnisse der intermediären Fasern	58
	3.6 3.7 3.8 3.8.3 3.8.3 3.8.3 3.8.4 3.8.4 3.8.4 3.8.4 3.8.4 4.1 Versuc 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 Verhäl Körper 4.7.3 4.4 4.5 4.6 4.7	3.6 Poly 3.7 Obd 3.8 Ausv 3.8.1 3.8.2 3.8.3 3.8.3 3.8.3.1 4.7.1.1 4.7.1.3 4.7.2.1 4.7.2.1 4.7.2.1	 3.6 Polychrome Sequenzmarkierung. 3.7 Obduktion und Muskelpräparation 3.8 Auswertungsmethoden 3.8.1 Serumanalyse 3.8.2 Muskelschnitte 3.8.3 Histologische Färbungen 3.8.3 Histologische Färbungen 3.8.3.1 Myofibrilläre-ATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase 3.8.3.2 Amylase-PAS-Färbung 3.8.4 Histologische Auswertung 3.8.5 Statistische Auswertung 3.8.5 Statistische Auswertung 4.1 Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme der Versuchstiere über den gesan Versuchszeitraum 4.2 Alendronat-Dosisaufnahme 4.3 Uterusgewichte zum Versuchsende 4.4 Gewichte des M. gastrocnemius und M. soleus zum Versuchsende 4.5 Korrelation zwischen Körpergewicht und Muskelgewicht der Versuchstiere 4.6 Kreatinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende 4.7 Ergebnisse zur mATPase-Förbung in Kombination mit Diaphorase: Fläche, Verhältnis von Fläche zu Körpergewicht, Durchmesser und Verhältnis von Durchmesser Körpergewicht. 4.7.1 Ergebnisse der intermediären Fasern 4.7.1.3 Ergebnisse der oxidativen Fasern 4.7.2 Ergebnisse der glykolytischen Fasern 4.7.2 Ergebnisse der intermediären Fasern 4.7.2 Ergebnisse der glykolytischen Fasern 4.7.2 Ergebnisse der intermediären Fasern

	4.7	7.3	Ergebnisse zum M. soleus	61
	4	4.7.3.1	Ergebnisse der oxidativen Fasern	61
	4.8	Erge	ebnisse zur Amylase-PAS-Kapillarfärbung: Kapillardichte und Verhältnis v	on
	Kapill	lardich	te zum Körpergewicht	63
	4.8	8.1	Ergebnisse zum M. longissimus	63
	4.8	3.2	Ergebnisse zum M. gastrocnemius	64
	4.8	8.3	Ergebnisse zum M. soleus	65
5	Dis	skussio	on	67
	5.1	Körp	pergewicht und Futteraufnahme der Versuchstiere	67
	5.2	Utei	rusgewichte	68
	5.3	Gew	vichte des M. gastrocnemius und des M. soleus zum Versuchsende	69
	5.4	Krea	ntinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende	70
	5.5	Fläc	he und Durchmesser der Muskelfasern	71
	5.5	5.1	Effekte der Ovariektomie	71
	5.5	5.2	Effekte der vertikalen Ganzkörpervibration	72
	5.5	5.3	Effekte des Alendronats	73
	5.5	5.4	Effekte des 8-Prenylnaringenins	75
	5.6	Кар	illardichte	77
	5.7	Schl	ussfolgerung	80
6	Zus	samm	enfassung	82
7	Su	mmary	y	84
8	Lite	eratur	verzeichnis	86
9	Ab	bildun	gsverzeichnis	100
1() -	Tabell	enverzeichnis	104
11	L	Anhan	g	105

11.1	Rezepturen für die mATPase-Färbung105
11.2	mATPase-Färbeprotokoll
11.3	Rezepturen für die Amylase-PAS-Kapillarfärbung111
11.4	Amylase-PAS-Färbeprotokoll
11.5	Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme der Versuchstiere über den gesamten
Versuc	hszeitraum
11.6	Alendronat-Dosisaufnahme116
11.7	Uterusgewichte zum Versuchsende116
11.8	Gewichte des M. gastrocnemius und M. soleus zum Versuchsende
11.9	Kreatinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende
11.10	Ergebnisse der mATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase118
11.11	Ergebnisse der Amylase-PAS-Kapillarfärbung123

Abkürzungsverzeichnis

8-PN	8-Prenylnaringenin
ADP	Adenosindiphosphat
АК	Alizarin-Komplexon
AM	mittlere Alendronataufnahme der Ratten (in mg)
ANOVA	Varianzanalyse/ analysis of variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphospat
bzw.	beziehungsweise
CaCl2	Calciumchlorid
CG	Calcein-Grün
cm	Zentimeter
d	Tag/e
D	mittlere Alendronat-Dosisaufnahme der Ratten (mg / kg)
et al.	et alii
g	Gramm
h	Stunde
HCI	Salzsäure/ Chlorwasserstoff
КСІ	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
I	Liter
Μ	molare Masse oder Mittelwert
М.	Musculus
mATPase	myofibrilläre Adenosintriphosphatase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	SI-Einheit einer Stoffmenge (ein Mol)

Ν	Normalität (bei Säuren und Basen)
NaOH	Natronlauge/ Natriumhydroxid
n _F	Anzahl Fasern pro 0,5 mm ² -Ausschnitt
n _K	Anzahl Kapillaren pro 0,5 mm ² -Ausschnitt
n _{K/F}	Anzahl Kapillaren pro Faser/ Kapillardichte
N _{K/F}	Mittlere Anzahl Kapillaren pro Faser (auf 1 mm ²)
NON-OVX	nicht-ovariektomiert
OVX	ovariektomiert
p.c.	post conceptionem
PAS-Reaktion	Periodic acid-Schiff reaction
P _i	inorganisches Phosphat
RT	Raumtemperatur
S.	siehe
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SO ₂	Schwefeldioxid
тс	Tetrazyklin-Hydrochlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.w.	und weitere
VEGF	Vaskular Endothelial Growth Factor
w	Woche/n
x	mal
ХО	Xylenolorange-Tetranatriumsalz
z.B.	zum Beispiel
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

Die Muskulatur und das Knochengerüst bilden das muskuloskelettale System des Körpers. Beide Bestandteile sind maßgeblich bedeutend in der Behandlung der Osteoporose, und die Kraft der Muskulatur sowie des Knochens sind entscheidend bei der Frakturprävention (Kaastad et al. 2000). Eine wichtige Erkenntnis ist, dass Muskulatur und Knochen zusammenarbeiten und sich gegenseitig beeinflussen können (Novotny et al. 2015). Der Verlust an Muskelmasse verläuft parallel mit einem Verlust an Skelettmasse. Neben verschiedenen Ursachen wie Alter, chronischen Krankheiten, Hormonabfall (Östrogen, Testosteron), Medikamenteneinnahme und Inaktivität wird angenommen, dass eine reduzierte muskelbedingte mechanische Belastung zu einer Knochendichteminderung führen kann (Aloia et al. 1991; Wolfe 2006).

Der Östrogenabfall während der Wechseljahre verursacht neben einer Verringerung der Knochendichte (Kalu 1991) auch eine Abnahme der Muskelmasse (Aloia et al. 1991). Ähnlich der Osteoporose ist auch die Sarkopenie weitverbreitet im höheren Alter mit bis zu 50 % Betroffenen der über 80-Jährigen (Cruz-Jentoft et al. 2010). Die Sarkopenie wird definiert als ein altersbedingter Verlust an Muskelmasse und -kraft und ist eine der Hauptursachen für Funktionseinschränkung, Invalidität und Morbidität der älteren Bevölkerung (Roubenoff und Hughes 2000). Als Folge der Sarkopenie nehmen die motorischen Fähigkeiten und die dynamische Balance ab, was folglich zu einem erhöhten Sturzrisiko führt. Da die Sturzgefahr erhöht, kommt es zu einem gesteigerten Frakturrisiko und damit einhergehend zu einer erhöhten Mortalität (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Bei Arzneimitteln und Therapiemethoden, welche zur Behandlung der Osteoporose eingesetzt werden, sollte folglich auch die Wirkung auf den Muskel erfasst werden und nicht nur der Effekt auf die Knochendichte (Kaastad et al. 2000). Es ist nicht immer eindeutig, ob der knochenstärkende Effekt dadurch erfolgt, dass ein Medikament direkt auf den Knochen oder über eine Stärkung des Muskels indirekt auf den Knochen wirkt (Wolfe 2006).

1

1 Einleitung

Als Teil einer Versuchsreihe in der Osteoporoseforschung (Stuermer et al. 2010a; Komrakova et al. 2011; Komrakova et al. 2013; Stuermer et al. 2014 u.w.) soll in dieser Studie das Ziel verfolgt werden, die Effekte verschiedener Behandlungen auf die Skelettmuskulatur der ovariektomierten Ratte zu erfassen. Ausgewählte Therapien sind die vertikale Vibrationstherapie als präklinisch erforschte passive mechanische Stimulierung des muskuloskelettalen Systems, weiterhin das Osteoporosemedikament Alendronat, welches eine knochendichtesteigernde Wirkung hat, sowie das Phytoöstrogen 8-Prenylnaringenin aus dem Hopfen, welches eine mögliche Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie darstellt und ebenfalls derzeit erforscht wird.

Die Ratte ist als Versuchsmodell für diese Studie geeignet, da sie ein etabliertes postmenopausales Osteoporosemodell ist (Kalu 1991; Turner et al. 2001) und schon ähnliche Forschungsarbeiten am Muskel der Ratte durchgeführt wurden (Kadi et al. 2002; Pette 2002; Komrakova et al. 2013). Die Ratte wird schnell reif und die Effekte eines hormonellen Entzugs nach Ovariektomie zeigen sich schnell. Weil die Ratte ein kleines Versuchstier ist, ist es möglich, eine größere Gruppenanzahl zu untersuchen und dadurch eine aussagekräftigere Statistik zu erlangen. Dies bekräftigte den Entschluss, auch in dieser Studie die Ratte als Versuchsmodell einzusetzen.

2 Hintergrund

2.1 Muskulatur

2.1.1 Aufbau und Charakteristika der Muskulatur

Der Körper besteht neben dem Muskelgewebe, welches etwa 40 % des Gesamtkörpergewichtes ausmacht, aus drei weiteren Hauptgewebetypen: dem Epithelgewebe, dem Binde- und Stützgewebe, dem auch das Fettgewebe zugehörig ist, und dem Nervengewebe (Drenckhahn 2008). Der Muskel als Organ beinhaltet neben dem Muskelgewebe auch Nervenfasern, Gefäße sowie Bindegewebe, welches die Muskelbündel umhüllt. Die Hauptfunktionen der Muskulatur sind sowohl die bewusst ablaufende Zielbewegung sowie die unbewusst ablaufende Stützhaltung, die Wärmeproduktion als auch Formveränderung und Bewegung von Organen (Deetjen et al. 2004). Die für diese Funktionen notwendige Eigenschaft ist die Kontraktilität der Muskelfilamente (Lüllmann-Rauch 2012), welche die Umwandlung von chemischer in mechanische und thermische Energie voraussetzt (Ulfig 2005).

Muskulatur kann in drei Arten aufgeteilt werden: Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatte Muskulatur. Die ersten beiden Formen sind quergestreift. Die nicht-quergestreifte glatte Muskulatur ist in den Wänden innerer Organe und Blutgefäße zu finden (Lüllmann-Rauch 2012). Herzmuskulatur und glatte Muskulatur werden unwillkürlich durch das autonome Nervensystem und durch humorale Einflüsse gesteuert (Klinke 2010). Unter einem Licht- und Elektronenmikroskop kann bei der quergestreiften Muskulatur ein charakteristisches Muster erkannt werden, welches namensgebend ist. Eine Querstreifung der Muskelfasern erfolgt durch den geordneten Myofibrillenaufbau der hellen I-Banden (I-Streifen), welche isotrop (einfachlichtbrechend) sind, und der dunklen A-Banden (A-Streifen), welche anisotrop (doppellichtbrechend) sind (Welsch 2010). Glatter Muskulatur fehlt dieser Aufbau (Welsch 2010). Tabelle 1 verdeutlicht die Unterschiede und Eigenschaften der genannten Muskulaturarten. Im weiteren Verlauf soll nur auf die Skelettmuskulatur eingegangen werden, da diese von zentraler Bedeutung für das Thema dieser Arbeit ist.

Tabelle 1: Einteilung der Muskulaturarten

(Welsch 2010)

	Muskulaturart			
Eigenschaft	Skelettmuskulatur	Herzmuskulatur	Glatte Muskulatur	
Querstreifung	Ja	Ja	Nein	
Länge	≤ 10 cm	50 - 120 μm	20 - 200 μm	
Durchmesser	40 - 100 μm	15 - 20 μm	3 - 10 μm	
Lage und Form der Kerne	Viele randständige abgeflachte Kerne	Ein rund-ovaler zentraler Kern	Ein länglicher zentra- ler Kern	
Aufbau der Zelle	Sehr groß und lang (Synzytium)	Verzweigt, mit Glanzstreifen zwischen den Zellen	Meist dünn, spindel- förmig	

Im Folgenden wird der Aufbau und die Beschaffenheit des Muskels bis in die kleinste Einheit beschrieben (Lüllmann-Rauch 2012, wenn nicht anders gekennzeichnet). Abbildung 1 trägt zum Verständnis der Zusammensetzung des Muskels bei.

Grundsätzlich ist ein Muskel von einer straffen, schützenden Bindegewebsfaszie umhüllt. Direkt darunter liegt eine lockere Bindegewebsschicht, welche als *Epimysium* bezeichnet wird. Dieses geht über in das *Perimysium externum* und zieht septenartig in den Muskel hinein und unterteilt die Masse der Muskelfasern in Sekundärbündel. Weitere feinere Septen des *Perimysiums internum* unterteilen diese Sekundärbündel in Primärbündel, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 1 mm haben und aus circa 200 Muskelfasern bestehen. Das *Perimysium* hilft dem Muskel bei der Zugübertragung auf die Sehnen, indem es längs der Sehnenrichtung verläuft. Hauptbestandteil des *Perimysiums* sind Kollagenfasern. In den Bindegewebsbahnen verlaufen die muskulären Nervenfasern und Gefäße, welche durch die *Areae nervovasculosae* eintreten (Welsch 2010). Die einzelnen Muskelfasern, welche die Zellen der Skelettmuskulatur darstellen, werden vom *Endomysium* umgeben. Dieses besteht aus retikulären Fasern, liefert eine erhöhte Reißfestigkeit und ergibt die kleinste bindegewebige Struktur des Muskels. Um die Muskelfasern herum verlaufen feinste geschlängelte Kapillaren, welche eine optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung und den Abtransport von metabolischen Endprodukten gewährleisten und sich an die Länge des Faserzustandes anpassen können. Die verschiedenen Bindegewebseinteilungen des Muskels erlauben eine Verschiebbarkeit der einzelnen Bündel zueinander, welches sich als Vorteil bei der Muskelkontraktion erweist (Ulfig 2005).



Abbildung 1: Aufbau der Muskulatur

(wikimedia 2016 - Creative-Commons-Lizenz/ Bauplan_der_Skelettmuskulatur.png: Urheber Marc Schmid., CC BY 2.5, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12129729)

Die Muskelfaser der Skelettmuskulatur ist ein vielkerniges Synzytium aus vielen miteinander verschmolzenen Muskelvorläuferzellen, den sogenannten Myoblasten. Letztere stammen aus dem paraxialen Mesoderm und sind zum Zeitpunkt der Muskelentstehung unreif, einkernig und teilungsfähig (Lüllmann-Rauch 2012). Sie fusionieren an der Basalmembran

(Sarkolemm) und bilden kettenartige Myotuben, in denen sich die ersten Myofibrillen differenzieren und die Zellen durch erhöhte Produktion von myogenen Proteinen an Mitoseaktivität verlieren (Welsch 2010). Die Myotuben entwickeln sich unter Aufnahme weiterer Myoblasten zu großen teilungsunfähigen Skelettmuskelzellen von einer Länge bis zu mehreren Zentimetern und einer Breite von 40 bis 100 μm. Die länglich ovalen Kerne wandern dabei an den Rand der Zelle an das Sarkolemm. Ein Wachstumsende wird mit dem Protein Myostatin erreicht, welches die Muskelfaser eigenständig sezerniert (Welsch 2010). Die Quantität der Muskelfasern ist dabei fast immer prädestiniert (Ebermann und Elmadfa 2011). An der Basalmembran verbleiben auch etliche "Reservezellen". Diese sind ruhende Myoblasten mit Stammzellcharakter, welche Satellitenzellen genannt und bei Bedarf aktiviert werden (Welsch 2010). Die Aktivierung geschieht beispielweise bei physiologischem Muskelwachstum, aber auch bei Trainingshypertrophie, wobei die Satellitenzellen mit der Basalmembran der Muskelfaser fusionieren und zu vermehrter Proteinproduktion und Faserdickenzunahme beitragen (Lüllmann-Rauch 2012). Bei Inaktivität der Muskulatur kehren die Zellen in ihren Ursprungszustand zurück, und die Muskelfaserdicke nimmt folglich wieder ab.

Muskelfasern besitzen im Zytoplasma hauptsächlich Myofibrillen, Mitochondrien und sarkoplasmatische Retikuli. Die Myofibrillen besitzen den kontraktilen Apparat, sind streng aufgebaut aus Aktin- und Myosinfilamenten und fallen durch ihre typische Querstreifung im Längsschnitt auf. Im Querschnitt sind die Myofibrillen als Pünktchen zu sehen und lagern sich zu Bündeln zusammen, um mit dem dazwischen liegenden Zytoplasma die Cohnheimsche Felderung zu ergeben (Ulfig 2005). Es gibt Hunderte von Myofibrillen in einer Muskelfaser. Die eigentliche Funktionseinheit der Fibrille ist das Sarkomer (siehe Abbildung 2), welches im Ruhezustand eine Länge von 2,2 µm aufweist (Klinke et al. 2005). Aufgebaut ist die Querstreifung der Myofibrillen wie bereits beschrieben aus alternierenden A- und I-Banden. Elektronenmikroskopisch ist erkennbar, dass die I-Bande von einer Linie unterteilt wird, welche nach ihrem zickzack-förmigen Aussehen benannt wurde und Z-Scheibe heißt.



Abbildung 2: Vereinfachter Aufbau eines Sarkomers

(eigene Darstellung)

Der typische Sarkomeraufbau der Muskelfaser stellt die Grundlage für die Muskelkontraktion dar. Die Gleitfilamenttheorie (zuerst beschrieben von Huxley 1953) beschreibt den mikroskopischen Vorgang des Verschiebens der Myofilamente Aktin und Myosin und soll im Folgenden eingehender erläutert werden (Deetjen et al. 2004, wenn nicht anders gekennzeichnet). Aktin ist eine zweisträngige Doppelhelix, die zur Zugübertragung an der Innenseite der Zellmembran befestigt ist, und Myosin ist ein Hexamer aus zwei schweren und vier leichten Myosinketten, die sich in großer Anzahl zu einem Myosinfilament zusammenschließen. Während der Muskelkontraktion werden die Aktin- und die Myosinfilamente ineinander verschoben, die Z-Scheiben nähern sich einander an und die Sarkomerlänge verkürzt sich bis zu 40 %. Die eigentlichen Längen der Filamente bleiben jedoch konstant. Während des Vorgangs gleiten die Aktinfilamente in die Myosinzwischenräume und es bilden sich Brücken zwischen den Myosinköpfchen und den Aktinfilamenten. Der Querbrückenzyklus beschreibt diesen Vorgang modellhaft in verschiedenen Phasen und wird in der Abbildung 3 veranschaulicht.



Abbildung 3: Der Querbrückenzyklus: die Interaktion von Aktin und Myosin während der Muskelkontraktion (mit freundlicher Genehmigung aus Speckmann et al. 2004 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München)

Das Myosinfilament besitzt seitlich kleine Köpfchen, welche mit dem Aktinfilament während der Muskelkontraktion interagieren. Diese Myosinköpfchen beinhalten das Enzym myofibrilläre Adenosintriphosphatase (mATPase), welches das energiereiche Molekül Adenosintriphosphat in Adenosindiphosphat und inorganisches Phosphat spaltet, wobei Energie freigesetzt wird:

$$ATP + H_2O \leftrightarrow ADP + P_i + Energie$$

Im Ruhezustand des Muskels sind Myosin und Aktin nicht miteinander verbunden und die mATPase-Stelle am Myosinköpfchen ist mit einem Molekül ATP belegt. Das Myosinköpfchen liegt in einem 90 ° - Winkel zum Myosinhebelarm. Das ATP wird hydrolysiert und ADP und P_i verbleiben an ihrer Myosinbindestelle.

Voraussetzung für eine Muskelkontraktion ist ein Nervenimpuls. Dieser löst durch die motorische Endplatte an der Muskelmembran eine elektrochemische Erregung aus, die sich

über die gesamte Fasermembran ausbreitet. Ins Innere der Muskelfaser gelangt die Erregung durch das Transversalsystem, welches eng mit dem Longitudinalsystem und dem sarkoplasmatischen Retikulum verbunden ist. Das sarkoplasmatische Retikulum enthält hohe Konzentrationen von Calcium und gibt diese spannungsabhängig in das Sarkoplasma frei. Dabei erhöht sich die Calciumkonzentration im Zytosol von 10⁻⁷ mol/l auf 10⁻⁵ mol/l (Berg et al. 2009). Calciumionen lagern sich an isolierendes Troponin an, welches im Aktinfilament angelagert ist und bewirken ein Zurückziehen von diesem in die Aktinspirale hinein, sodass die Bindungsstellen für das Myosin freiwerden. Dies führt dazu, dass sich die Myosinköpfchen an das benachbarte Aktinfilament anlagern und eine feste Querbrücke bilden. Durch den Aktinkontakt lösen sich nacheinander zuerst das Pi und daraufhin das ADP von der Bindungsstelle. Dies veranlasst den sogenannten "Ruderschlag" (Keul et al. 1969): das Myosinköpfchen kippt auf 45 ° zum Arm ab und bewirkt ein mechanisches Ziehen des Aktinfilaments. Die Filamente gleiten ineinander und das Sarkomer verkürzt sich. Durch die enorm hohe Anzahl an Myosinköpfchen im Sarkomer und die hohe Anzahl an in Reihe liegenden Sarkomeren im Muskel wird diese Kontraktion sichtbar. Durch eine erneute Anlagerung von ATP an das Myosinköpfchen und eine Verminderung der Calciumkonzentration im Sarkoplasma durch aktiven Rücktransport in das sarkoplasmatische Retikulum, löst sich das Köpfchen wieder vom Aktinfilament ab und die Muskelfaser kehrt in ihren entspannten Ursprungszustand zurück. Dieser Vorgang ist unbegrenzt wiederholbar solange genügend ATP vorliegt. Fehlt die Wiederherstellung von ATP aus ADP kommt es zur Rigor mortis – der Totenstarre. Der Querbrückenzyklus dauert 10 - 100 msec (Berg et al. 2009).

Die Muskelfaser verfügt jedoch nur über einen ATP-Energie-Vorrat, welcher etwa 2 - 3 sec hält (Keul et al. 1969). Essentiell ist daher die ständige Resynthese von ATP, wobei Kreatinphosphat genutzt wird. Diese chemische und energiereiche Verbindung befindet sich in der Muskelfaser und kann jederzeit gespalten werden, um aus ADP und einem Phosphat wieder ATP herzustellen:

ADP + Kreatinphosphat \leftrightarrow ATP + Kreatin

9

Das Kreatinphosphat liefert schnell Energie und versorgt die Muskelfaser circa 10 sec lang bis andere Energielieferanten hinzugezogen werden müssen. Als nächste Energiequellen zur ATP-Synthese werden die Blutglukose sowie das muskuläre und hepatische Glykogen verwendet. Das Glykogen ist ein polysaccharider Energiespeicher, welcher bei Bedarf in Glukoseeinheiten aufgespalten werden kann (Klinke et al. 2005). Dieser Vorrat reicht zur Versorgung etwa für eine Belastungsdauer von 50 – 90 min (Keul et al. 1969). Eine mehrere Stunden dauernde körperliche und muskuläre Belastung wird schließlich energetisch mit der Oxidation von Fetten versorgt. Nur im Falle einer extremen Ausdauerbelastung werden körpereigene Proteine zur Energieversorgung abgebaut.

2.1.2 Muskelfasertypen und Klassifikationen

Skelettmuskulatur wird in mehrere Klassen eingeteilt. Die erste Einteilung wurde von Ranvier (1873) beschrieben. Er diskrepierte rote Muskulatur von weißer durch die bessere Kapillarisierung und den höheren Gehalt an Myoglobin und Mitochondrien. Des Weiteren wurde der roten Muskulatur, im Gegensatz zur weißen, langsam-kontrahierende und langsam-ermüdende Eigenschaften zugeschrieben (Gauthier und Padykula 1966). Diese Einteilung wird allerdings nur wenigen Muskeln gerecht, z.B. den äußeren Augenmuskeln (weiße Muskulatur) und den Soleus-Wadenmuskeln (rote Muskulatur) (Deetjen et al. 2004). Andere Skelettmuskeln wie die Gastrocnemius-Wadenmuskulatur und Tibialis-anterior-Muskulatur bestehen aus verschiedenen Anteilen roter und weißer Muskulatur und können nicht morphologisch eindeutig zugeordnet werden (Staron et al. 1999). Edgerton und Simpson (1969) konnten zusätzlich eine intermediäre Muskulatur erkennen, die weder der roten noch der weißen zugeordnet werden kann und dem Konzept einer Zwei-Fasern-Aufteilung widersprach. Daher ist eine umfassendere Einteilung notwendig. Unterschiede bezüglich der Anteile der verschiedenen Muskulaturarten gibt es zwischen verschiedenen Säugetierarten und auch zwischen einzelnen Individuen (Ariano et al. 1973).

Je nach Fokus kann Skelettmuskulatur - neben der geschilderten morphologischen Einteilung - nach metabolischen Kriterien oder nach mATPasen-Aktivität eingeteilt werden (Schneider 1999). Betrachtet man die metabolischen Eigenschaften, so kann man die Muskelfasern in *fast-glycolytic* (schnell glykolytisch), *fast-oxidative-glycolytic* (intermediär)

und *slow-oxidative* (langsam oxidativ) einteilen (Dubowitz und Pearse 1960; Romanul 1964; Barnard und Peter 1971; Peter et al. 1972). Die Nomenklatur gibt an, wie die Kontraktionsgeschwindigkeit einer Muskelfaser ist und welche Art der Energiegewinnung sie betreibt.

Schnelle glykolytische Fasern gewinnen Energie durch anaerobe Glykogenverbrennung, wohingegen intermediäre Fasern durch aerobe und anaerobe Energiebereitstellung und oxidative Fasern hauptsächlich durch aerobe Fettoxidation ihre Energie beziehen (Barnard und Peter 1971).

Die ATPasen-Aktivität korreliert mit der Kontraktionsgeschwindigkeit der Fasern (Bottinelli *et al.* 1994), d.h. je höher die mATPasen-Aktivität ist, desto schneller ist die Kontraktion der Muskelfaser. Die Klassifikation nach der mATPasen-Aktivtät teilt die Muskelfasern nach aufsteigender Geschwindigkeit in Typ I, Typ IIA und Typ IIB ein (Brooke und Kaiser 1970; Lutz et al. 1979; Pette und Staron 1990; Pette 2002). Die Muskelfasertypen sind direkt auf ihre schwere-Myosinketten-Isoform (MHC-Isoform) zurückzuführen. Das heißt entsprechend, dass Typ I auch die Myosin-Isoform MHCI, Typ IIA demnach MHCIIa und Typ IIB MHCIIb hat (Schneider 1999). Tatsächlich wurden noch weitere Fasertypen und sogar Hybrid-Fasertypen erkannt (Billeter et al. 1980; Pette und Staron 1990; Schneider 1999), die in ihren Eigenschaften, wie Energiegewinnung und mATPasen-Aktivität, zwischen den Faser-Typen I und IIB anzuordnen sind. Da etwaige Zwischenformen nicht konstant im Muskel der Ratte vorkommen und ihre Klassifizierung sehr komplex ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Bestimmung verzichtet.

Unterschiedliche Nomenklaturen der verschiedenen Muskelfasern werden in der Tabelle 2 dargestellt. Für diese Arbeit soll als einheitliche Nomenklatur die metabolische Einteilung mit oxidativen, intermediären und glykolytischen Fasern dienen.

 Tabelle 2: Unterschiedliche Nomenklaturen der verschiedenen Muskelfasertypen

 (modifiziert nach Barnard und Peter 1971, Schneider 1999, Deetjen et al. 2004)

Oxidativ	Intermediär	Glykolytisch
Тур I	Тур IIA	Тур IIB
Slow-twitch	Fast-twitch	Fast-twitch
Langsamzuckend	Schnellzuckend	Schnellzuckend
Slow-oxidative	Fast-oxidative-glycolytic	Fast-glycolytic

2.1.3 Fasertypanteile in verschiedenen Muskeln

In der vorliegenden Studie wurden drei verschiedene Skelettmuskeln der Ratte für die Untersuchungen verwendet. Die Auswahl dieser Muskeln wird im Folgenden ausführlich begründet:

Skelettmuskulatur hat je nach Aufgabe im Körper individuelle Fasertypanteile. Dient der Muskel eher zur Halte- und Standarbeit, ist der Anteil an langsam-zuckenden und langsamermüdenden Fasern hoch. Wird der Muskel für starke aber kurzdauernde Leistung verwendet, ist hingegen der Anteil an schnell-zuckenden und schnell-ermüdenden Fasern höher.

Ariano et al. (1973), Kobori und Yamamuro (1989) und Wigston und English (1992) haben gezeigt, dass der Anteil an oxidativen Fasern im M. soleus der Ratte am höchsten ist. So hat der Wadenmuskel bis zu 95 % langsamzuckende oxidative Fasern und nur vergleichsweise wenige intermediäre Fasern (5 %). Dies macht den M. soleus zu einem geeigneten Untersuchungsmuskel, um Veränderungen der oxidativen Fasern am behandelten Versuchstier zu erfassen.

Dem gegenüber hat der M. gastrocnemius unterschiedliche Faseranteile. Er besitzt nur wenige oxidative Fasern (bis zu 5 %), dafür jedoch hauptsächlich glykolytische (bis zu 60 %)

und intermediäre (bis zu 40 %) Fasern (Ariano et al. 1973). Bei diesem Muskel können die schnellen Fasern des Versuchstieres entsprechend gut untersucht werden.

Der M. longissimus der Ratte enthält ebenfalls wie der M. gastrocnemius alle drei Muskelfasertypen und auch hauptsächlich glykolytische Fasern (Schwartz-Giblin et al. 1983; Morales-Lopez et al. 1990). Die Rückenmuskulatur steht direkt mit der Wirbelsäule in Verbindung und dient der Haltung und Bewegung. Da die Wirbelsäule ein bedeutender Ort der Osteoporoseentstehung ist (Bartl 2010), hat der M. longissimus eine wichtige Funktion als Stabilisator des Stützapparats und kann so Wirbelkörperfrakturen entgegenwirken. Eine Stärkung der Rückenmuskulatur ist daher sinnvoll in der Behandlung der Osteoporose. Um die Effekte der verschiedenen Behandlungen dieser Studie auf die Rückenmuskulatur hin zu untersuchen, wurde der M. longissimus für die Untersuchung ausgewählt.

2.2 Veränderungen in der Postmenopause

Die Postmenopause markiert den Zeitraum ab einem Jahr nach der letzten Periode der Frau, der sogenannten Menopause (Goerke et al. 2012). Ursächlich für die Wechseljahre ist eine Erschöpfung der Ovarialfunktion mit einem graduellen Absinken der weiblichen Sexualhormone Östrogen und Gestagen. Die Hypothalamus- und Hypophysenhormone (Gonadotropin-Releasing-Hormon, Follikel-stimulierendes-Hormon und luteinisierendes Hormon) werden weiterhin ausgeschüttet, das Ovar spricht jedoch nicht mehr darauf an. Die weiblichen Sexualhormone werden aus Cholesterin gebildet und sind lipophil (Königshoff und Brandenburger 2012). Aus dem Cholesterin wird zuerst Pregnenolon geformt, daraus dann Progesteron, welches zu Androstendion weitergebildet werden kann. Androstendion kann sowohl zu Testosteron, dem männlichen Sexualhormon, als auch zu Östradiol und Östron durch einen Aromatase-Komplex umgewandelt werden. Die Sexualhormone der Frau werden im Ovar und zu einem kleinen Teil auch in der Nebennierenrinde gebildet. Zusätzlich zu den weiblichen Hormonen (Östrogene und Progesteron) besitzt die Frau auch einen geringen Anteil an männlichen Sexualhormonen (Androgene) (Königshoff und Brandenburger 2012). Östrogene und Gestagene haben multiple Funktionen. Neben der Induktion der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale, der Zyklusregulation und der

Schwangerschaftsregulation, wirken die Hormone auch anabol auf den Proteinmetabolismus (Goerke et al. 2012) und auf den Knochenstoffwechsel (Bartl 2010).

Typische Symptome der Postmenopause sind vasomotorische Beschwerden wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche, neurovegetative Beschwerden wie Kopfschmerzen, und Schwächegefühl, psychomotorische Beschwerden wie Müdigkeit, Schwindel Schlaflosigkeit, Nervosität und Depression sowie Osteoporose, Gewichtszunahme und eine Atrophie der Vulva- und Vaginalschleimhaut. Des Weiteren hat der Abfall der Sexualhormone einen Einfluss auf die Skelettmuskulatur. Diese ist im Besitz von Östrogenrezeptoren, wie es auch andere Zielorgane wie Uterus und Mammae sind (Gruber et al. 1982) und werden in der Postmenopause nicht mehr stimuliert. Kobori und Yamamuro (1989), Kadi et al. (2002) und McCormick et al. (2004) haben gezeigt, dass ein Östrogenmangel verschiedene Effekte auf den Muskel der Ratte hat. Nach Ovariektomie nimmt der Durchmesser bei allen drei Muskelfasertypen zu (Kobori und Yamamuro 1989). Des Weiteren zeigt der M. soleus nach Ovariektomie eine Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit (McCormick et al. 2004) und einen Shift von schnellen zu langsamen MHC-Isoformen (Typ IIA zu I) bei Abwesenheit von Trainingseinheiten (Kadi et al. 2002). Dies bedeutet, dass ein Östrogenmangel kontraktile Eigenschaften des Muskels verändern kann.

2.3 Sarkopenie und Osteoporose

Es wird beschrieben, dass die altersbedingte Sarkopenie, die Abnahme an Muskelmasse, multifaktoriell bedingt ist (Roubenoff und Hughes 2000). Neben der fehlenden anabolen Wirkung des Östrogens entfallen auch andere Stimuli auf die Muskulatur im Alter. Ein Mangel an Testosteron, Wachstumshormonen, Insulin, Nährstoffen, eine unzureichende Proteinaufnahme und eine dezimierte Aktivität führen zu einer Abnahme der Muskulatur. Roubenoff und Hughes (2000) räumen jedoch den Sexualhormonen die größte Bedeutung als Stimulus ein. Die Sarkopenie, welche sich mit Kraftlosigkeit und fakultativer Gewichtsabnahme äußern kann, wird nach der "European Working Group on Sarcopenia in Older People" (EWGSOP) (Cruz-Jentoft et al. 2010) wie folgt definiert:

- Erniedrigte Muskelmasse mit mehr als zwei Standardabweichungen unter dem Mittelwert einer gesunden jungen Referenzgruppe gleichen Geschlechts, gemessen mit DEXA (Dual-Röntgen-Absorptiometrie) oder Bioimpendanzanalyse
- Erniedrigte Ganggeschwindigkeit mit weniger als 0,8 m/s
- Objektive Handkraftmessung mit JAMAR Dynamometer, Werte im unteren Fünftel der Normwerttabelle

Die Sarkopenie ist eine weitverbreitete und häufige Erscheinung. Bei beiden Geschlechtern sind 5 - 13 % aller 60- bis 70-Jährigen und bis zu 50 % aller über 80-Jährigen betroffen (Cruz-Jentoft et al. 2010). Schon ab dem 50. Lebensjahr nimmt die Muskelmasse stetig um 1 - 2 % jährlich ab. Die Folge der Sarkopenie ist, dass die motorischen Fähigkeiten abnehmen und dies wiederum zu einem erhöhten Sturzrisiko führt. Da die Osteoporose beim älteren Menschen ebenso eine weitverbreitete und häufige Krankheit ist und den Knochen brüchig macht, führt die erhöhte Sturzgefahr bei der Sarkopenie folglich zu einem erhöhten Frakturrisiko und damit zu einer erhöhten Mortalität (Cruz-Jentoft et al. 2010). Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, bei der die Knochenmasse abnimmt und die Mikroarchitektur des Knochengewebes sich verschlechtert, was mit einem konsekutiven Anstieg des Frakturrisikos einhergeht (Bartl 2010). In 2009 waren 6,3 Mio. Deutsche von der Osteoporose betroffen (Hadji et al. 2013). Die häufigste Fraktur bei der postmenopausalen Osteoporose ist die Wirbelkörperfraktur, bei der senilen Osteoporose die distale Radius- und die Schenkelhalsfraktur (Goerke et al. 2012). Eine manifeste Osteoporose wird dann festgestellt, wenn vom Patientenknochen der T-Score im Densitometriebefund mehr als 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert gesunder junger Erwachsener liegt.

Die ungünstige Kombination eines geschwächten Muskelapparats mit eingeschränkter Halteund Stützfunktion und unsicherem Gang sowie einer durch Osteoporose verminderten Knochenstabilität kann zu folgenreichen Knochenbrüchen führen. Novotny et al. (2015) beschreiben das Zusammenspiel von Muskel und Knochen, wobei sie anführen, dass der Muskel den Knochen ebenso wie der Knochen den Muskel stark beeinflusst. Auch Tarantino et al. (2015) erklären, dass die Sarkopenie und die Osteoporose eng miteinander verbunden sind und zusammen zu einer verringerten Mobilität und einem erhöhten Frakturrisiko führen. Wird der Muskel trainiert, so wird der Knochen geschützt und gestärkt, da die Zugkräfte, die beim Muskeltraining über die Sehnen auf den Knochen wirken, den Knochenaufbau aktivieren (Bartl 2010). Diese Einsicht ist sehr wichtig in der heutigen Osteoporosebehandlung. Neben den medikamentösen und alimentären Behandlungsmethoden ist die Aktivitätsförderung und das Muskeltraining unabdingbar in der Therapie der Osteoporose (Herold 2014).

2.4 Osteoporosetherapien - Effekte auf den Muskel

2.4.1 Vertikale Ganzkörpervibrationstherapie

Dass körperliche Aktivität und Muskelkrafttraining einen positiven Effekt auf Knochenstärke und Muskelkraft haben und so ein Teil der Osteoporosetherapien sind, haben mehrere Untersuchungen zeigen können (Verschueren et al. 2004; Bautmans et al. 2005; Bogaerts et al. 2007; Garman et al. 2007; Xie et al. 2008). Kadi et al. (2002) konnten am Rattenmodell beweisen, dass Muskeltraining die muskulären Veränderungen, die auf eine Ovariektomie folgen und somit durch Östrogenmangel ausgelöst werden, teilweise aufhalten und in Kombination mit Östrogenersatztherapie sogar ganz verhindern kann. Die besagte Studie ließ die Ratten jedoch an freiwilliger Aktivität teilhaben (Laufrad), welches zur Folge hatte, dass nicht alle Ratten gleichmäßig dem Training ausgesetzt waren. Kadi et al. (2002) zeigten zudem, dass ovariektomierte Ratten weniger aktiv sind als nicht-östrogen-deprivierte Ratten und deswegen weniger Muskeln trainierten. Daher fiel in dieser Studie der Entschluss, die Versuchstiere einem passiven Training auszusetzten, um für alle Tiere gleiche Trainingsbedingungen zu gewährleisten.

Ganzkörpervibrationstraining bedeutet, dass der Körper im Ganzen den mechanischen Schwingungen der Vibration ausgesetzt ist. Die Vibration aktiviert Rezeptoren in der Haut, in den Sehnen und im Muskel, und es kommt zu einem sogenannten "tonischen Vibrationsreflex". Die Muskeln werden hierbei nacheinander an- und wieder entspannt, und es kommt zu unwillkürlichen Muskelkontraktionen, die auch den Knochen mechanisch beanspruchen (Stuermer et al. 2010b). Rubin et al. (2006) und Xie et al. (2008) konnten zeigen, dass mechanische Signale mit niedriger Amplitude und hoher Frequenz anabol auf das muskuloskelettale System wirken. Zudem zeigte Kaeding (2009), dass Vibrationstraining einen guten Einfluss auf die Muskelkraft bei bereits bestehender Sarkopenie hat.

Der bedeutende Vorteil einer passiven Vibrationstherapie ist die Anwendbarkeit an immobilen, gehbehinderten, kranken und sturzgefährdeten Menschen. Ein weiterer Vorteil ist das Fehlen von Nebenwirkungen, die häufig ein Problem bei medikamentösen und invasiven Behandlungstherapien sind.

Ganzkörpervibrationstherapie kann unterschiedliche Parameter in Bezug auf Frequenz, Amplitude, Ausrichtung und Schwingungsform aufweisen. So gibt es beispielsweise eine vertikale und horizontale Ausrichtung mit hoher und niedriger Frequenz. Komrakova et al. (2013) untersuchten die Effekte unterschiedlicher Vibrationsparameter auf das muskuloskelettale System. Sie fanden heraus, dass eine vertikale Ganzkörpervibrationstherapie bei einer Frequenz von 35 und 50 Hz die besten Ergebnisse hinsichtlich der Knochenstärke, der Knochenmasse, der Frakturheilung und des Muskelgewichts erzielte. Als Ergebnis der genannten Studie wurde eine Frequenz von 35 Hz in vertikaler Ausrichtung mit einer Amplitude von 0,5 mm als Optimum bestimmt.

Zusätzlich zur Stärkung des Muskels und des Knochens fördert Vibrationstraining den Blutfluss in peripherem Gewebe und die Oxygenierung des Muskels (Games et al. 2015). Kaneguchi et al. (2014) fanden heraus, dass Ganzkörpervibrationstraining bei atrophiertem murinen Muskel die Mikrozirkulation positiv beeinflusst. Angiogenese, die Neubildung von Kapillaren, wird wahrscheinlich durch veränderte Aktivität und einen erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen beeinflusst (Egginton 2011). Die Angiogenese ist aber je nach Muskelfasertyp heterogen: bei glykolytischen Fasern führt eher schnelle und starke Belastung und bei oxidativen Fasern eher Ausdauertraining zu einer Kapillarneubildung. Beeinflusst wird die Angiogenese durch Scherkräfte und Muskeldehnung und konsekutiver Ausschüttung von Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Egginton 2011). Durch die entstehende Muskelaktivierung bei Ganzkörpervibrationstraining erhofft man sich eine Erhöhung der Kapillardichte (Kapillar-zu-Faser-Verhältnis) im zu untersuchenden Muskel mit einer daraufhin verbesserten Nährstoff- und Sauerstoffversorgung. Die Vibrationstherapie soll den Effekten des Östrogenmangels am Muskel entgegenwirken.

2.4.2 Alendronat

Alendronat, die Salzform der Alendronsäure, gehört zur Medikamentengruppe der Bisphosphonate, zu der auch Risedronat, Ibandronat und Zoledronat gehören. Bisphosphonate werden zur First-line-Therapie der Osteoporose genutzt und haben eine sehr gut belegte fraktursenkende Wirkung mit Evidenzgrad A (DVO-Leitlinie 2014). Alendronat wirkt am Knochen antiresorptiv, indem es die Osteoklasten hemmt. Osteoklasten sind Zellen in der Knochensubstanz, die den Knochen abbauen. Dem gegenübergestellt sind Osteoblasten Zellen, welche die Knochensubstanz aufbauen. Diese beiden Zellgruppen liegen normalerweise in einem balancierten Gleichgewicht mit einem stetigen Knochenaufbau und -abbau. Beim osteoporotischen Knochen überwiegt der abbauende Anteil (Kalu 1991; Bartl 2010). Unter einer Bisphosphonattherapie wird die Aktivität der Osteoblasten reduziert, sodass sich die Knochenmasse und -dichte zunimmt (Bartl 2010). Alendronat wird üblicherweise in einer Dosierung von 10 mg / d oder 1 x 70 mg / Woche verabreicht (Ruß 2014).

2.4.3 8-Prenylnaringenin

Heutzutage besteht ein großes Interesse an Phytoöstrogenen, die menopausale Beschwerden, welche durch Östrogenmangel entstehen, lindern sollen (Seidlova-Wuttke et al. 2013). Viele Forschungsarbeiten befassen sich mit den Wirkungen und Nebenwirkungen von pflanzlichen Östrogenen und deren Sicherheit beim Einsatz am Menschen (Chen und Liu 2014; Durazzo et al. 2014; Girardi et al. 2014; Jaroenporn et al. 2014; Messina 2014 etc.). Da die Hormonersatztherapie mit weiblichen Sexualhormonen während der Postmenopause ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, Blutgerinnsel und ein minimal erhöhtes Risiko für Mammakarzinom aufweist (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators 2002), ist das Interesse an Phytoöstrogenen, die ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen, hoch (Bedell et al. 2014). Phytoöstrogene, welche eine östrogene Wirkung aufweisen, aber keine Risiken einer Hormonersatztherapie mitbringen, sind als Alternative sehr gefragt (Velders und Diel 2013; Poluzzi et al. 2014; Wuttke et al. 2014). Historisch wurden schon lange Phytoöstrogene zur Beschwerdelinderung von vasomotorischen Beschwerden wie Hitzewallungen benutzt, vor allem Isoflavonoide aus Sojabohnen, Rotklee, Mönchspfeffer und Cemciifuga racemosa (Goerke et al. 2012).

Der Hopfen (*Humulus lupulus L.*), aus dem auch Bier hergestellt wird, beinhaltet verschiedene Flavonoide - eine Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe. Darunter enthält es das Xanthohumol, welches im Bierbrauungsprozess zu Isoxanthohumol durch Ringbildung verwertet wird (Stevens und Page 2004). Isoxanthohumol wird nach Konsumierung im Verdauungstrakt durch Bakterien, sowie nach Aufnahme in die Blutbahn in der Leber durch CYP450-Enzyme zu 8-Prenylnaringenin (8-PN) demethyliert (Guo et al. 2006; Bolca et al. 2007). Die folgende Abbildung zeigt die drei Strukturformen der genannten Substanzen.



Abbildung 4: chemische Strukturformeln von Xanthohumol (A), Isoxanthohumol (B) und 8-Prenylnaringenin (C) (aus Guo *et al.* 2006, mit freundlicher Genehmigung des Mitautors von Richard B. van Breemen)

8-PN kann also im Sinne eines Pro-Drugs als Isoxanthohumol aufgenommen werden oder als prenylierte Endwirkform. 8-PN ist das stärkste Phytoöstrogen, welches bis dato bekannt ist (Chen et al. 2014b; Luo et al. 2014; Żołnierczyk et al. 2015). Es wirkt effektiver auf den Knochen als die klassischen Phytoöstrogene Genistein und Daidzein, hat jedoch eine geringere Wirkung als das Hormon Östrogen (Luo et al. 2014). 8-PN stimuliert eher den ER- α als den ER- β -Rezeptor (Luo et al. 2014). Dem 8-PN können verschiedene positive Effekte zugeschrieben werden. Es wirkt antiproliferativ gegen einige Krebszelllinien (Prostatakrebs, Nierenzellkarzinom) (Busch et al. 2015), es lindert Hitzewallungen der Postmenopause besser als ein Placebomedikament (Erkkola et al. 2010), es stimuliert die Angiogenese in der Wundheilung (Negrão et al. 2010) und es hat eine bedeutende Wirkung bei der Drosselung der Inaktivitätsmuskelatrophie (Mukai et al. 2012). Mukai et al. (2012) zeigten, dass sich 8-PN intramuskulär anreichert, und an einem Mausmodell zeigte sich, dass sich die Muskelatrophie am denervierten M. gastrocnemius durch die orale Einnahme von 8-PN verringern ließ. Die Muskelmasse unterschied sich signifikant zwischen der Gruppe ohne 8-PN-Einnahme und der mit 8-PN-Einnahme. Zudem reduziert 8-PN den Verlust an Knochenmasse nach Ovariektomie an Ratten in ähnlicher Weise wie 17β-Estradiol, hat dementsprechend eine positive Wirkung auf den osteoporotischen Knochen in der Postmenopause, jedoch im Vergleich eine geringere trophische Wirkung auf Uterus und Endometrium (Hümpel et al. 2005). Einen weiteren Vorteil gegenüber 17β-Estradiol zeigte eine Studie von Helle et al. (2014). Hierbei hatte 8-PN eine weniger starke proliferative Wirkung auf die Milchdrüsen und -gänge als das Östrogen, woraus gefolgert werden kann, dass es wahrscheinlich weniger brustkrebserregend ist.

2.5 Die Ratte als Versuchsmodell

Bevor Therapiemethoden am Menschen getestet werden können, bedarf es einer vorgeschalteten Studie an Versuchstieren, welche die Sicherheit und die Effektivität einer Testsubstanz beziehungsweise Therapie feststellen (Thompson et al. 1995). Kalu (1991) und Turner et al. (2001) haben gezeigt, dass die Ratte (Rattus rattus) als Versuchstier zur Osteoporoseforschung sehr gut geeignet ist. Als Tiermodell hat sie nach Ovariektomie sehr ähnliche Eigenschaften im Knochenumsatz und in der Knochenstruktur wie postmenopausale Frauen. Sehmisch et al. (2015) konnten zeigen, dass Ratten acht Wochen nach Ovarienentfernung substanzielle Osteoporose unter Östrogenmangel entwickelten. Osteoporosetherapien wie Östrogene, Parathormon, Tamoxifen, Bisphosphonate, Calcitonin und Muskeltraining können erfolgreich an Ratten getestet werden und auf den Menschen übertragen werden. Auch werden Forschungen am Muskel häufig an der Ratte durchgeführt (Kadi et al. 2002; Pette 2002; Komrakova et al. 2013). Daher ist die Ratte auch in dieser Studie ein geeignetes Versuchstier für die Analysen der Effekte der ausgewählten Therapiemaßnahmen.

2.6 Ziele und Fragestellung

In dieser Studie gilt es herauszufinden, welchen Einfluss die ausgewählten Osteoporosebehandlungen - vertikale Ganzkörpervibration, Alendronat und 8-Prenylnaringenin - und deren Kombinationen (Vibration und Alendronat beziehungsweise Vibration und 8-PN) auf die Skelettmuskulatur der ovariektomierten Ratte haben. Dabei wurden folgende Parameter untersucht: Körper- und Muskelgewicht, Faserfläche und -durchmesser der verschiedenen Fasertypen und die Kapillardichte der Muskeln.

Die Ganzkörpervibration als Osteoporosetherapie zur Knochen- und Muskelstärkung wurde schon in mehreren Studien am Rattenmodell untersucht, doch jeweils mit unterschiedlichen Frequenzen und kürzeren Behandlungszeiträumen (Flieger et al. 1998; Stuermer et al. 2010b; Komrakova et al. 2013; Chen et al. 2014a). In dieser Studie soll ein intensiviertes Vibrationsregime mit einem Behandlungsintervall von 10 Wochen bei einer Frequenz von 35 Hz angewandt werden. Dabei soll der Effekt der Vibration auf den Muskel der ovariektomierten Ratte untersucht werden.

Als oft eingesetztes Osteoporosemedikament ist die Wirkung von Alendronat auf den Knochen gut erforscht. Interessant für diese Studie ist jedoch, welche Effekte Alendronat auf den Muskel hat. Widrick et al. (2007) konnten keine veränderte Muskelkontraktilität am Rattenmodell nach Alendronatgabe erkennen. Es bleibt jedoch offen, ob Alendronat auf andere Muskelparameter einen Effekt ausübt. Hat es einen synergistisch stärkenden Einfluss auf die Muskulatur wie es auf den Knochen hat, verändert es die Muskelmasse, die Muskelfaserflächen und -durchmesser, die Kapillardichte im Muskel oder hat es keinen beziehungsweise einen negativen Effekt auf diese Parameter? Dies soll in dieser Studie untersucht werden. Zudem soll auch erforscht werden, inwieweit die Kombination aus Alendronat und Ganzkörpervibrationstherapie einen Effekt auf den Muskel ausübt.

Hinsichtlich der Vorteile des 8-PNs gegenüber der klassischen Hormonersatztherapie und der guten Wirksamkeit auf verschiedene Organe im Körper rückt das Phytoöstrogen in den Vordergrund zur Therapie von postmenopausalen Beschwerden. Allerdings bleiben noch offene Fragen bestehen. So muss geklärt werden, welche Effekte 8-PN auf die Muskulatur ebenfalls im Sinne der Muskelfaserflächen und -durchmesser, der Kapillardichte und des Muskelgewichts ausübt. Es gilt auch herauszufinden, welchen Einfluss 8-PN in Kombination mit Ganzkörpervibration auf die Skelettmuskulatur der Ratte hat.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsablauf

Die Bezirksregierung Braunschweig erteilte die Genehmigung für die Tierversuche in dieser Forschungsarbeit (Aktenzeichen G854.12).

Es wurden für den Versuch 90 Sprague-Dawley-Ratten (*Rattus norvegicus*) in sieben Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 3). Nachdem die Versuchstiere nach ihrer Anlieferung fünf Tage Zeit zur Akklimatisierung hatten, wurden sechs Gruppen, die Gruppe NON-OVX wurde intakt gelassen, bei einem Alter von 12 Wochen ovariektomiert (OVX). Während dieses Eingriffs verstarben drei der Ratten aufgrund von Narkose- und Operationskomplikationen, woraufhin das Gesamtkollektiv nur noch aus 87 Versuchstieren bestand. Fünf Wochen nach der Ovariektomie wurden die Tiere in Behandlungsgruppen aufgeteilt und mit Vibration (VIB), Alendronat oder 8-Prenylnaringenin (8-PN) allein oder in Kombination für insgesamt zehn Wochen behandelt (siehe Kapitel 2.4 für eine genaue Beschreibung der Behandlungen).

Versuchsgruppe (Abkürzung)	Versuchsgruppe	Anzahl Ratten
NON-OVX	intakt/ nicht ovariektomiert	11
OVX	ovariektomiert	11
OVX + VIB	ovariektomiert + Vibration	11
Alendronat	ovariektomiert + Alendronat	13
Alendronat + VIB	ovariektomiert + Alendronat + Vibration	11
8-PN	ovariektomiert + 8-Prenylnaringenin	11
8-PN + VIB	ovariektomiert + 8-Prenylnaringenin + Vibration	12

Tabelle 3: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen mit endgültiger Anzahl

Nach den ersten vier Wochen Behandlung wurden die Ratten einer Osteotomie innerhalb der Tibiametaphyse und einer darauf folgenden Osteosynthese unterzogen. Bei diesem Eingriff verstarben weitere sieben Ratten als Folge der unmittelbaren perioperativen Komplikationen, wodurch das Gesamtkollektiv auf 80 Tiere fiel.

Zusätzlich wurden den Tieren, um den Knochenumbauprozess nachvollziehen zu können, während der Versuchszeit verschiedene Farbstoffe in unterschiedlichen Phasen der Frakturheilung injiziert, welche in die Knochensubstanz mit eingebaut wurden. Bei diesem Vorgehen handelt es sich um das Prinzip der polychromen Sequenzmarkierung in Anlehnung an Rahn (1976) und wird im Kapitel 3.6 weiter aufgeführt.

Nach weiteren sechs Wochen der Behandlung wurden die Ratten getötet, obduziert und zur weiteren Untersuchung verschiedener Knochen und Muskeln freigegeben. Die Muskeln wurden präpariert, geschnitten, gefärbt, mikroskopiert und ausgewertet.

Abbildung 5 verdeutlicht den Aufbau des Versuchs und gibt einen Überblick über die durchgeführten Behandlungen.





Vibrationsbehandlung (grün), Alendronatzugabe (gelb), 8-Prenylnaringenin s.c. (orange), Kontrollgruppe ohne Behandlung (keine Farbe), (d: Tage, w: Wochen)

3.2 Versuchstiere

Eigens für den Versuch ausgewählt wurde die Sprague-Dawley-Albinoratte *(Rattus norvegicus)* von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland), welche für ihr ruhiges Wesen und ihre leichte Handhabung bekannt ist (Harlan Laboratories, Inc. 2013) und somit eine geeignete Rattenart ist. Die 90 gelieferten Ratten waren weiblich und zu Versuchsbeginn drei Monate alt und im Durchschnitt 260 g schwer (234 g - 292 g). Gewogen wurden die Tiere wöchentlich. Gehalten wurden die Versuchstiere in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen zu jeweils vier oder fünf Tieren in einem Käfig vom Typ Makrolon[®] IV (Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg, Deutschland) mit ssniff[®] Bedding Einstreu (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) (s. Abbildung 6).

Die Haltungsbedingungen wurden konstant gehalten, um äußere Einflüsse auf den Experimentaufbau auszuschließen: Die Versuchstiere wurden zusammen in einem Raum bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 %, einer Raumtemperatur von 22 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus im 12-Stunden-Modus mit artifizieller Beleuchtung gehalten. Ernährt wurden die Tiere mit phytoöstrogenarmem, soja- und luzernefreiem Pellet-Trockenfutter der Marke ssniff[®] (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), welches für den angestrebten Versuch mit induziertem Östrogenmangel geeignet war. Leitungswasser wurde *ad libitum* gestellt. Wöchentlich wurde den Ratten 1500 g Futter zur freien Verfügung gestellt und die Restmenge gewogen und notiert. Eine artgerechte Tierhaltung wurde von Veterinären und Tierpflegern während der gesamten Forschungszeit sichergestellt.



Abbildung 6: Haltungskäfige vom Typ Makrolon® IV

3.3 Ovariektomie

76 Ratten des Gesamtkollektivs, die Gruppe NON-OVX war ausgeschlossen, wurden beide Ovarien entfernt, um den Zustand einer Postmenopause künstlich zu erzeugen. Die Tiere wurden randomisiert auf die Operationstage verteilt und dieselbe Zuordnung auch für die späteren Versuchsschritte der Osteotomie und der Obduktion beibehalten. Die Versuchstiere wurden für den operativen Eingriff mit folgenden Maßnahmen vorbereitet:

Für die Narkose wurde eine 3:1-Kombinations-Mischung von zehnprozentigem Ketamin (Medistar[®]; Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland) und Xylazin (Xylariem[®]; Riemser Arzneimittel AG, Greifswald, Deutschland), in einer Dosierung von 0,1 ml/ 100 g Körpergewicht (KG), intraperitoneal injiziert. Die Tiere atmeten während der Narkose eigenständig. Als nächstes wurden die Tiere mit einer Kern[®] Präzisionswaage Modell 440-53 N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) gewogen, wobei sie anschließend nach Gewicht randomisiert in die Versuchsgruppen eingeteilt wurden. Sie wurden subkutan mit einem Iso-Transponder (UNO MICRO-ID Transponder System 0,21 x 12 mm; Uno Roestast-

staal BV, Zevenaar, Niederlande) versehen, welcher mit einem Lesegerät (MiniMax II; Datamars SA, Bedano, Schweiz) zur Kontrolle entziffert werden konnte, um eine Verwechslung unter den Tieren zu vermeiden. Des Weiteren bekamen alle Versuchstiere ein Langzeitantibiotikum (0,25 ml Veracin®-Compositum; Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) sowie ein Langzeitanalgetikum (0,25 ml 1:10-Verdünnung Rimadyl®; Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) injiziert. Um eine Schädigung der Augen durch Austrocknung während der Narkose zu vermeiden, wurde Corneregel® Augengel (Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland) appliziert. Die zu operierenden Areale am Abdomen der Ratte wurden mittels elektrischen Rasierers rasiert und mit Octenisept® Desinfektionsspray (Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingesprüht. Nach abgeschlossener Vorbereitung wurden die Ratten behutsam auf dem Operationstisch auf der Seite liegend positioniert. Der Hautschnitt wurde scharf, etwa einen Zentimeter unterhalb des Rippenbogens, lateral der Wirbelsäule, gesetzt und stumpf präpariert. Anschließend wurden vorsichtig Bindegewebs-, Faszien- und Muskelschicht durchtrennt und aufgespalten sowie das Peritoneum eröffnet. Nach Darstellung der Adnexe und ihrer angrenzenden Strukturen wurde mit Hilfe einer Ligaturklemme das Ovar abgeklemmt und mit Nahtfaden die Gefäße und die Tuba uterina ligiert (siehe Abbildung 7). Anschließend wurden diese mit dem Skalpell abgetrennt und entfernt.



Abbildung 7: Ligatur des murinen Ovars während der Ovariektomie
Der Uterus und das umliegende Bindegewebe wurden behutsam wieder in die Bauchhöhle reponiert. Die Muskelschicht wurde mit Vicryl[®] 4.0 Fäden (Ethicon; Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Haut mit Michel-Klammern (1,2 x 3 mm; Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) chirurgisch verschlossen und anschließend mit Braunol[®] Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Auf der kontralateralen Seite wurde ebenso verfahren.

Postoperativ wurden die Versuchstiere zum Aufwachen auf eine Wärmematte (Astopad[®] OPT 130; Stihler Electronic GmbH, Stuttgart, Deutschland) platziert und mit 3 ml 0,9 %-NaCl-Lösung (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als subkutane Injektion in den Nackenbereich behandelt, um einen eventuellen Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Die Ratten wurden nach dem Eingriff bis zum kompletten Aufwachen beaufsichtigt.

3.4 Behandlung

3.4.1 Vertikale Ganzkörpervibration

Die drei Gruppen OVX + VIB, Alendronat + VIB und 8-PN + VIB wurden mittels Ganzkörpervibration behandelt. Das hierfür verwendete Gerät, der Vibriertisch VTG mit Drehstrom-Vibrationsmotoren und Frequenzumrichter Commander SE (EP Antriebstechnik GmbH, Bruchköbel, Deutschland) mit dazugehöriger Vibrationsschale (siehe Abbildung 8), wurde auf eine Frequenz von 35 Hz mit vertikaler Vibration und einer Amplitude von 0,5 mm eingestellt. Maximal sieben Ratten pro Vibrationsvorgang wurden dabei direkt aus den Haltungskäfigen in die Vibrationsschale versetzt und zu jeweils 15 Minuten, zweimal täglich bei Tageslicht, an fünf Tagen in der Woche in einem Mindestabstand von acht Stunden vibriert. Die Zeit wurde dabei mittels einer Stoppuhr kontrolliert. Während der Vibration war darauf zu achten, dass die Ratten sich nicht überlagerten. Dies hatte zum Ziel, bei allen Versuchstieren eine gleichmäßige Vibration sicherzustellen. Start der Behandlung war fünf Wochen nach der Ovariektomie der Ratten. Die Tiere erhielten diese Vibrationsbehandlung vier Wochen lang und wurden daraufhin osteotomiert. Nach diesem operativen Eingriff wurde eine Pause von fünf Tagen zur Erholung und Wundheilung eingelegt. Im Anschluss an die Osteotomie wurden die Tiere weitere sechs Wochen bis zum Behandlungsende ganzkörpervibriert.



Abbildung 8: Ganzkörpervibration der Versuchstiere in der Vibrationsschale



Abbildung 9: Frequenzumrichter Commander SE, eingestellt auf eine Frequenz von 35 Hz

3.4.2 Alendronat

Zwei Versuchsgruppen (Alendronat und Alendronat + VIB) wurden mit dem Arzneistoff Alendronat (Alendronsäure-ratiopharm[®]; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) behandelt.

Das Alendronat wurde als pulverisierter Zusatzstoff mit einer Konzentration von 10 mg / kg Futter dem sojafreien Futter beigemengt, welches zur Erkennung blau gefärbt wurde, um eine Verwechslung mit dem alendronatfreien Futter zu vermeiden. Die Versuchstiere der beiden Gruppen wurden im selben 10-wöchigen Zeitraum mit Alendronat behandelt, wie die beiden Gruppen 8-PN und 8-PN + VIB mit 8-Prenylnaringenin behandelt wurden. Zu Anfang jeder Woche bekamen die Ratten pro Käfig 1500 g alendronathaltiges Futter. Am Ende der Woche wurde das Restfutter gewogen und notiert und so die oral aufgenommene Alendronatmenge pro Ratte ermittelt.

3.4.3 8-Prenylnaringenin

Die Gruppe 8-PN und die Gruppe 8-PN + VIB bekamen in dem 10-wöchigen Behandlungszeitraum bis zur Tötungswoche den Wirkstoff 8-Prenylnaringenin sieben Mal pro Woche injiziert. Dieses Phytoöstrogen wurde von der Firma Orgentis Chemicals GmbH (Gatersleben, Deutschland) geliefert und wurde bei einer Temperatur von ca. -20 °C im Gefrierfach in 5 ml-Aliquots gelagert. Zur Behandlung wurde die 8-PN-Lösung bei Raumtemperatur aufgetaut und 0,3 ml der Lösung, in 30 %-Hydroxypropyl-ß-Cyclodextrin gelöst, mit einer Gesamtkonzentration von 0,6 mg des Wirkstoffes auf eine Kunststoffspritze mit Kanüle aufgezogen. Die Dosis wurde auf 1,77 mg / kg Körpergewicht berechnet. Die Ratten wurden zur Behandlung einzeln aus ihren Haltungskäfigen entnommen und unter einem Tuch durch eine weitere Hilfsperson gehalten, während das 8-PN subkutan in eine dorsale Hautfalte gespritzt wurde. Nach Beendigung der Behandlung wurde das Versuchstier- zur Vermeidung einer Verwechslung mit einem unbehandelten Individuum- vorübergehend in einen separaten Käfig gesetzt.

3.5 Osteotomie und Osteosynthese

Neun Wochen nach der Ovariektomie wurden bei den Ratten aus allen sieben Gruppen die beiden Tibiae innerhalb der Metaphyse osteotomiert und mit einer Plattenosteosynthese versehen (nach dem etablierten Prinzip von Stuermer et al. 2010a), um später Aufschluss über die Frakturheilung unter den verschiedenen Behandlungen zu geben. Hier wurde prä-, intra- und postoperativ analog der Ovariektomie vorgegangen. Zusätzlich bekamen die Versuchstiere in den zwei auf den Eingriff folgenden Tagen 4 mg/kg KG von dem Analgetikum Rimadyl[®] (Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) sowie 5 mg/kg KG des Neuroleptikums Decentan[®] (Merk, KgaA, Darmstadt, Deutschland) gespritzt. Die Ergebnisse dieses Versuchsschrittes sind Gegenstand einer anderen Studie und sollen in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

3.6 Polychrome Sequenzmarkierung

Vier verschiedene Fluorochrome wurden dem Versuchstier zur polychromen Sequenzmarkierung (Rahn 1976) der heilenden Knochenfraktur subkutan gespritzt, um die Knochenumbauprozesse nach der erfolgten Osteotomie darzustellen. Die Sequenzmarkierung wurde nach einem bestimmten Schema durchgeführt:

Zwölf Tage postoperativ wurde allen Ratten 90 mg/kg KG XO (Xylenolorange-Tetranatriumsalz), 22 Tage postoperativ 10 mg/kg KG CG (Calzein-Grün), 32 Tage postoperativ 30 mg/kg KG AK (Alizarin-Komplexon) und 42 Tage postoperativ, welches gleichzeitig auch der Tag der Tötung der Versuchstiere war, 25 mg/kg KG TC (Tetrazyklin-Hydrochlorid) gespritzt. Alle Produkte wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Ergebnisse dieser Behandlung sind jedoch Teil einer anderen Studie und werden daher in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.7 Obduktion und Muskelpräparation

Zum Behandlungsende und genau 15 Wochen nach der Ovariektomie wurden alle Versuchstiere unter Kohlenstoffdioxidnarkose durch Dekapitation mittels Guillotine getötet. Nach der Enthauptung wurde sogleich austretendes Blut für Serumuntersuchungen aufgefangen. Der Körper des Versuchstieres wurde auf dem Operationstisch positioniert und relativ zügig wurden die Muskelpräparationen vorgenommen, um postmortale biochemische Gewebeveränderungen durch Zeitverzug zu vermeiden. Die Haut der Hinterbeine und des mittleren Rückens wurde eröffnet, um so Zugang zu den Waden- bzw. Rückenmuskeln zu gewährleisten. Die Musculi gastrocnemici, solei und longissimi (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 11) wurden dargestellt und scharf herausgetrennt. Die beiden Wadenmuskeln (M. gastrocnemius und M. soleus) wurden in ihrer ganzen Form gewogen und die Messdaten für spätere Rechnungen notiert. Der M. longissimus wurde nicht gewogen, da nur ein kleiner Anteil aus der Rückenmuskulatur herausgetrennt wurde. Randomisiert wurde die eine Hälfte der Muskeln zum Zweck enzymatischer Untersuchungen als Teil einer anderen Arbeit in Röhrchen verpackt und mittels flüssigem Stickstoff eingefroren, die drei Muskeln der kontralateralen Seite der Ratte in gepulvertem Talkum (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gewendet und ebenso in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Talkum diente zur Oberflächenvergrößerung, sodass das Einfrieren des einzelnen Muskels gleichmäßiger und schneller vonstatten ging, um so einem möglichen Zellschaden in Form eines Gefrierbrandes mit Eiskristallartefakten, der das spätere histologische Auswerten verkomplizieren würde, entgegenzuwirken (Moline und Glenner 1964). Sobald der Muskel gefroren war, wurde er in vorher vorbereitete Alufolienquadrate verpackt und diese beschriftet, um anschließend bei -70°C in einer Tiefkühltruhe gelagert zu werden. Neben den genannten Muskeln wurden ferner auch Wirbelsäule, Uterus, Tibiae und Femora des Versuchstieres präpariert und für weitere Untersuchungen verwendet.



Abbildung 10: M. gastrocnemius und M. soleus gekennzeichnet am Hinterbein des Versuchstieres (*Rattus norvegicus*) (eigene Darstellung)



Abbildung 11: Schematische Darstellung des M. longissimus beim Versuchstier (Rattus norvegicus) (eigene Darstellung)

3.8 Auswertungsmethoden

3.8.1 Serumanalyse

Das bei der Obduktion gewonnene Blut der Ratten wurde analysiert. Dabei wurde die Serumkonzentration für die Kreatinkinase, ein Muskelmarker, erhoben. Die Kreatinkinase befindet sich in verschiedenen Organen im Körper, zum größten Teil jedoch in der Skelettmuskulatur. Erhöhte Werte dieses Enzyms würden für eine starke und langfristige Muskelbeanspruchung sprechen, da hierbei Kreatinkinasemengen ins Blut gelangen. Normale Werte deuten daraufhin, dass es zu keiner übermäßigen Belastung, Verletzung oder anderen Störung der Muskulatur kam. Die Serumanalyse wurde in der Abteilung für Klinische Chemie in der Universitätsmedizin Göttingen mit Hilfe des Gerätes Architect c16000 Analyzer (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

3.8.2 Muskelschnitte

Für die histologischen Schnitte wurde das Kryostat-Mikrotom Leica CM 1900 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die bei -70 °C gelagerten Muskelpräparate wurden dafür aus der Tiefkühltruhe entnommen und auf -20 °C im Kryostat-Mikrotom aufgewärmt. Die einzelne Muskelprobe wurde mit destilliertem Wasser

auf eine Objektplatte aufgefroren und mit dem Kryo-Messer quer zum Muskelfaserverlauf in 12 µm breite Scheiben geschnitten. Diese wurden daraufhin auf einen Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost Ultra Plus®; Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen und mindesten 45 Minuten an Raumluft und -temperatur getrocknet. Für jede Muskelprobe wurden zwei Objektträger mit jeweils mehreren Schnitten hergestellt: ein Objektträger für die mATPase-Färbung und ein weiterer für die Amylase-PAS-Färbung. Die getrockneten Proben wurden abschließend bis zur histologischen Färbung in beschrifteten Objektträgerkästen bei -20 °C gelagert.

3.8.3 Histologische Färbungen

Die histologischen Färbungen wurden jeweils nach den modifizierten Methoden von Horák (1983) bzw. Andersen (1975) durchgeführt:

- a) Myofibrilläre-ATPase-Färbung kombiniert mit Diaphorase, um die verschiedenen Fasertypen zu markieren
- b) Amylase-PAS-Färbung, um die Kapillaren farbig hervorzuheben.

Die beiden Färbeprotokolle und die Rezepturen für die verwendeten Lösungen sind im Anhang 11.1 -11.4) einsehbar.

3.8.3.1 Myofibrilläre-ATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase

Um die drei Muskelfasertypen oxidativ (*slow-oxidative*), intermediär (*fast-oxidative-glycolytic*) und glykolytisch (*fast-glycolytic*) zu unterscheiden, wurde eine Kombinationsfärbung, modifiziert nach Horák (1983), durchgeführt. Myofibrilläre ATPasen (mATPasen) reagieren unterschiedlich auf saures oder alkalisches Milieu (Brooke und Kaiser 1970). So lässt sich beispielsweise die mATPase der schnellen Muskelfaser (*fast-glycolytic*) bei einer Präinkubation mit einem sauren pH-Wert von 4,2 hemmen. Dies führt dazu, dass die schnelle ATPase folglich nicht mehr anfärbbar ist. Einzig die langsamen oxidativen Typ-I-Fasern werden weiterhin dunkel angefärbt.

Darüber hinaus wurde die Oxidationskapazität der Muskelzellen mittels des Redoxfarbstoffes Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) erfasst. Der Trivialname Diaphorase steht für die NAD(P)H-Dehydrogenase (Petzold 2006), ein Enzym, welches die folgende Redoxreaktion der mitochondrialen Atmungskette katalysiert (Rassow et al. 2012):

NAD(P)H + H⁺ + Akzeptor \leftrightarrow NAD(P)⁺ + reduzierter Akzeptor

Hierbei fungiert das farblose Nitroblau-Tetrazoliumchlorid als artifizieller Akzeptor von zwei Elektronen und zwei Protonen und wird in reduziertem Zustand zu blauem wasserunlöslichen Di-Formazanfarbstoff umgewandelt (Leeuw und Pette 1994). Die Farbintensität ist ein Maß für die Oxidationskapazität der Zelle, da eine größere Menge von dem Akzeptor reduziert wird (Petzold 2006). Folglich besitzen die stark dunkelblau angefärbten oxidativen Fasern die höchste Oxidationskapazität. Die intermediären Fasern besitzen weniger Mitochondrien (Sanchez et al. 2014) und ein niedrigeres Maß an Oxidationskapazität und sind daher weniger intensiv farblich markiert. Die intermediären Fasern sind lichtmikroskopisch mit einem blauen Rand angefärbt (siehe Abbildung 12). Dies passt zu der Annahme, dass die Mitochondrien mit ihren oxidativen Enzymen randständig sind (Novikoff et al. 1961, Hoppeler et al. 1981). Die glykolytischen Fasern sind mitochondrienarm (Sanchez et al. 2014) und daher nur blassblau angefärbt. Durch die Kombinationsfärbung können folglich die drei Fasertypen gut unterschieden werden, da die oxidativen Fasern durch beide Färbungen markiert werden, die intermediären Fasern nur durch die Diaphorasefärbung und die glykolytischen Fasern eigentlich gar nicht angefärbt werden.

3.8.3.2 Amylase-PAS-Färbung

Eine häufig verwendete Darstellung der Kapillaren erfolgt durch die Amylase-PAS-Färbung nach Andersen (1975). Dabei werden die Muskelschnitte nach stattgefundener Fixierung zuerst durch Amylase, ein Kohlehydrat-spaltendes Enzym, angedaut. Dies schafft den Vorteil, dass das muskuläre Glykogen depolimerisiert und damit ausgeschaltet wird. Durch die folgende PAS-Färbung wird es demnach nicht mehr dargestellt und überschattet dementsprechend die Kapillarmarkierung nicht (Junqueira und Carneiro 2013). Die PAS-Reaktion (*Periodic acid-Schiff reaction*) färbt weitere Kohlehydrate wie Mukopolysaccharide, Kollagen, Glyko- und Mukoproteine etc. neben Glykogen an und stellt unter anderem Basalmembranen und Kapillaren dar, welche kollagenreich sind (Cottier 2013). Das angewandte Schiff'sche Reagenz enthält farblose Fuchsinschweflige Säure und wird durch Bindung an Aldehydgruppen, welche im Färbeschritt vorher durch Perjodsäure oxidiert worden sind, farblich pink bzw. magenta-rot (Mulisch und Welsch 2010). Dies markiert die vorhandenen Kapillaren und Basalmembranen (s. Abbildung 14). Überschüssige Farbe wird mit Schwefeldioxidwasser fortgespült. Das Zytoplasma ist hellrosa erkennbar.

3.8.4 Histologische Auswertung

Zur Auswertung der Muskelschnitte wurden die Objektträger mit dem Mikroskop Nikon Eclipse E600 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) unter zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Daraufhin wurde eine geeignete Muskelschnittstelle ausgesucht, auf der die zu untersuchenden Fasern optimal erkennbar waren. Diese wurden mit der eingebauten Kamera Nikon DS-Fi2 (High Definition Color Camera Head; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) fotografiert und in das Softwareprogramm NIS – Elements AR (Advanced Research; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) als digitale .tif-Datei importiert. Mit Hilfe des NIS-Elements AR - Programms konnten so zum Einen die Muskelfasereigenschaften wie Querschnittsfläche und -durchmesser und zum Anderen die Kapillarenanzahl im Verhältnis zur Faseranzahl im Muskel erfasst werden.

Für die Auswertung der Muskelschnitte mit ATPase-Färbung wurden pro Schnitt jeweils drei Ausschnitte an unterschiedlichen Stellen fotografiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass es keinerlei Überschneidungen der Ausschnitte gab und dass die Fasern optimal quergeschnitten und somit die Zellgrenzen gut zu erkennen waren. Nun wurden pro Ausschnitt und pro Fasertyp 30 Zellen ausgewertet.

Beim M. longissimus gibt es drei verschiedene Fasertypen: glykolytisch, intermediär und oxidativ. Dies bedeutet, dass pro Ausschnitt 30 glykolytische, 30 intermediäre und 30 oxidative Zellen ausgewertet wurden und insgesamt alle drei Ausschnitte 270 Zellen ergaben. Die drei verschiedenen Fasertypen wurden folgendermaßen unterschieden (vgl. Abbildung 12):

- glykolytische Fasern vom Typ IIB: sehr hell angefärbte, großflächige Zellen
- intermediäre Fasern vom Typ IIA: etwas kleinere bläuliche Zellen mit dunkelblauem Rand
- oxidative Fasern vom Typ I: schwarze kleine Zellen

Angeordnet sind sie bei der Ratte und auch beim Menschen im sogenannten Schachbrettmuster (Brooke und Kaiser 1970), im Gegensatz zum Schweinemuskel beispielsweise, wo sie nestartig angeordnet sind (Nielsen und Wegener 1997). Beim M. gastrocnemius sind die drei Fasertypen sehr inhomogen vorhanden (Stark 2008). Beim Auswerten der Fasern fiel auf, dass von den oxidativen Fasern zu wenige vertreten waren (< 10 pro Muskelschnitt), als dass ein repräsentatives Auswerten möglich gewesen wäre. Viele Muskelschnitte hatten keine einzige oxidative Faser vorzuweisen. Dies führte zu dem Entschluss, bei allen Ausschnitten des M. gastrocnemius in dieser Arbeit 30 glykolytische und 30 intermediäre Zellen pro Ausschnitt auszuwerten und weiter zu analysieren und die oxidativen Zellen auszuschließen.

Abbildung 12 zeigt einen Ausschnitt vom M. longissimus mit allen drei beschriebenen Fasertypen.



Abbildung 12: Verschiedene Muskelfasertypen im M. longissimus der Ratte (*Rattus norvegicus*) (a – glykolytisch, b – intermediär, c – oxidativ)

Beim M. soleus gibt es hauptsächlich einen vorliegenden Muskelfasertyp, den oxidativen Typ (Ariano *et al.* 1973). Bei diesem Muskel wurden ebenfalls drei Ausschnitte fotografiert (vgl. Abbildung 13) und pro Bild 30 oxidative Fasern, dementsprechend insgesamt 90 Fasern, ausgewertet.



Abbildung 13: Oxidative Muskelfasern im M. soleus der Ratte (Rattus norvegicus)

Die verwendete Software ermöglichte eine manuelle farbige Umrandung der einzelnen Fasern und daraufhin eine automatische Errechnung der Faserquerschnittfläche und des Faserdurchmessers.

Bei der Auswertung der Muskelschnitte mit Kapillarfärbung wurden pro Muskelschnitt jeweils zwei geeignete Stellen mit optimal erkennbaren Faserquerschnitten und angrenzenden quergeschnittenen Kapillaren fotografiert. Ein Beispielausschnitt findet sich in der Abbildung 14, in welchem Basalmembranen und pinkfarbene punktförmige Kapillaren zu erkennen sind. Zunächst wurde ein Rahmen von 0,5 mm x 1 mm, entsprechend einer Fläche von 0,5 mm², auf den Ausschnitt gelegt. Innerhalb des Rahmens galt es, die Anzahl der Kapillaren und die Anzahl aller Fasern zu erfassen. Durch die festgelegte Rahmengröße, welche auf alle Muskelschnitte angewandt wurde, war es möglich einen einheitlichen Vergleich der Verhältnisse der Kapillaren zu den Muskelfasern zu erfassen. Die Entscheidung, zwei Ausschnitte auszuwerten, die zusammen 1 mm² ergaben, lieferte ein genaueres

Vergleichsergebnis. Das Programm ermöglichte ein manuelles Auszählen und speicherte die jeweiligen Daten.



Abbildung 14: Amylase-PAS-Färbung des M. gastrocnemius der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit Darstellung der Kapillaren und Basalmembranen

Sämtliche Ergebnisse der Auswertungen beider Färbungen wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Version 14.0.0, Microsoft Corporation, Redmond, USA) aufgenommen und weiter verarbeitet. Mit den Daten der Kapillarfärbung wurde pro Muskelschnitt das Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern, also die Kapillardichte, nach folgender Formel (Formel 1) errechnet und ebenfalls in der Tabelle notiert:

$$n_{K/F} = \frac{n_K}{n_F} \tag{1}$$

- *n_{K/F}*: Anzahl Kapillaren pro Faser (auf 0,5 mm²)
- n_{K:} Anzahl Kapillaren pro 0,5 mm² Ausschnitt
- n_F: Anzahl Fasern pro 0,5 mm² -Ausschnitt

Dies ergab dann jeweils ein Kapillar-Faser-Verhältnis pro Ausschnitt (0,5 mm²), jedoch zwei Ergebnisse pro Muskel. Mit diesen wurde daraufhin ein Mittelwert der beiden Kapillardichten der Ausschnitte errechnet und sprach daher für eine Fläche von 1 mm² (Formel 2):

$$N_{K/F} = \frac{n_{K/F_1} + n_{K/F_2}}{2}$$
(2)

 $N_{K/F}$:Mittlere Anzahl Kapillaren pro Faser (auf 1 mm²) = Kapillardichte (auf 1 mm²) $n_{K/F1}$:Anzahl Kapillaren pro Faser (auf 0,5 mm²) (Ausschnitt 1) $n_{K/F2}$:Anzahl Kapillaren pro Faser (auf 0,5 mm²) (Ausschnitt 2)

3.8.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Muskelschnitte der beiden Färbungen wurden mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA) statistisch analysiert. Für jede Versuchsgruppe wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet und die Ergebnisse in einem Säulendiagramm oder einer Tabelle zur Veranschaulichung dargestellt. Um den Effekt der unterschiedlichen Behandlungen zu prüfen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt (One-Way ANOVA). Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Varianzanalyse als Signifikanztest sind die Normalverteilung der Residuen innerhalb der Versuchsgruppen sowie die Varianzhomogenität zwischen den Gruppen (Keller 2014). Diese Voraussetzungen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels D'Agostino & Pearson Omnibus Normality-Test (Normalverteilung) und des Bartlett-Tests (Varianzhomogenität) geprüft. Ausführlichere Vergleiche der einzelnen Versuchsgruppen miteinander konnten mit dem Tukey-HSD-post-hoc-Test erreicht werden. Für die Überprüfung des Effektes von Gruppen, deren Messdaten die beschriebenen Voraussetzungen der ANOVA nicht erfüllten, wurde der Kruskal-Wallis-Test für nicht-parametrische Daten sowie der Dunns-post-hoc-Test zur weiteren Analyse verwendet. Für alle verwendeten Signifikanztests wurde ein Signifikanzniveau von α = 0,05 festgelegt.

4 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der in Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen dargelegt werden. Dazu gehören die Körpergewichtskurven der Versuchstiere, die Futteraufnahmedaten über den Versuchszeitraum, die Uterus- und Muskelgewichte, die Serum-Kreatinkinase-Konzentration der Ratten am Versuchsende sowie die Auswertungsergebnisse der beiden Färbungen in Bezug auf Muskel, Fasertyp, Fläche, Durchmesser und Kapillardichte. Letztere auch in Bezug zum Körpergewicht der Ratte. Zur Veranschaulichung sollen Säulen- oder Liniendiagramme dienen. Tabellen werden verwendet, um die Ergebnisse der deskriptiven und schließenden Statistik darzustellen. Bei dem verwendeten Signifikanzniveau von α = 0,05 werden sämtliche Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 werden als signifikant (*), p < 0,01 als hochsignifikant (**) und p < 0,001 als höchstsignifikant (***) gewertet. Folgende Abkürzungen werden zur Markierung der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen benutzt.

- a unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen
- b unterscheidet sich signifikant von NON-OVX
- c unterscheidet sich signifikant von OVX
- d unterscheidet sich signifikant von OVX + VIB
- e unterscheidet sich signifikant von Alendronat
- f unterscheidet sich signifikant von Alendronat + VIB
- g unterscheidet sich signifikant von 8-PN
- h unterscheidet sich signifikant von 8-PN + VIB

4.1 Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme der Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum

Abbildung 15 verdeutlicht anschaulich den Verlauf der Körpergewichtskurven der Versuchstiere unter den unterschiedlichen Behandlungen über einen Zeitraum von 15 Wochen. Eine detaillierte Auflistung einzelner Messwerte sowie grundlegende statistische Kennzahlen der deskriptiven und schließenden Statistik sind der Tabelle 4 im Anhang 11.5 entnehmen.

Zum Zeitpunkt der Ovariektomie gibt es keine signifikanten Unterschiede der Körpergewichte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. In der vierten Woche ist die Kurve der NON-OVX-Gruppe jedoch nicht so steil angestiegen wie die der anderen und der Mittelwert unterscheidet sich höchstsignifikant von allen anderen Gruppen. Zum Zeitpunkt der Osteotomie fällt auf, dass die Gruppe NON-OVX sich von den Gruppen OVX und Alendronat höchstsignifikant, von den Gruppen OVX + VIB und Alendronat + VIB hochsignifikant, von der Gruppe 8-PN + VIB unterscheidet sich jedoch von der Gruppe Alendronat signifikant. Ebenfalls fällt auf, dass das Körpergewicht aller Ratten nach dem Eingriff der Osteotomie sinkt (ab Woche 9), zum Versuchsende hin jedoch wieder ansteigt. Die Unterscheide und Signifikanzen unter den Gruppen sind zum Versuchsende analog zu denen zum Zeitpunkt der Osteotomie. Das zum Zeitpunkt der Obduktion durchschnittliche Versuchstiergewicht lag bei 385 g (308 g - 494 g).

Die Futteraufnahmemenge wurde ab der Woche 1 des Versuches berechnet und ist in ihrem Verlauf aus der Abbildung 16 zu entnehmen. Es ist zu erkennen, dass zu Anfang des Versuches, nach der durchgeführten Ovariektomie, sich die Futteraufnahme zwischen den Versuchsgruppen nur leicht unterscheidet. Erst im Verlauf werden größere Differenzen offensichtlich. Zum Zeitpunkt der zweiten und vierten Woche unterscheiden sich alle Gruppen signifikant von der Gruppe NON-OVX (s. Tabelle 5 im Anhang 11.5). Insgesamt steigen die Futteraufnahmekurven über die erste Versuchswoche an. In der Woche 9, postoperativ der Osteotomie folgend, fallen die Kurven der Futteraufnahme zur Versuchswoche 10 hin stark ab und steigen gleichmäßig zur Woche 11 nach der Erholung der Ratten wieder an, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.



Abbildung 15: Körpergewichtskurven mit Darstellung der Mittelwerte über den Versuchszeitraum von der Ovariektomie (Woche 0) bis zum Versuchsende (Woche 15)



Abbildung 16: Futteraufnahmekurven mit Darstellung der Mittelwerte pro Versuchstier und pro Tag über den Versuchszeitraum Woche 1 bis 15

4.2 Alendronat-Dosisaufnahme

Die Versuchsgruppen Alendronat und Alendronat+VIB nahmen ab der 5. Versuchswoche täglich mit dem Futter Alendronat auf. Die errechnete Menge pro Tier und pro Tag unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden genannten Versuchsgruppen. Die errechnete Aufnahme bestand zu Anfang des Behandlungszeitraums (Woche 5) bei beiden Gruppen pro Tier 0,26 mg / d. Die aufgenommene Alendronatmenge sank nach der 9. Woche hin ab, genau wie die Futteraufnahme auch und war auf die Osteotomie und ihre Folgen zurückzuführen. Die Kurven stiegen ab der 10. Woche wieder an. Die Abbildung 17 zeigt die genannten Alendronataufnahmekurven, im Anhang 11.6 Tabelle 6 finden sich die genauen Werte.





Die mittlere Dosisaufnahme des Wirkstoffes im Verhältnis zum Körpergewicht der Ratten wurde folgendermaßen berechnet:

$$D = \frac{AM}{KG} \tag{1}$$

D: mittlere Alendronat-Dosisaufnahme der Ratten (mg / kg)

AM: mittlere Alendronataufnahme der Ratten (mg)

KG: mittleres Körpergewicht der Ratten (kg)

Die Berechnung der täglichen mittleren Alendronat-Dosisaufnahme ergab für die Gruppe Alendronat 0,59 mg / kg KG und für die Gruppe Alendronat+VIB 0,57 mg / kg KG.

4.3 Uterusgewichte zum Versuchsende

Am Ende des Versuches zur Obduktion wurden alle Rattenuteri gewogen und die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen (s. Abbildung 18 und Tabelle 7 im Anhang 11.7). Alle post-ovariektomierten Ratten besaßen höchstsignifikant kleinere Uteri als die Versuchstiergruppe NON-OVX, welche noch hormonproduzierende Ovarien hatte.



Abbildung 18: Uterusgewichte der Versuchstiere in Gramm (g) bei Versuchsende (Woche 15) (a: unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen; ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))

4.4 Gewichte des M. gastrocnemius und M. soleus zum Versuchsende

Die nach der Tötung entnommenen Gastrocnemici-Muskeln wurden gewogen und die Mittelwerte miteinander verglichen (s. Abbildung 19). Die Gruppe NON-OVX hat signifikant kleinere Muskeln als die Gruppen OVX, OVX + VIB, Alendronat und Alendronat + VIB. Zu den Gruppen 8-PN und 8-PN + VIB gibt es keinen signifikanten Unterschied, diese haben jedoch insgesamt auch kleinere Muskeln als die Gruppen OVX, OVX + VIB, Alendronat und Alendronat + VIB. In Relation zum Mittelwert des Körpergewichts der jeweiligen Versuchsgruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede des Muskel-Körpergewicht-Verhältnisses zwischen den Versuchsgruppen (s. Abbildung 20). Die ausführliche Tabelle mit Mittelwerten, Standardabweichungen sowie den Ergebnissen der Varianzanalyse befindet sich im Anhang 11.8 (s.

Tabelle 8).



Abbildung 19: Gewichte des M. gastrocnemius in Gramm (g) zum Versuchsende

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX; *: signifikant ,**: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 20: Verhältnis des Gewichts des M. gastrocnemius in Gramm (g) zum Körpergewicht des Versuchstieres in Gramm (g) zum Versuchsende

(keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

Wie mit den Mm. gastrocnemici wurde ebenso mit den Mm. solei verfahren. Nach dem Wiegen wurden die Mittelwerte der Muskelgewichte der verschiedenen Versuchsgruppen, bzw. die Mittelwerte geteilt durch das Körpergewicht der Versuchstiere, miteinander verglichen (s. Abbildung 21 und Abbildung 22). Dies lässt erkennen, dass es weder im Vergleich der absoluten Werte der Muskelgewichte innerhalb der Gruppen noch im Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere signifikante Unterschiede gibt. Im Anhang 11.8 sind die genauen Mittelwerte und Standardabweichungen einzusehen (s. Tabelle 9).



Abbildung 21: Gewicht des M. soleus in Gramm (g) zum Versuchsende

(keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))



Abbildung 22: Verhältnis des Gewichts des M. soleus in Gramm (g) zum Körpergewicht des Tieres in Gramm (g) zum Versuchsende

(keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

4.5 Korrelation zwischen Körpergewicht und Muskelgewicht der Versuchstiere

Die Mittelwerte des Körpergewichts der Versuchstiere in Gramm (g) wurden mit den Mittelwerten der Muskelgewichte (M. gastrocnemius und M. soleus), ebenfalls in Gramm (g), aller Versuchsgruppen verglichen, um herauszufinden, ob diese signifikant miteinander korrelieren (s. Abbildung 23 und Abbildung 24). Die Auswertung zeigt, dass das Körpergewicht des Versuchstieres positiv mit dem Gewicht des M. gastrocnemius (r = 0,7; p < 0,0001) bzw. des M. soleus (r = 0,5; p < 0,0001) korreliert: je größer das Körpergewicht des Versuchstieres ist, desto größer ist auch das Muskelgewicht. Die beiden Regressionsgeraden (s. Abbildung 23 und Abbildung 24) stellen jeweils die Beziehung zwischen dem Körpergewicht und dem Muskelgewicht dar.



Regressionsgerade: f(x) = 0,0052x + 0,3560

Abbildung 23: Korrelation zwischen Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g) und M. gastrocnemius in Gramm (g). Pearson r = 0,70; p < 0,0001; R^2 = 0,49



Regressionsgerade: f(x) = 0,0004x + 0,0201

Abbildung 24: Korrelation zwischen Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g) und M. soleus in Gramm (g).

Pearson r= 0,54; p < 0,0001; R²= 0,29

4.6 Kreatinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende

Nach der Tötung wurde das Serum der Versuchstiere auf das Enzym Kreatinkinase hin analysiert. Die Auswertung ergibt, dass sich die Konzentrationen der Serum-Kreatinkinase in den unterschiedlichen Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden (s. Abbildung 25 und Tabelle 10 im Anhang).



Abbildung 25: Kreatinkinase-Konzentrationen (U / I) im Serum der Versuchstiere zum Versuchsende. (U: Unit, I: Liter) (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

4.7 Ergebnisse zur mATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase: Fläche, Verhältnis von Fläche zu Körpergewicht, Durchmesser und Verhältnis von Durchmesser zu Körpergewicht

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchungen zur mATPase-Färbung nach Horak (1983) dargestellt werden. Es werden der Reihe nach zuerst die Auswertungen des M. longissimus, darauffolgend des M. gastrocnemius und schließlich des M. soleus dargestellt. Zu jedem Muskel werden die Ergebnisse der Flächen und der Durchmesser der verschiedenen Muskelfasertypen aufgezeichnet, außerdem die Verhältnisse, in die diese Messwerte zum Körpergewicht der Ratten bei Versuchsende gesetzt werden. Des Weiteren werden die verschiedenen Messwerte innerhalb der Versuchsgruppen miteinander verglichen, um signifikante Unterschiede darzustellen. Eine ausführliche Tabelle mit sämtlichen Kennwerten zur deskriptiven und schließenden Statistik findet sich im Anhang 11.10 (Tabelle 11).

4.7.1 Ergebnisse zum M. longissimus

4.7.1.1 Ergebnisse der glykolytischen Fasern

Nach der farblichen Darstellung der Muskelfasern des M. longissimus wurden die Flächen und Durchmesser der glykolytischen Fasern (*fast-twitch-glycolytic*) erfasst. Die jeweiligen Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen wurden daraufhin graphisch dargestellt und miteinander verglichen (s. Abbildung 26 und Abbildung 28). Zusätzlich wurden die Messgrößen der Flächen und Durchmesser in Relation zum Körpergewicht der Versuchstiere gesetzt und die errechneten Werte der verschiedenen Gruppen ebenfalls untereinander verglichen (s. Abbildung 29).

Die Auswertung der glykolytischen Fasern des M. longissimus in Hinsicht auf die Fläche und den Durchmesser der Fasern zeigt, dass keine der Behandlungen eine signifikante Veränderung der Parameter erbringt. Wird die Fläche durch das Körpergewicht der Versuchstiere geteilt, zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Die Auswertung stellt jedoch dar, dass bei dem Verhältnis von Durchmesser zu Körpergewicht die Gruppe Alendronat signifikant kleinere Werte besitzt als die beiden Gruppen NON-OVX und 8-PN+VIB.



Abbildung 26: Flächen der glykolytischen Fasern des M. longissimus in µm²

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 27: Verhältnis der Flächen der glykolytischen Fasern des M. longissimus in μm^2 zum Körpergewicht der Versuchstiere in g

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 28: Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. longissimus in µm

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 29: Verhältnis der Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. longissimus in µm zum Körpergewicht der Ratte in g

(e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant (Tukey HSD-Test))

4.7.1.2 Ergebnisse der intermediären Fasern

Vom M. longissimus des Versuchstieres wurden die intermediären Fasern (*fast-twitchoxidative-glycolytic*) erfasst und die Fläche und der Durchmesser der jeweiligen Versuchsgruppe errechnet. Der Vergleich dieser Mittelwerte innerhalb der Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied zueinander (s. Abbildung 30 und Abbildung 32). Die verschiedenen Behandlungen der Tiere erbringen keinen signifikanten Unterschied der Messdaten zueinander. Das Verhältnis von Fläche zu Körpergewicht der Ratten zeigt ebenfalls, dass es zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede gibt (s. Abbildung 31). Das Verhältnis von Durchmesser zu Körpergewicht gibt jedoch an, dass die beiden Versuchsgruppen, welche mit Alendronat behandelt wurden, signifikant kleinere Durchmesser besitzen als die Gruppe NON-OVX (s. Abbildung 33). Die Gruppe Alendronat ist höchstsignifikant und die Gruppe Alendronat+VIB ist hochsignifikant verschieden von der Gruppe NON-OVX. Zusätzlich ist die Gruppe Alendronat neben der Gruppe NON-OVX auch von der Gruppe 8-PN+VIB signifikant verschieden.



Abbildung 30: Flächen der intermediären Fasern des M. longissimus in μm^2

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 31: Verhältnis der Flächen der intermediären Fasern des M. longissimus in μm^2 zum Körpergewicht der Ratte in g

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 32: Durchmesser der intermediären Fasern des M. longissimus in µm

(keine signifikanten Unterschiede (Dunns-Test))



Abbildung 33: Verhältnis der Durchmesser der intermediären Fasern des M. longissimus in µm zum Körpergewicht der Ratte in g

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX; e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant; **: hochsignifikant; ***: höchstsignifikant (Dunns-Test))

4.7.1.3 Ergebnisse der oxidativen Fasern

Die errechneten Mittelwerte der Flächen und Durchmesser der oxidativen Fasern (*slow-twitch-oxidative*) des M. longissimus zeigen folgende Ergebnisse: die Gruppe OVX+VIB hat hochsignifikant größere Muskelfaserflächen als die Vergleichsgruppe Alendronat (s. Abbildung 34). Zusätzlich ergeben sich weitere signifikante Differenzen bei dem "Fläche zu Körpergröße"-Verhältnis (s. Abbildung 35). Hier zeigt sich die Gruppe Alendronat mit einem kleineren Wert hochsignifikant verschieden von den zwei Gruppen NON-OVX, OVX+VIB und signifikant verschieden von der Gruppe 8-PN+VIB.

Bei den Werten der Durchmesser der oxidativen Muskelfasern verhält es sich ähnlich (s. Abbildung 36) wie bei der Fläche der oxidativen Fasern. Die Gruppe OVX+VIB hat einen hochsignifikant größeren Durchmesser als die Gruppe Alendronat. Wird der Durchmesser durch die Körpergröße geteilt, gibt es noch weitere signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen (s. Abbildung 37). Die Gruppe NON-OVX hat einen größeren Verhältniswert als die Gruppe OVX (hochsignifikant), Alendronat (höchstsignifikant), Alendronat+VIB (signifikant) und 8-PN (hochsignifikant). Die Gruppe Alendronat hat einen höchstsignifikant kleineren Wert im Vergleich zu den Gruppen NON-OVX, OVX+VIB und 8-PN+VIB.



Abbildung 34: Flächen der oxidativen Fasern des M. longissimus in μm^2

(e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 35: Verhältnis der Flächen der oxidativen Fasern des M. longissimus in μm² zum Körpergewicht der Ratte in g (e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 36: Durchmesser der oxidativen Fasern des M. longissimus in μm

(e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 37: Verhältnis der Durchmesser der oxidativen Fasern des M. longissimus in µm zum Körpergewicht der Ratte in g

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX, e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant; **: hochsignifikant; ***: höchstsignifikant (Dunns-Test))

4.7.2 Ergebnisse zum M. gastrocnemius

4.7.2.1 Ergebnisse der glykolytischen Fasern

Beim M. gastrocnemius wurden die Flächen und die Durchmesser der glykolytischen Muskelfasern erfasst. Die Auswertung der Mittelwerte dieser Daten zeigt folgende Ergebnisse: die Gruppe 8-PN hat beim Vergleich der Flächen einen signifikant kleineren Wert als die Gruppen OVX, OVX+VIB und Alendronat+VIB. Zudem besitzt die Gruppe 8-PN+VIB einen signifikant kleineren Wert als die Gruppen OVX, OVX+VIB, Alendronat und Alendronat+VIB (s. Abbildung 38). Bei der Teilung der Fläche durch das Körpergewicht wird ersichtlich, dass die Gruppe 8-PN sich signifikant bis höchstsignifikant von den Gruppen NON-OVX, OVX, OVX+VIB, Alendronat und Alendronat+VIB - also zu allen Gruppen mit Ausnahme von 8-PN+VIB- unterscheidet. Zusätzlich hat die Gruppe NON-OVX einen signifikant größeren Wert als die Gruppe 8-PN+VIB (s. Abbildung 39). Beim Durchmesservergleich verhält es sich ähnlich (s. Abbildung 40). Die Gruppe 8-PN ist mit einem kleineren Wert signifikant bzw. hochsignifikant verschieden von den Gruppen OVX, OVX+VIB und Alendronat+VIB, sowie die Gruppe 8-PN+VIB ebenfalls mit einem kleineren Wert signifikant bzw. hochsignifikant verschieden von den Gruppen OVX, Alendronat und Alendronat+VIB ist. Im Verhältnis zum Körpergewicht zeigt sich, dass sich die Gruppe NON-OVX hochsignifikant bzw. höchstsignifikant von den Gruppen Alendronat, 8-PN und 8-PN+VIB unterscheidet, indem sie einen größeren Wert aufweist (s. Abbildung 41).



Abbildung 38: Flächen der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in µm²

(g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN; h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant; **: hochsignifikant (Dunns-Test))



Abbildung 39: Verhältnis der Flächen der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in μm^2 zum Körpergewicht der Ratte in g

(g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN; h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant; **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 40: Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in µm

(g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN, h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant; **: hochsignifikant (Dunns-Test))



Abbildung 41: Verhältnis der Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in µm zum Körpergewicht der Ratte in g

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX; **: hochsignifikant; ***: höchstsignifikant (Dunns-Test))

4.7.2.2 Ergebnisse der intermediären Fasern

Beim Vergleich der Flächenmittelwerte der intermediären Fasern des M. gastrocnemius zwischen den Gruppen wird ersichtlich, dass die Gruppe OVX+VIB signifikant verschieden von der Gruppe 8-PN und hochsignifikant verschieden von der Gruppe 8-PN+VIB ist sowie die Gruppe Alendronat+VIB signifikant verschieden von den Gruppen 8-PN und 8-PN+VIB ist (s. Abbildung 42). Beide genannten Gruppen haben höhere Messwerte als die

Vergleichsgruppen. In Relation zum Körpergewicht des Versuchstieres ist die Fläche bei der Gruppe NON-OVX hochsignifikant größer als die Gruppe 8-PN sowie signifikant größer als die Gruppe 8-PN+VIB (s. Abbildung 43). Beim Durchmesservergleich erkennt man die signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe OVX+VIB bzw. Alendronat+VIB zu der Vergleichsgruppe 8-PN+VIB. Die beiden Gruppen haben signifikant größere Werte (s. Abbildung 44) als die Gruppe 8-PN+VIB. Die Teilung der Durchmesser durch die Körpergewichte der Ratten hat folgendes Ergebnis: die Gruppe NON-OVX hat einen hochsignifikant höheren Wert als die Gruppe OVX sowie einen höchstsignifikant höheren Wert als die Gruppen Alendronat, 8-PN und 8-PN+VIB (s. Abbildung 45).



Abbildung 42: Flächen der intermediären Fasern des M. gastrocnemius in μm^2

(g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN, h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))





(g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN, h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant; **: hochsignifikant (Dunns-Test))



Abbildung 44: Durchmesser der intermediären Fasern des M. gastrocnemius in µm

(h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN+VIB; *: signifikant (Dunns-Test))



Abbildung 45: Verhältnis der Durchmesser der intermediären Fasern des M. gastrocnemius in µm zum Körpergewicht der Ratte in g

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX; **:hochsignifikant; ***: höchstsignifikant (Dunns-Test))

4.7.3 Ergebnisse zum M. soleus

4.7.3.1 Ergebnisse der oxidativen Fasern

Der M. soleus enthält fast ausschließlich oxidative Fasern (Ariano et al. 1973). Daher wurden nur diese ausgewertet. Die Flächen und Durchmesser der Muskelfasern wurden erfasst (s. Abbildung 46 bzw. Abbildung 48), sowie diese in Relation zum Körpergewicht der Versuchstiere gesetzt (s. Abbildung 47 bzw. Abbildung 49). Der Vergleich dieser Daten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen offenbart, dass es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsregimes gibt.



Abbildung 46: Flächen der oxidativen Fasern des M. soleus in μm² (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))



Abbildung 47: Verhältnis der Flächen der oxidativen Fasern des M. soleus in μm² zum Körpergewicht der Ratte in g (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))



Abbildung 48: Durchmesser der oxidativen Fasern des M. soleus in µm

(keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))



Abbildung 49: Verhältnis der Durchmesser der oxidativen Fasern des M. soleus in μm zum Körpergewicht der Ratte in g (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

4.8 Ergebnisse zur Amylase-PAS-Kapillarfärbung: Kapillardichte und Verhältnis von Kapillardichte zum Körpergewicht

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Amylase-PAS-Kapillarfärbung nach Andersen (1975) dargestellt werden. Die Auswertungen des M. longissimus, des M. gastrocnemius und des M. soleus werden der Reihe nach aufgezeichnet. Zu jedem Muskel wird das Ergebnis der Kapillardichte sowie das Verhältnis der Kapillardichte zum Körpergewicht der Ratten bei Versuchsende dargestellt. Die Messdaten werden innerhalb der Versuchsgruppen miteinander verglichen, um signifikante Unterschiede zu erkennen. Eine ausführliche Tabelle der Kennwerte zur Statistik findet sich im Anhang 11.11 (Tabelle 12).

4.8.1 Ergebnisse zum M. longissimus

Es wurden die Mittelwerte der Kapillardichten für die verschiedenen Versuchsgruppen für den M. longissimus ausgewertet (s. Abbildung 50). Dabei wird ersichtlich, dass sich die Gruppen NON-OVX und 8-PN+VIB signifikant bzw. höchstsignifikant von der Gruppe Alendronat unterscheiden. Sie haben eine geringere Kapillardichte als die Vergleichsgruppe. Wird die Kapillardichte im Verhältnis zum Körpergewicht des Versuchstieres gesetzt, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abbildung 51).


Abbildung 50: Die Kapillardichte in einem 1 mm²-Ausschnitt des M. longissimus (e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 51: Verhältnis der Kapillardichte des M. longissimus zum Körpergewicht der Ratte in Gramm (g)

4.8.2 Ergebnisse zum M. gastrocnemius

Im Gruppenvergleich ergab die Auswertung der Kapillardichte (s. Abbildung 52) und der Kapillardichte im Verhältnis zum Körpergewicht (s. Abbildung 53) des M. gastrocnemius keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.



Abbildung 52: Die Kapillardichte in einem 1 mm²-Ausschnitt des M. gastrocnemius

(e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant; **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 53: Verhältnis der Kapillardichte des M. gastrocnemius zum Körpergewicht der Ratte in Gramm (g)

4.8.3 Ergebnisse zum M. soleus

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Kapillardichte vom M. soleus fällt Folgendes auf (s. Abbildung 54): die Gruppen Alendronat, Alendronat+VIB, 8-PN und 8-PN+VIB sind jeweils höchstsignifikant verschieden von allen drei Gruppen NON-OVX, OVX sowie OVX+VIB und besitzen entsprechend eine größere Kapillardichte mit mehr Kapillaren pro Muskelfaser. Wird die Kapillardichte durch das mittlere Körpergewicht jeder Gruppe geteilt, werden nachstehende Ergebnisse offenbar (s. Abbildung 55): die Gruppe Alendronat ist signifikant verschieden von der Gruppe OVX mit einer größeren Kapillardichte im Verhältnis zum Körpergewicht. Die Gruppe Alendronat+VIB unterscheidet sich mit einem größeren Wert

hochsignifikant von den Gruppen NON-OVX und OVX+VIB sowie höchstsignifikant von der Gruppe OVX. Die Gruppe 8-PN unterscheidet sich ebenfalls mit einem größeren Wert von NON-OVX (hochsignifikant), OVX (höchstsignifikant) und OVX+VIB (höchstsignifikant). Weiterhin unterscheidet sich die Gruppe 8-PN+VIB ebenso mit einem größeren Verhältnis von Kapillardichte zum Körpergewicht höchstsignifikant von NON-OVX, OVX und OVX+VIB.



Abbildung 54: Die Kapillardichte in einem 1 mm²-Ausschnitt des M. soleus

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX, c: unterscheidet sich signifikant von OVX, d: unterscheidet sich signifikant von OVX+VIB; ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))



Abbildung 55: Verhältnis der Kapillardichte des M. soleus zum Körpergewicht der Ratte in Gramm (g)

(b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX, c: unterscheidet sich signifikant von OVX, d: unterscheidet sich signifikant von OVX+VIB; *: signifikant, **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))

5 Diskussion

5.1 Körpergewicht und Futteraufnahme der Versuchstiere

Da 12 Monate alte Sprague-Dawley-Ratten noch nicht ausgewachsen sind, ist es normal, dass die Gewichtskurven im Verlauf des Versuchszeitraums stetig ansteigen (Berg und Harmison 1957). Ein Östrogenmangel durch Ovariektomie kann jedoch zusätzlich zu einer gesteigerten Gewichtszunahme führen (Kobori und Yamamuro 1989), welche auf eine erhöhte Nahrungsaufnahme und gedrosselte Bewegungsaktivität zurückzuführen ist (Wade 1972; Kadi et al. 2002; Cavalcanti-de-Albuquerque et al. 2014). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da die ovariektomierten Ratten nach dem Eingriff eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Futteraufnahme zeigten und auch eine deutliche Gewichtszunahme aufwiesen. Die größte Gewichtszunahme zeigten die beiden Gruppen OVX und Alendronat. Die Vibrationsbehandlung milderte diesen Effekt ab, und die Tiere, welche vibriert wurden (OVX+VIB, Alendronat+VIB und 8-PN+VIB), nahmen nicht so stark an Gewicht zu wie die jeweilige nicht-vibrierte Vergleichsgruppe. Diesen Effekt zeigten schon Maddalozzo et al. (2008) in einem Versuch, bei dem ovariektomierte Ratten nach Vibrationsbehandlung ca. 10 % weniger wogen als nicht-vibrierte ovariektomierte Ratten.

Auch die Injektion von 8-PN hemmte die Gewichtszunahme, sodass die Gewichtskurve der Gruppe 8-PN sogar unter den Kurven der Gruppen OVX+VIB und Alendronat+VIB lag. Die Kombination aus Vibration und 8-PN (8-PN+VIB) hemmte noch stärker die Gewichtszunahme, sodass sich nahezu eine gleiche Gewichtskurve wie bei der Kontrollgruppe (NON-OVX) ergab und kein signifikanter Unterschied zu dieser erkennbar war. Dies könnte bedeuten, dass die Therapien Vibration und 8-PN einzeln und vor allem als Kombination den Gewichtszunahmeeffekt der Ovariektomie der Ratten hemmen.

Vibrationstraining führt zu einem stetigen An- und Entspannen der Muskulatur. Jede Art von Muskelarbeit verbraucht Energie und kann daher bei den Ratten zu einer Körperfett- und Körpergewichtsreduzierung führen. 8-PN hat mit seinem östrogenen Charakter mutmaßlich eine vergleichbare Wirkung wie Estradiol, dadurch dass es den Stoffwechsel und die Lipolyse steigert (Luglio 2014). Böttner et al. (2008) konnten in ihrer Studie zeigen, dass beide Wirkstoffe gleiche Ergebnisse erzielen: eine dreimonatige Gabe von 8-PN verringerte ebenso wie die Gabe von 17-ß-Estradiol signifikant das Körpergewicht der behandelten ovariektomierten Ratten.

In der vorliegenden Studie unterschied sich die Futteraufnahme der Ratten signifikant zwischen der Kontrollgruppe und den ovariektomierten Gruppen. Dies kann durch den appetithemmenden Effekt des Östrogens, welcher nach der Ovariektomie entfällt, erklärt werden (Wade 1972). Die gesteigerte Futteraufnahme erklärt entsprechend die gesteigerte Gewichtszunahme.

Direkt nach der Osteotomie der Tibiae (Woche 9) fielen die Gewichts- und die Futterkurven stark ab und normalisierten sich zum Ende des Versuchs hin wieder auf ihre Ursprungswerte. Trotz geeigneter Analgetikagabe ist dieses Phänomen durch postoperative Schmerzen, Inaktivität und den Heilungsprozess zu erklären und wurde in vorigen Arbeiten bereits beschrieben (Komrakova et al. 2013; Stuermer et al. 2014). Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt weitere Auswirkungen auf die Ergebnisse bezüglich Muskulaturwachstum und Kapillardichte haben könnte. Inaktivität, Entzündungsreaktionen und Wundheilung sind Bestandteil einer Frakturheilung und können einen Effekt auf die Muskulatur haben. Patienten erleben häufig einen Verlust an Muskelmasse und -kraft im Rahmen einer Frakturheilung (Visser et al. 2000; Cohen et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurde die Muskulatur während einer Knochenbruchheilungsphase untersucht und dabei wurde erforscht, welche Effekte die angewandten Therapiemaßnahmen haben.

5.2 Uterusgewichte

Alle post-ovariektomierten Ratten besaßen zum Versuchsende höchstsignifikant kleinere Uteri als die Kontrollgruppe NON-OVX, welche noch in Besitz ihrer Ovarien war. Dies ist als Kontrollzeichen einer korrekt durchgeführten Eierstockentfernung anzusehen und folglich ein adäquat erfolgter Hormonentzug, wie er in der Postmenopause beobachtet werden kann (Jiang et al. 2008). Diese Daten beweisen einen Östrogenmangel, der für eine induzierte Osteoporose der Ratten voraussetzend ist.

Die Ergebnisse der Uterusgewichte sind hinsichtlich der östrogenen Wirkung des 8-Prenylnaringenins bedeutend. Die Gruppen 8-PN und 8-PN+VIB haben keine signifikant größeren Uteri als die Vergleichsgruppen, die auch ovariektomiert wurden (OVX, OVX+VIB, Alendronat, Alendronat+VIB). Auch Diel et al. (2004) und Zierau et al. (2008) konnten zeigen, dass die Gabe von 8-PN einen schwächeren trophischen Effekt auf den Uterus der ovariektomierten Ratte hat, als die Gabe von 17-β-Estradiol, obgleich 8-PN durchaus einen Effekt auf den Uterus hat. Overk et al. (2008) konnten nach hoher 8-PN-Dosierung (4 und 40 mg / kg KG pro Tag) eine Uterusgewichtssteigerung an ovariektomierten Ratten in ihrem Versuch nachweisen, nach einer geringen Dosierung (0,4 mg / kg KG pro Tag) jedoch nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine tägliche 8-PN-Dosierung von 1,77 mg / kg KG verwendet und führte zu keiner Uterusgewichtszunahme. Dies lässt folgern, dass die uterotrophische Wirkung von 8-PN dosisabhängig ist.

Durch die Erkenntnis, dass 8-PN nicht in dem Maße proliferierend auf den Uterus der Ratte wirkt wie 17-β-Estradiol, könnte man vermuten, dass 8-PN daher ein geringeres Krebsrisiko in sich birgt als eine klassische Hormonersatztherapie. Als zusätzliche potenzielle Alternative zu 8-PN könnte in weiteren Forschungen 6-Prenylnaringenin sein, welches in bisherigen Versuchen keine uterotrophische Wirkung erkennen ließ (Zierau et al. 2008; Keiler et al. 2015).

5.3 Gewichte des M. gastrocnemius und des M. soleus zum Versuchsende

Die Gewichte des M. gastrocnemius der Gruppen OVX, OVX+VIB, Alendronat und Alendronat+VIB waren signifikant höher als die Gewichte der Gruppen NON-OVX, 8-PN und 8-PN+VIB. Generell führt eine Ovariektomie dazu, dass Ratten an Gesamtkörpergewicht zunehmen (Kobori und Yamamuro 1989; Shinoda et al. 2002), so auch in der vorliegenden Studie. Toth et al. (2001) konnten zudem zeigen, dass sich die fettfreie Masse bei ovariektomierten Ratten trotz eingeschränkter Nahrungsaufnahme erhöht sowie die Muskelproteinsynthese gesteigert wird. Booth und Tipton (1969), Fisher et al. (2000) und Sasa et al. (2004) beobachteten in ihren Studien eine Muskelmassezunahme bei ovariektomierten Ratten. Diese Erkenntnisse erklären die gesteigerten Muskelgewichte der ovariektomierten Versuchsgruppen dieser Studie. Bedeutend ist jedoch, dass das Phytoöstrogen 8-PN diese Gewichtszunahme des M. gastrocnemius der Versuchstiere hemmt. Die Muskelgewichte der beiden mit 8-PN behandelten Gruppen unterschieden sich daher nicht signifikant zur Kontrollgruppe NON-OVX wie die Muskelgewichte der anderen ovariektomierten Gruppen.

Die Zunahme der Muskelmasse geht einher mit einer Körpergewichtszunahme der Ratten (Fisher et al. 2000). Die in der vorliegenden Studie vorgefundenen Korrelationen bestätigen diesen Effekt. Sollte es signifikante Unterschiede zwischen den absoluten Werten der Gewichte des M. gastrocnemius der verschiedenen Versuchsgruppen geben, so entfallen diese Unterschiede, wenn die Muskelgewichte zum Körpergewicht der Versuchstiere ins Verhältnis gesetzt werden. Das heißt, dass das Verhältnis von Muskelgewicht zu Körpergewicht der verschiedenen Gruppen konstant bleibt. Fisher et al. (2002) zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der ovariektomierten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe gibt, wenn der Muskel zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt wird. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen diese Erkenntnis.

Die Muskelgewichte des M. soleus der ovariektomierten Gruppen sind größer als die der Kontrollgruppe NON-OVX, jedoch nicht signifikant. Weiterhin gibt es auch keine signifikanten Unterschiede der Muskelgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere zwischen den Versuchsgruppen. Diese Feststellung deckt sich ebenfalls mit der genannten Aussage von Fisher et al. (2002).

5.4 Kreatinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende

Die Kreatinkinase-Werte im Serum der Versuchstiere unterschieden sich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant von einander. Die Kreatinkinase ist ein Muskelmarker, der bei Gewebeschaden erhöhte Werte zeigt (Noh et al. 2015). Normale Werte in dieser Studie

deuten daraufhin, dass es zu keiner übermäßigen mechanischen Belastung, Verletzung oder anderen Störung der Muskulatur der Ratten während des Versuches kam.

5.5 Fläche und Durchmesser der Muskelfasern

Die Analyse der Muskelfaserparameter der drei ausgewählten Muskeln (longissimus, gastrocnemius und soleus) diente dazu, den Einfluss der Ovariektomie und der drei Therapiemaßnahmen (Ganzkörpervibration, Alendronat und 8-Prenylnaringenin) auf den Muskel zu erfassen. Es stellte sich die Frage, inwieweit die Faserflächen beziehungsweise die Faserdurchmesser sich von denen der Kontrollgruppe NON-OVX unterschieden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben, wenn die Parameter Fläche und Durchmesser ins Verhältnis zum Körpergewicht der Versuchstiere gesetzt wurde. Interessant erschien in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Therapiemaßnahmen den Effekt eines induzierten Östrogenmangels revidieren könnten (Vergleich zur Gruppe OVX). Dies würde bedeuten, dass die Hormonmangeleffekte aufgehalten oder sogar wieder rückgängig gemacht werden könnten.

5.5.1 Effekte der Ovariektomie

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Ovariektomie bei allen drei Muskelfasertypen der unterschiedlichen Muskeln zu keiner signifikanten Veränderung der Faserfläche und des -durchmessers führt. Es ist allerdings eine Tendenz zu einer Vergrößerung der Muskelfaserflächen nach Abwesenheit von Östrogen erkennbar. Kobori und Yamamuro (1989) konnten zeigen, dass eine Ovarienentfernung zu einer Zunahme der Fläche aller drei Fasertypen im Rattenmodell führt und sich am stärksten auf die Typ IIA-Fasern (intermediär) auswirkt. Dem gegenüber gestellt haben McCormick et al. (2004) und Stuermer et al. (2010b) diesen Effekt nicht wiederholen können und fanden heraus, dass eine Ovariektomie in ihren Studien am Rattenmodell keinen Effekt auf die Muskelfasergröße hatte. McClung et al. (2006) konnten zwar eine Östrogensensitivität des Muskels zeigen, aber auch sie konnten keine signifikante Fasergrößenveränderung nach Ovariektomie feststellen. Die genannten Studien wurden ebenfalls an Sprague-Dawley-Ratten und am M. soleus durchgeführt und sind dementsprechend mit den Ergebnissen dieser Studie gut vergleichbar. Die Muskelfaserfläche und der -durchmesser sind in Bezug auf das Körpergewicht der östrogendeprivierten Versuchstiere gegenüber NON-OVX in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht gesteigert. Im Gegenteil- es gibt eine Abnahme des Faser-Körper-gewicht-Verhältnisses der OVX-Gruppe mit signifikanten Minderungen der Durchmesser-Verhältnisse der oxidativen Fasern des M. longissimus und der intermediären Fasern des M. gastrocnemius. Dies könnte daran liegen, dass ein durch die Ovariektomie veränderter Stoffwechsel zu einer erhöhten Körpermasse führt (Kadi et al. 2002; Cavalcanti-de-Albuquerque et al. 2014) und dadurch das Faser zu Körpergewicht Verhältnis verringert ist.

5.5.2 Effekte der vertikalen Ganzkörpervibration

Xie et al. (2008) und Stuermer et al. (2010b) konnten zeigen, dass die Ganzkörpervibration zu einer signifikanten Muskelfasergrößenzunahme führt. Komrakova et al. (2013) konnten dem gegenüber jedoch keine signifikanten Unterschiede der Fasergrößen zwischen vibrierten und nicht-vibrierten Versuchstieren feststellen. Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit denen von Komrakova et al. (2013) überein und zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Dennoch ist ein Trend erkennbar, dass die vertikale Ganzkörpervibration im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu einer Steigerung der Muskelfaserfläche und des -durchmessers führt. Das heißt, dass im Vergleich zur Gruppe OVX die Gruppe OVX+VIB eine Steigerung der Fläche und des Durchmessers aufweist. Ebenfalls haben die Therapiekombinationen Alendronat+VIB beziehungsweise 8-PN+VIB eine größere Fläche und einen größeren Durchmesser als die Gruppe Alendronat beziehungsweise 8-PN. Besonders von diesem Effekt betroffen sind die Flächen und Durchmesser bei den Fasern des M. longissimus und des M. soleus.

Beim M. gastrocnemius hingegen reduzierte die Vibrationstherapie in Kombination mit 8-PN den Faserdurchmesser der intermediären Fasern im Vergleich zur Gruppe 8-PN, welche keine Vibrationstherapie erhielt. In diesem Fall gibt es keinen anabolen Effekt der Vibrationstherapie auf den Faserdurchmesser. Dadurch, dass die Mm. solei und longissimi flächenmäßig beeinflusst werden und der M. gastrocnemius nicht, könnte man vermuten, dass die Vibrationstherapie eher einen anabolen Effekt auf ausdauernde Stütz- und Haltemuskulatur hat. Der M. gastrocnemius ist ein Muskel mit hauptsächlich glykolytischen und intermediären Fasern (s. Kapitel 2.1.3.) und dient hauptsächlich zur schnellen und kraftvollen Bewegung und scheint weniger von der Vibrationstherapie beeinträchtigt zu sein. Es ist zu vermuten, dass die Kontraktionsarbeit, die bei der Vibrationstherapie entsteht, zu einer größeren Veränderung am ausdauernden und langsam-ermüdenden Muskel hat.

Ein möglicher Hinweis auf die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studie im Vergleich zu der von Stuermer et al. (2010b) liegt in der Methodik und der Behandlungsdauer. Stuermer et al. (2010b) verwendeten eine Frequenz von 90 Hz bei der 30-tägigen Vibrationstherapie der Ratten, wobei in der vorliegenden Studie eine Frequenz von 35 Hz mit einer Behandlungsdauer von 10 Wochen gewählt wurde. Es ist möglich, dass eine Erhöhung der angewandten Frequenz in einem kürzeren und intensiveren Behandlungszeitraum zu einer weiteren Steigerung der Muskelfaserfläche führen könnte. Weitere Untersuchungen wären erforderlich, um diesen Aspekt tiefgründiger zu untersuchen.

Wehrle et al. (2015) diskutieren, dass eine hochfrequente Vibrationstherapie mit niedriger Amplitude ihren osteoanabolen Effekt durch Stimulierung des Östrogenrezeptors α (ER α) erreicht. Die Stimulierung von ER ß soll einen gegenteiligen Effekt auf den Knochenbau und die Frakturheilung haben (Wehrle et al. 2015). ER α sowie ER ß sind sowohl im Knochen als auch in der Skelettmuskulatur vorhanden (Wiik 2008). Es kann vermutet werden, dass die Ganzkörpervibrationstherapie der vorliegenden Arbeit ebenfalls ihren anabolen Effekt über die Stimulation der Östrogenrezeptoren der Skelettmuskulatur der Ratte ausübt. Zusätzlich könnten die durch die Vibration ausgelösten kontinuierlichen Muskelkontraktionen ebenfalls zu einer adaptiven Muskelfaservergrößerung durch Mitochondrienvermehrung und Muskelproteinzunahme führen.

5.5.3 Effekte des Alendronats

Die Tiere der Versuchsgruppen Alendronat und Alendronat+VIB erhielten 10 Wochen lang das Bisphosphonat im Futter. Die mittlere täglich aufgenommene Menge an Alendronat der beiden Gruppen war 0,23 mg (Alendronat) beziehungsweise 0,21 mg (Alendronat+VIB) pro Ratte und die mittlere tägliche Dosisaufnahme war 0,59 mg / kg (Alendronat) beziehungsweise 0,57 mg / kg (Alendronat+VIB). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Dies erfüllte die Bedingung, dass beide Gruppen uneingeschränkt miteinander verglichen werden konnten. Mit der angewandten Alendronatdosierung war mit einer ausreichenden Wirkung auf das muskuloskelettale System der Ratten zur rechnen (Kolios et al. 2010).

Es gibt keine vorausgehenden Studien, die den Einfluss von Alendronat auf die Muskelfasergröße beschreiben. Die Ergebnisse dieser Studie lassen bei Betrachtung der Faserflächen erkennen, dass die Gabe von Alendronat grundsätzlich einen Effekt auf diese hat. Der Effekt zeigt sich jedoch als gegenteilig zu dem der Ganzkörpervibration hinsichtlich der Flächen- und Durchmessergröße. Besonders bei den Fasern des M. longissimus und des M. gastrocnemius ist der hemmende Einfluss von Alendronat auf die Fasergrößen zu erkennen. Alle Fasertypen der zwei genannten Muskeln der Alendronat Gruppe haben im Faserdurchmesser-Körpergewicht-Verhältnis signifikant geringere Werte als die Gruppe NON-OVX und zusätzlich bei allen drei Fasertypen des M. longissimus signifikant geringere Werte als die Gruppe 8-PN+VIB. Des Weiteren zeigen auch die Ergebnisse der oxidativen Fasern des M. longissimus signifikant reduzierte Werte im Fläche-Körpergewicht-Verhältnis nach Alendronatgabe.

Insgesamt betrachtet hat das Bisphosphonat Alendronat einen reduzieren Einfluss auf die Fläche und den Durchmesser der Muskelfasern. Dies bedeutet, dass Alendronat zwar eine bewiesene Knochenstärke- und -masse- fördernde Wirkung besitzt (Widrick et al. 2007), auf den Muskel jedoch einen hemmenden Effekt ausübt. Dieser hemmende Effekt kann teilweise durch die in diesem Versuch verwendete Ganzkörpervibrationstherapie aufgehoben werden und resultiert darin, dass die Gruppe Alendronat+VIB größere Flächewerte als die Gruppe Alendronat besitzt.

Alakangas et al. (2002) konnten zeigen, dass Stickstoff-enthaltendes Alendronat die Knochenresorption bei Ratten durch eine Inhibierung des Mevalonatweges aufhält. Die Osteoklasten, welche für die Knochenresorption zuständig sind, werden dabei gehemmt. Der Mevalonatweg ist bei der Zellproliferation beteiligt (Raiteri et al. 1997). Alakangas et al. (2002) fanden unter anderem heraus, dass der intrazelluläre Vesikeltransport bei alendronatbehandelten murinen Osteoklasten gestört ist. Möglicherweise ist auch bei Muskelzellen dieser Transport nach Alendronatbehandlung gestört. Es könnte dadurch zu einer verminderten Proliferation und Ausreifung der Fasern kommen, da Substrate und Produkte innerhalb der Zelle nicht zum Zielort befördert werden können. Dies könnte eine mögliche Erklärung der reduzierten Faserflächen und -durchmesser sein. Ob dabei die Muskelkraft reduziert wird, müsste in weiteren Studien geklärt werden. Genauso müsste auch geklärt werden, welche Veränderungen es durch Alendronat hinsichtlich der Proteinsynthese und -zusammenstellung sowie auf der Genebene gibt.

5.5.4 Effekte des 8-Prenylnaringenins

Zur Wirkung von 8-PN auf Muskelfasergröße und -durchmesser der ovariektomierten Ratten liegen bis dato keine Studien vor. 8-PN soll eine Wirkung auf den Skelettmuskel haben, da es an die Östrogenrezeptoren (vor allem ER α) andockt (Luo et al. 2014) und sich intramuskulär anreichert (Mukai et al. 2012). Am Mausmodell zeigte sich, dass sich die Muskelatrophie an denerviertem M. gastrocnemius durch die orale Einnahme von 8-PN verringern ließ (Mukai et al. 2012).

Die vorliegende Studie zeigt, dass 8-PN einen sehr unterschiedlichen Effekt auf die verschiedenen Muskeln hat. Beim M. longissimus hat 8-PN mit einer Ausnahme keinen signifikanten Effekt auf die Muskelfasergrößen der drei Fasertypen. Einzig beim Verhältnis von Durchmesser zu Körpergewicht der oxidativen Fasern des M. longissimus hat die Gruppe 8-PN hochsignifikant kleinere Werte als die Gruppe NON-OVX. Die Gruppe OVX hat ebenfalls hochsignifikant kleinere Werte als NON-OVX sowie keine signifikant verschiedenen Werte zu 8-PN. Somit besitzen die beiden Gruppen OVX und 8-PN ähnliche Werte. Dies bedeutet, dass der Östrogenmangeleffekt durch die Ovariektomie auf den Muskel durch 8-PN hierbei nicht signifikant aufgehoben werden kann. Es kann daher gefolgert werden, dass 8-PN auf den M. longissimus keinen bedeutenden Effekt ausübt.

Beim M. gastrocnemius verhält es sich anders als beim M. longissimus. Bei den glykolytischen Fasern haben die Ratten nach 8-PN Gabe signifikant kleinere Fasern als die Gruppe OVX und im Fläche-zu-Körpergewicht-Verhältnis haben sie höchstsignifikant kleinere

Werte als die Gruppe NON-OVX und hochsignifikant kleinere Werte als die Gruppe OVX. Bei den Werten der Durchmesser verhält es sich ähnlich: die mit 8-PN behandelten Ratten haben signifikant kleinere Werte als die ovariektomierten Ratten und im Verhältnis zum Körpergewicht höchstsignifikant kleinere Werte zur Kontrollgruppe NON-OVX. Diese Ergebnisse bedeuten, dass 8-PN einen stark reduzierenden Effekt auf die glykolytischen Muskelfasern des M. gastrocnemius hat. Dies kann mit einer östrogenen Wirkung assoziiert werden, da vorige Studien mit Östrogenersatz an ovariektomierten Ratten ähnliche Ergebnisse erzielten. Kobori und Yamamuro (1989) und Piccone et al. (2005) zeigten, dass die Gabe von 17-ß-Estradiol an ovariektomierten Ratten eine Fasergrößenabnahme bewirkt. Der Unterschied zwischen der vorliegenden Studie und der von Kobori und Yamamuro (1989) ist jedoch der betroffene Muskel. Kobori und Yamamuro (1989) erkannten eine Fasergrößenabnahme am M. soleus, in der vorliegenden Studie gibt es eine Fasergrößenabnahme des M. gastrocnemius. Die Studie von Piccone et al. (2005) ist auch nicht gänzlich mit der vorliegenden zu vergleichen, da sie die Fasern des M. plantaris untersuchten, einen Hinterlaufmuskel, welchen wir nicht in unseren Versuch aufgenommen hatten. Trotzdem besteht die Assoziation zwischen den Effekten von 8-PN und Östrogenersatz.

Bei den Verhältnissen von Faserfläche und -durchmesser zu Körpergewicht besteht auch bei den intermediären Fasern des M. gastrocnemius ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe NON-OVX. Dies unterstützt weiterhin die Aussage, dass 8-PN eine reduzierende Wirkung auf die Muskelfaserparameter ausübt.

Beim M. soleus gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe 8-PN und den Vergleichsgruppen hinsichtlich der Fasergrößen. 8-PN scheint auf den ausdauernden und langsam-ermüdenden M. soleus daher keinen Einfluss zu haben. Möglicherweise affektiert 8-PN hauptsächlich kraftvolle und schnell-ermüdende Muskulatur wie den M. gastrocnemius. Es wäre möglich, dass der M. gastrocnemius eine höhere Anzahl an Östrogenrezeptoren besitzt als die Mm. solei und longissimi und dadurch stärker duch 8-PN beeinflusst wird. Diese Vermutung müsste jedoch weiter untersucht werden.

76

Wird die Ganzkörpervibrationstherapie mit der Behandlung von 8-PN kombiniert, hat dies keinen bedeutenden Vorteil den einzelnen Therapien gegenüber. Die Fasergrößen der Gruppe 8-PN+VIB sind teilweise etwas größer als die der Gruppe 8-PN, jedoch nicht signifikant. Das bedeutet, dass eine zusätzliche Vibrationstherapie zur 8-PN-Gabe die Fasergrößen nicht bedeutend beeinflusst.

Letztlich müssen weitere Forschungen angestellt werden, um die richtige Dosierung und die optimale Behandlungsdauer von 8-PN zu ermitteln. Da in der vorliegenden Studie die 8-PN-Behandlung mit einer niedrigen Dosierung schon sehr kostspielig war, muss vorerst die finanzielle Unterstützung für die Forschung an höheren Dosierungen erlangt werden. Wichtig ist außerdem die Sicherheit bei der Anwendung am Menschen hinsichtlich der proliferierenden Wirkung auf die Reproduktionsorgane zu gewährleisten. In niedriger Dosierung findet 8-PN bereits Anwendung bei klimakterischen Beschwerden in Kapselform als MenoHop[®] (Metagenics; Ostend, Belgien) und als Vaginalgel Gynomunal[®] (Taurus Pharma GmbH; Bad Homburg, Deutschland).

5.6 Kapillardichte

Die Analyse der Kapillardichte diente der Erkennung, ob die Ovariektomie und die drei Therapiemaßnahmen (Ganzkörpervibration, Alendronat, 8-Prenylnaringenin) einen Einfluss auf die Blutversorgung des Skelettmuskels haben. Eine erhöhte Kapillardichte würde zu einer verbesserten Oxygenierung und Nährstoffversorgung der Muskelfasern führen. Es galt herauszufinden, ob die verschiedenen Therapiemaßnahmen dieser Studie einen Einfluss auf die Kapillardichte und somit die Blutversorgung des Muskels haben.

Beim M. gastrocnemius gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Kapillardichte. Weder die Ovariektomie noch die verschiedenen Behandlungen der Tiere hatten einen Einfluss auf die Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser.

Beim M. longissimus war die Kapillardichte der Gruppe Alendronat signifikant zur Gruppe NON-OVX sowie 8-PN+VIB gesteigert. Weitere signifikante Unterschiede gab es nicht.

Die Kapillardichte des M. soleus, einem ausdauernden und langsam-ermüdenden Hinterlaufmuskel mit oxidativen Fasern, wies große Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen auf. Die vier Gruppen Alendronat, Alendronat+VIB, 8-PN und 8-PN+VIB waren alle mit einer erhöhten Kapillardichte höchstsignifikant verschieden von den drei Gruppen NON-OVX, OVX und OVX+VIB. Die Ovariektomie und die Vibrationstherapie hatten keine bedeutende Wirkung auf die Kapillardichte des Skelettmuskels. Die Behandlungen Alendronat und 8-PN hatten dem gegenübergestellt jedoch einen steigernden Einfluss auf die Kapillardichte des M. soleus.

Stuermer et al. (2010b) fanden heraus, dass eine Ganzkörpervibrationstherapie die Kapillardichte des M. longissimus signifikant gegenüber intakten und ovariektomierten Ratten Games al. steigert. Auch et (2015)konnten zeigen, dass eine Ganzkörpervibrationstherapie den Blutfluss im peripheren Gewebe und Muskel steigern kann. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen hingegen keine erhöhte Kapillardichte nach erfolgter Vibrationstherapie. Möglicherweise liegt es an der Frequenz der Vibrationstherapie, ob es zu einer Kapillardichtesteigerung kommt oder nicht. Stuermer et al. (2010b) nutzten in ihrem Versuch eine Frequenz von 90 Hz, in der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine Frequenz von 35 Hz verwendet. Komrakova et al. (2013) konnten ebenfalls keinen signifikanten Effekt einer vertikalen Ganzkörpervibration auf die Kapillardichte der murinen Skelettmuskulatur bei 35 Hz erkennen, erzielten aber gesteigerte Kapillardichtewerte bei einer horizontalen Vibration von höheren Frequenzen (70 Hz und 90 Hz). Dies lässt schlussfolgern, dass eine höhere Frequenz benötigt wird, um die Blutzufuhr im Muskel durch einen Anstieg an Kapillaren durch Angiogenese zu erzielen.

Es gibt zur Wirkungsweise von Alendronat als Osteoporosemedikament nur Kenntnisse hinsichtlich des Knochens: Alendronat hemmt die Osteoklasten und fördert dabei den Knochenaufbau (Chen et al. 2014a). Wie Alendronat jedoch auf die Muskulatur und die Kapillaren wirkt und welche zellulären Vorgänge sich dabei abspielen, ist bis dato unbekannt. Interessant ist jedoch, dass es bei Alendronateinnahme zu Muskelschmerzen als Nebenwirkung kommen kann (Tienboon und Jaruwangsanti 2014). Dies lässt unter anderem, neben den Ergebnissen dieser Studie, erkennen, dass das Alendronat eine Wirkung auf die

78

Muskulatur hat. Die Frage, wie es genau wirkt, auch im Zusammenhang der Kapillardichtesteigerung, bleibt dabei leider offen und erfordert weitere Forschung.

Zur Wirkweise des Phytoöstrogens 8-PN auf die Skelettmuskulatur gibt es derzeit noch keine ausreichenden Kenntnisse. Wiik et al. (2005) fanden heraus, dass Östrogenrezeptoren sowohl im Muskel als auch im Endothel der Kapillaren zu finden sind und Luo et al. (2014) zeigten, dass 8-PN diese Östrogenrezeptoren stimuliert. Welchen zellulären Effekt dies auf die Muskulatur beziehungsweise auf die Kapillaren hat, ist jedoch noch nicht bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass 8-PN die Angiogenese in der Wundheilung stimuliert (Negrão et al. 2010). Da 8-PN einen östrogenen Charakter hat, könnte man seinen Einfluss mit denen anderer Phytoöstrogene und Estradiol vergleichen. Kyriakides et al. (2001) injizierten in ihrer Studie am ischämischen Hinterlauf des Kaninchens 17-ß-Estradiol intramuskulär und erreichten damit eine signifikant gesteigerte Kapillardichte gegenüber der Gruppe nicht-behandelter Tiere. Leider erwähnten die Autoren nicht, welchen Hinterlaufmuskel sie dabei untersuchten. Östrogen hat den Ergebnissen der genannten Studie zufolge eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese. Dem gegenüber konnten Komrakova et al. (2009) keinen bedeutenden Einfluss von Isoflavonen (Daidzein) und 17-ß-Estradiol auf die Kapillardichte des M. gastrocnemius in ihrer Studie an ovariektomierten Ratten erkennen. Dieses Ergebnis kann mit dem vorliegenden verglichen werden, da in dieser Studie ebenfalls kein Effekt von 8-PN am M. gastrocnemius erfasst werden konnte. Komrakova et al. (2009) untersuchten in ihrer Studie jedoch nicht den Einfluss der Substanzen auf den M. soleus, sodass es infolgedessen keinen Vergleich zu unserer Studie gibt. 8-PN erzielte in der vorliegenden Studie am M. soleus eine signifikante Steigerung der Kapillardichte. Dieser Effekt passt zu den Ergebnissen von Kyriakides et al. (2001), vorausgesetzt es wurde der M. soleus untersucht.

Faktoren, welche die Angiogenese der Muskulatur fördern, sind ein erhöhter Sauerstoffbedarf bei Wachstum, Kälteeinfluss und erhöhtem oxidativen Metabolismus beispielsweise nach Aktivitätssteigerung (Hudlická 1985). Der M. soleus besitzt hauptsächlich oxidative Fasern, welche durch ihre aerobe Energiegewinnung einen hohen Sauerstoffbedarf haben (Ariano et al. 1973). Bei einer Stimulierung oder Proliferation dieser Fasern steigt somit auch der Bedarf an Sauerstoff und dies fördert wieder die Angiogenese, um eine ausreichende Blutzufuhr zu gewährleisten. Es könnte gefolgert werden, dass die gesteigerte Kapillardichte des M. soleus unter den Behandlungen Alendronat und 8-PN durch einen erhöhten oxidativen Metabolismus beziehungsweise durch einen erhöhten Sauerstoffbedarf zustande kommt. Andererseits ist eine Kapillarproliferation auch ohne oxidative Veränderungen möglich. Es wird diskutiert, ob dabei mechanische (Scher-)Kräfte im Zusammenhang mit einem erhöhten Blutfluss eine Rolle spielen (Hudlická 1985). Ebenfalls muss die Möglichkeit einer gesteigerten Kapillarisierung des Wadenmuskels durch die postoperative Entzündungsphase nach der Osteotomie bedacht werden. Wundflüssigkeit, Prostaglandine und andere Mediatoren können zu einer Steigerung der Angiogenese führen (Folkman und Klagsbrun 1987). Die Problematik von Überlagerungseffekten durch die Frakturheilung nach Osteotomie müsste in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ovariektomie und die Ganzkörpervibration keinen signifikanten Einfluss auf die Kapillardichte im Skelettmuskel der Ratte haben. Die beiden Therapiesubstanzen Alendronat und 8-PN besitzen jedoch einen fördernden Einfluss auf die Blutzufuhr des Muskels, indem sie die Kapillardichte erhöhen. Dies gilt im Besonderen für den M. soleus.

5.7 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, welche Effekte die verschiedenen Therapiemaßnahmen - vertikale Ganzkörpervibrationstherapie, Alendronat und 8-Prenylnaringenin - auf die Skelettmuskulatur der ovariektomierten Ratte haben. Die Analyse der Ergebnisse brachte folgende Erkenntnisse. Die vertikale Ganzkörpervibrationstherapie mit 35 Hz erzielte eine tendenzielle Vergrößerung der Faserfläche und des Durchmessers aller Fasertypen der drei untersuchten Muskeln. Dieser Effekt war sowohl bei alleiniger Vibrationstherapie als auch in Kombination mit Alendronat- und 8-PN-Gabe zu den jeweiligen Vergleichsgruppen erkennbar. Folglich kann die Vibrationstherapie als eine unterstützende Maßnahme zur Muskelstärkung und -erhaltung bei Inaktivität, zum Beispiel nach Knochenfraktur, bei bettlägerigen Patienten oder zur Erhaltung des Gleichgewichts bei älteren Patienten mit Sarkopenie und Osteoporose angesehen werden.

Die Behandlung der ovariektomierten Ratten mit Alendronat hatte im Vergleich zur intakten Gruppe NON-OVX eine Reduktion der Faserflächen und -durchmesser des Muskels zur Folge. Dies war vor allem an den intermediären und oxidativen Fasern des M. longissimus und geringfügig an den Fasern des M. gastrocnemius zu beobachten. Obwohl es noch unzureichende Informationen bezüglich der Wirkung von Alendronat auf die Muskulatur gibt, kann geschlussfolgert werden, dass das Medikament einen eher hemmenden Effekt auf die Muskulatur hat. Allerdings steigert Alendronat die Kapillardichte und die Blutversorgung des Muskels, sodass weitere Studien zeigen müssen, ob Alendronat zur Muskelstärkung zu empfehlen ist.

Die post-ovariektorielle Gewichtszunahme der Ratten durch Östrogenmangel wurde durch die Behandlung mit 8-Prenylnaringenin verhindert. Dieser Effekt war am aussagekräftigsten in Kombination mit der Vibrationstherapie. Ebenfalls konnte die Gabe von 8-PN die Muskelzunahme des M. gastrocnemius nach Ovariektomie aufhalten. Die Muskelgewichte der Versuchsgruppen 8-PN und 8-PN+VIB waren ähnlich denen der nicht-ovariektomierten Tiere. Des Weiteren reduzierte 8-PN die Faserfläche und den Durchmesser der glykolytischen und intermediären Fasern des M. gastrocnemius. Außerdem erhöhte das Phytoöstrogen die Kapillardichte des M. soleus und verbesserte dementsprechend die Sauer- und Nährstoffversorgung des Muskels. Diese Erkenntnisse weisen daraufhin, dass 8-PN eine vielversprechende Substanz zur menopausalen Muskelunterstützung sein könnte und Gegenstand weiterer Forschungen sein soll.

6 Zusammenfassung

Als weitverbreitete Erkrankungen in der älteren Bevölkerungsschicht sind die Osteoporose mit einer reduzierten Knochendichte und die Sarkopenie mit einer verminderten Muskelkraft für ein gesteigertes Sturz- und Frakturrisiko verantwortlich (Roubenoff und Hughes 2000). Frakturen im Alter sind folgenreich und können zu erhöhter Morbidität, Invalidität, Mortalität und zu hohen monetären Ausgaben führen (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Das muskuloskelettale System, bestehend aus Muskulatur und Knochen, spielt eine wichtige Rolle in der Therapie der Osteoporose und der Sarkopenie. Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Effekt verschiedene Osteoporosetherapien auf den Skelettmuskel haben. Dabei wurde der Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibrationstherapie mit einer Frequenz von 35 Hz untersucht sowie der Einfluss des Bisphosphonats Alendronat. Zusätzlich sollte als mögliche Alternative zur herkömmlichen Hormonersatztherapie der Einfluss des Phytoöstrogens 8-Prenylnaringenin (8-PN) aus dem Hopfen untersucht werden. Als Versuchsmodell wurde die ovariektomierte Ratte genutzt, um so den Zustand einer Postmenopause mit induzierter Osteoporose nachzustellen.

Drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten wurden ovariektomiert (n = 69) oder intakt gelassen (n = 11). Nach fünf Wochen wurden die ovariektomierten Ratten in eine Kontrollgruppe (OVX), eine Vibrationsgruppe (VIB), eine Alendronatgruppe (Alendronat), eine Kombinationsgruppe aus Alendronat und Vibration (Alendronat+VIB), eine 8-PN-Gruppe (8-PN) sowie eine Kombinationsgruppe aus 8-PN und Vibration (8-PN+VIB) aufgeteilt. Die Vibration wurde fünfmal pro Woche - zweimal täglich für 15 Minuten - angewendet. Das Alendronat wurde kontinuierlich dem Soja-freien Futter beigemengt und in einer berechneten Dosis von 0,59 mg / kg KG (Alendronat) und 0,57 mg / kg KG (Alendronat + VIB) aufgenommen. 8-PN wurde subkutan in einer Dosierung von 1,77 mg / kg KG sieben Mal pro Woche verabreicht. Die Behandlungen erfolgten für 10 Wochen. Nach der fünften Woche erfolgte eine Osteotomie und -synthese beider Tibiae der Tiere, um in einer anderen Studie die Frakturheilung zu erforschen. Nach der Obduktion wurden randomisiert entweder der rechte oder der linke M. longissimus, der M. gastrocnemius sowie der M. soleus aller Versuchstiere entnommen, gewogen, präpariert und histologisch ausgewertet. Die Faserfläche, der Faserdurchmesser sowie die Kapillardichte wurden dabei analysiert.

Obwohl es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe gab, war die Tendenz zur Faserflächenvergrößerung durch die vertikale Ganzkörpervibrationstherapie bedeutend. Alle drei Fasertypen der untersuchten Muskeln hatten sowohl bei alleiniger Vibrationstherapie als auch in Kombination mit Alendronat beziehungsweise 8-PN eine Vergrößerung der Faserfläche und des Durchmessers zur Folge. Eine höhere Frequenz könnte vermutlich deutlichere Ergebnisse erzielen. Die Vibrationstherapie hatte auf die Kapillardichte des Muskels der Ratte keinen signifikanten Effekt.

Die Alendronatbehandlung hatte eine Reduktion der Faserflächen und -durchmesser zur Folge. Dies war vor allem an den intermediären und oxidativen Fasern des M. longissimus und geringfügig an den Fasern des M. gastrocnemius zu beobachten. Des Weiteren erhöhte Alendronat signifikant die Kapillardichte am M. longissimus sowie am M. soleus und hat daher einen positiven Einfluss auf die Blutzufuhr des murinen Muskels.

Die Gewichtszunahme der Ratten durch die Ovariektomie wurde durch die Behandlung mit 8-Prenylnaringenin verhindert. Dieser Effekt war am auffälligsten in Kombination mit der Vibrationstherapie. Ebenfalls konnte die Gabe von 8-PN die Muskelzunahme des M. gastrocnemius nach Ovariektomie aufhalten. Weiterhin reduzierte 8-PN signifikant die Faserfläche und den Durchmesser der glykolytischen und intermediären Fasern des M. gastrocnemius und erhöhte signifikant die Kapillardichte des M. soleus, wobei es dementsprechend die Sauer- und Nährstoffversorgung des Wadenmuskels verbesserte. Als mögliche Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie ist der Einfluss von 8-PN vielversprechend, sollte jedoch zur optimalen Dosis- und Behandlungsdauerfindung und zur Sicherheit bei der Anwendung am Menschen weiter erforscht werden.

7 Summary

Osteoporosis with reduced bone density and sarcopenia with loss of muscle strength are the most prevalent diseases in the older segment of the population and are responsible for an increased risk of falls and fractures (Roubenoff and Hughes 2000).

Fractures in old age are known to have far-reaching consequences leading to increased morbidity, disability, mortality and high monetary expenditures (Cruz-Jentoft et al. 2010).

The musculoskeletal system as the combination of muscle and bone plays a vital role in the treatment of osteoporosis and sarcopenia. The aim of this study was to find out what effects certain osteoporosis therapies have on skeletal muscle. The influence of vertical whole-body vibration therapy with a frequency of 35 Hz and of the bisphosphonate alendronate was studied. Additionally, as an alternative to conventional hormone replacement therapy, the influence of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin (8-PN) extracted from the common hop was examined. Ovariectomized rats were used as experimental models to recreate the state of postmenopause with induced osteoporosis.

Three-month-old Sprague-Dawley-rats were ovariectomized (n = 69) or left intact (n = 11). After five weeks the ovariectomized rats were divided into a control group (OVX), a vibration group (VIB), an alendronate group (alendronate), a combination group of alendronate and vibration (alendronate + VIB), an 8-PN group (8-PN), and a combination group of 8-PN and vibration (8-PN + VIB). The vibration was applied five times per week, twice a day for 15 minutes. The alendronate was given along continuously with the soy-free food in a calculated dosage of 0,59 milligram (alendronate) and 0,57 milligram (alendronate + VIB) per kilogram bodyweight. 8-PN was administered subcutaneously in a dosage of 1,77 milligram per kilogram bodyweight seven times a week. All treatments were applied for 10 weeks. After five weeks an osteotomy was done on both tibiae in all rats to examine fracture healing as part of another research study. After the autopsy, either the left or right

longissimus, gastrocnemius and soleus muscles of all animals were extracted, weighed, dissected and histologically evaluated. The fibre surface area and diameter as well as the capillary density were analysed.

Although there was no significant difference between the control group and the VIB group, the tendency to fibre area enlargement due to vertical whole-body vibration therapy was notable. All three types of fibres of the examined muscles showed an increase in fibre surface area and diameter following vibration therapy on its own or following the combination of vibration therapy and alendronate or 8-PN. A higher vibration frequency could probably achieve more evident results. The vibration therapy had no effect on the capillary density of the rat muscle.

Treatment with alendronate resulted in a slight reduction of fibre surface area and diameter. This was observed especially in the intermediate and oxidative fibres of the longissimus muscle and in the fibres of the gastrocnemius muscle. Furthermore, alendronate significantly increased the capillary density in the longissimus and the soleus muscles and thus had a positive impact on the blood supply of the rat muscle.

The weight gain of the rats due to the hormonal changes following ovariectomy was prevented by the treatment with 8-PN. This effect was most prominent when 8-PN-treatment was combined with vibration therapy. Furthermore, administration of 8-PN inhibited muscle growth in the gastrocnemius muscle following ovariectomy. Additionally, 8-PN significantly reduced the fibre surface area and the diameter of the glycolytic and partly of the intermediate fibres of the gastrocnemius muscle and significantly increased the capillary density of the soleus, which accordingly improves oxygen and nutrient supply to the calf muscle. As a possible alternative to traditional hormone replacement therapy, 8-PN is promising. However, the treatment needs to be further studied with regard to optimal dosage, duration of administration and safety in human use.

8 Literaturverzeichnis

- Alakangas A, Selander K, Mulari M, Halleen J, Lehenkari P, Mönkkönen J, Salo J, Väänänen K (2002): Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. Calcif Tissue Int <u>70</u>, 40–47
- Aloia JF, McGowan DM, Vaswani AN, Ross P, Cohn SH (1991): Relationship of menopause to skeletal and muscle mass. Am J Clin Nutr <u>53</u>, 1378–1383
- Andersen P (1975): Capillary density in skeletal muscle of man. Acta Physiol Scand <u>95</u>, 203– 205
- Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR (1973): Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. J Histochem Cytochem <u>21</u>, 51–55
- Barnard RJ, Peter JB (1971): Effect of exercise on skeletal muscle. 3. Cytochrome changes. J Appl Physiol <u>31</u>, 904–908
- Bartl R: Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2010
- Bautmans I, Hees EV, Lemper J-C, Mets T (2005): The feasibility of whole body vibration in institutionalised elderly persons and its influence on muscle performance, balance and mobility: a randomised controlled trial [ISRCTN62535013]. BMC Geriatrics <u>5</u>, 17
- Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F (2014): The pros and cons of plant estrogens for menopause. J Steroid Biochem Mol Biol <u>139</u>, 225–236
- Berg BN, Harmison CR (1957): Growth, disease, and aging in the rat. J Gerontol 12, 370–377
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Stryer Biochemie. 6. Aufl. 2007, korr. Nachdruck 2010; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009
- Billeter R, Weber H, Lutz H, Howald H, Eppenberger HM, Jenny E (1980): Myosin types in human skeletal muscle fibers. Histochemistry <u>65</u>, 249–259
- Bogaerts A, Delecluse C, Claessens AL, Coudyzer W, Boonen S, Verschueren SMP (2007): Impact of Whole-Body Vibration Training Versus Fitness Training on Muscle Strength

and Muscle Mass in Older Men: A 1-Year Randomized Controlled Trial. J Gerontol A Biol Sci Med Sci <u>62</u>, 630–635

- Bolca S, Possemiers S, Maervoet V, Huybrechts I, Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, De Henauw S, et al. (2007): Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women. Br J Nutr <u>98</u>, 950–959
- Booth FW, Tipton CM (1969): Effects of training and 17-B estradiol upon heart rates, organ weights, and ligamentous strength of female rats. Int Z Angew Physiol <u>27</u>, 187–197
- Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ (1994): Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres.
 J Physiol (Lond) <u>481 (Pt 3)</u>, 663–675
- Böttner M, Christoffel J, Wuttke W (2008): Effects of long-term treatment with 8prenylnaringenin and oral estradiol on the GH-IGF-1 axis and lipid metabolism in rats. J Endocrinol <u>198</u>, 395–401
- Brooke MH, Kaiser KK (1970): Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol <u>23</u>, 369–379
- Busch C, Noor S, Leischner C, Burkard M, Lauer UM, Venturelli S (2015): Anti-proliferative activity of hop-derived prenylflavonoids against human cancer cell lines. Wien Med Wochenschr <u>165 (11-12)</u>, 258-61
- Cavalcanti-de-Albuquerque JPA, Salvador IC, Martins EL, Jardim-Messeder D, Werneck-de-Castro JPS, Galina A, Carvalho DP (2014): Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. J Appl Physiol <u>116</u>, 779–789
- Chen G-X, Zheng S, Qin S, Zhong Z-M, Wu X-H, Huang Z-P, Li W, Ding R-T, Yu H, Chen J-T (2014a): Effect of low-magnitude whole-body vibration combined with alendronate in ovariectomized rats: a random controlled osteoporosis prevention study. PLoS ONE <u>9</u>, e96181
- Chen J, Liu X (2014): [Effects on blood fat and bone density of postmenopausal women fed by soy protein with isoflavone]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi <u>94</u>, 215–217

- Chen W, Becker T, Qian F, Ring J (2014): Beer and beer compounds: physiological effects on skin health. J Eur Acad Dermatol Venereol <u>28</u>, 142–150
- Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL (2015): Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. Nat Rev Drug Discov <u>14</u>, 58–74
- Cottier H: Pathogenese: Ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2013
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel J-P, Rolland Y, Schneider SM, et al. (2010): Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing <u>39</u>, 412–423
- Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J: Physiologie. 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2004
- Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, Schwab P, Metz P, Vollmer G (2004): Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. Planta Med <u>70</u>, 39–44
- Drenckhahn D: Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. 17. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2008
- Dubowitz V, Pearse AG (1960): A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. Z Zellforch Microsk Anat Histochem <u>2</u>, 105–117
- Durazzo A, Carcea M, Adlercreutz H, Azzini E, Polito A, Olivieri L, Zaccaria M, Meneghini C, Maiani F, Bausano G, et al. (2014): Effects of consumption of whole grain foods rich in lignans in healthy postmenopausal women with moderate serum cholesterol: a pilot study. Int J Food Sci Nutr <u>65</u>, 637–645
- DVO-Leitlinie (2014): DVO Leitlinie Osteoporose 2014 Kurzfassung und Langfassung. <u>http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202014/DVO-</u> <u>Leitlinie%20Osteoporose%202014%20Kurzfassung%20und%20Langfassung%20Versi</u> <u>on%201a%2012%2001%202016.pdf</u>, Zugriff am 05.05.2016.

- Ebermann R, Elmadfa I: Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer Vienna, Wien 2011
- Edgerton VR, Simpson DR (1969): The Intermediate Muscle Fiber of Rats and Guinea Pigs. J Histochem Cytochem <u>17</u>, 828–838
- Egginton S (2011): Physiological factors influencing capillary growth. Acta Physiol (Oxf) 202, 225–239
- Erkkola R, Vervarcke S, Vansteelandt S, Rompotti P, De Keukeleire D, Heyerick A (2010): A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. Phytomedicine <u>17</u>, 389–396
- Fisher JS, Kohrt WM, Brown M (2000): Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. J Appl Physiol <u>88</u>, 265–271
- Flieger J, Karachalios T, Khaldi L, Raptou P, Lyritis G (1998): Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>63</u>, 510–514

Folkman J, Klagsbrun M (1987): Angiogenic factors. Science 235, 442–447

- Games KE, Sefton JM, Wilson AE (2015): Whole-body vibration and blood flow and muscle oxygenation: a meta-analysis. J Athl Train <u>50</u>, 542–549
- Garman R, Rubin C, Judex S (2007): Small oscillatory accelerations, independent of matrix deformations, increase osteoblast activity and enhance bone morphology. PLoS ONE <u>2</u>, e653
- Gauthier GF, Padykula HA (1966): Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. J Cell Biol <u>28</u>, 333–354
- Girardi A, Piccinni C, Raschi E, Koci A, Vitamia B, Poluzzi E, De Ponti F (2014): Use of phytoestrogens and effects perceived by postmenopausal women: result of a questionnaire-based survey. BMC Complement Altern Med <u>14</u>, 262
- Goerke K, Steller J, Valet A: Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe: mit Zugang zum Elsevier-Portal. 8. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2012

- Gruber B, Cohen L, Blix PM (1982): Specific cytosol binding of diethylstilbestrol in rat skeletal muscle. Steroids <u>39</u>, 479–495
- Guo J, Nikolic D, Chadwick LR, Pauli GF, van Breemen RB (2006): Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (Humulus lupulus L.). Drug Metab Dispos 34, 1152–1159
- Guy JA, Shea M, Peter CP, Morrissey R, Hayes WC (1993): Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in the rat results in increases in bone mass and mechanical properties. Calcif Tissue Int <u>53</u>, 283–288
- Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. Dtsch Arztebl Int <u>110</u>, 52–57
- Helle J, Kräker K, Bader MI, Keiler AM, Zierau O, Vollmer G, Welsh J, Kretzschmar G (2014): Assessment of the proliferative capacity of the flavanones 8-prenylnaringenin, 6-(1.1-dimethylallyl)naringenin and naringenin in MCF-7 cells and the rat mammary gland. Mol Cell Endocrinol <u>392</u>, 125–135
- Herold G: Innere Medizin 2015. Herold, Köln 2014
- Hoppeler H, Mathieu O, Krauer R, Claassen H, Armstrong RB, Weibel ER (1981): Design of the mammalian respiratory system. VI Distribution of mitochondria and capillaries in various muscles. Respir Physiol <u>44</u>, 87–111
- Horák V (1983): A successive histochemical staining for succinate dehydrogenase and "reversed"-ATPase in a single section for the skeletal muscle fibre typing. Histochemistry <u>78</u>, 545–553
- Hudlická O (1985): Development and adaptability of microvasculature in skeletal muscle. J Exp Biol <u>115</u>, 215–228
- Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, Schleuning W-D (2005):
 Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. J Steroid Biochem Mol Biol <u>97</u>, 299–305

- Huxley HE (1953): Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle. Biochim Biophys Acta <u>12</u>, 387–394
- Jaroenporn S, Urasopon N, Watanabe G, Malaivijitnond S (2014): Improvements of vaginal atrophy without systemic side effects after topical application of Pueraria mirifica, a phytoestrogen-rich herb, in postmenopausal cynomolgus macaques. J Reprod Dev <u>60</u>, 238–245
- Jiang JMY, Sacco SM, Ward WE (2008): Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. J Nutr <u>138</u>, 2106–2110
- Junqueira LC, Carneiro J: Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. 4. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013
- Kaastad TS, Nordsletten L, Narum S, Madsen JE, Haug E, Reikerås O (1996): Training increases the in vivo fracture strength in osteoporotic bone. Protection by muscle contraction examined in rat tibiae. Acta Orthop Scand <u>67</u>, 371–376
- Kaastad TS, Huiskes R, ReikerAs O, Nordsletten L (2000): Effects of hormonal conditions and drugs on both muscle and bone strength can be assessed in a single rat test. Bone <u>26</u>, 355–360
- 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. J Muscle Res Cell Motil <u>23</u>, 335–339
- Kaeding TS (2009): [Sarcopenia and whole body vibration training: an overview]. Z Gerontol Geriatr <u>42</u>, 88–92
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner <u>15</u>, 175–191
- Kaneguchi A, Ozawa J, Kawamata S, Kurose T, Yamaoka K (2014): Intermittent whole-body vibration attenuates a reduction in the number of the capillaries in unloaded rat skeletal muscle. BMC Musculoskelet Disord <u>15</u>, 315
- Keiler AM, Dörfelt P, Chatterjee N, Helle J, Bader MI, Vollmer G, Kretzschmar G, Kuhlee F, Thieme D, Zierau O (2015): Assessment of the effects of naringenin-type flavanones in uterus and vagina. J Steroid Biochem Mol Biol <u>145</u>, 49–57

- Keller D: Die einfaktorielle Varianzanalyse in SPSS: Output, Darstellung, Interpretation, http://www.statistik-und-beratung.de/2014/09/die-einfaktorielle-varianzanalyse-inspss-output-darstellung-interpretation/; Zugriff am 12.10.2016
- Keul J, Doll E, Keppler D: Muskelstoffwechsel : Die Energiebereitstellung im Skelettmuskel als Grundlage seiner Funktion. J. A. Barth, München 1969

Klinke R: Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010

- Klinke R, Silbernagl S, Pape HC, Bauer C, Brenner B, Bruggencate G ten: Physiologie: Ideal für die neue AO. 5., vollst. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart u.a. 2005
- Kobori M, Yamamuro T (1989): Effects of gonadectomy and estrogen administration on rat skeletal muscle. Clin Orthop Relat Res 306–311
- Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2010): Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? Calcif Tissue Int <u>86</u>, 23–32
- Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. J Endocrinol <u>201</u>, 253–262
- Komrakova M, Krischek C, Wicke M, Sehmisch S, Tezval M, Rohrberg M, Brandsch T, Stuermer KM, Stuermer EK (2011): Influence of intermittent administration of parathyroid hormone on muscle tissue and bone healing in orchiectomized rats or controls. J Endocrinol <u>209</u>, 9–19
- 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. Calcif Tissue Int <u>92</u>, 509–520
- Königshoff M, Brandenburger T: Kurzlehrbuch Biochemie. 2., überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 2007
- Königshoff M, Brandenburger T: Kurzlehrbuch Biochemie. 3., überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 2012

- Krischek C: Beschaffenheit, Struktur und biochemische Eigenschaften von Fleisch verschiedener Nutztierspezies und die Beeinflussung durch endogene Faktoren. Med. Vet. Habil.-Schr. Hannover 2013
- Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Karayannakos P (2001): Estrogen stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle in rabbits. Circulation <u>103</u>, E107–108
- Leeuw T, Pette D (1994): Kinetic microphotometric evaluation of in situ hybridization for mRNA of slow myosin heavy chain in type I and C fibres of rabbit muscle. Histochemistry <u>102</u>, 105–112
- Lemoine S, Granier P, Tiffoche C, Berthon PM, Thieulant M-L, Carré F, Delamarche P (2002): Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. Acta Physiol Scand <u>175</u>, 211–217
- Linß W, Fanghänel J: Histologie. 1. Auflage; Gruyter, Berlin u.a. 1998
- Luglio HF (2014): Estrogen and body weight regulation in women: the role of estrogen receptor alpha (ER- α) on adipocyte lipolysis. Acta Med Indones <u>46</u>, 333–338
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie, 4. vollständig überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2012
- Luo D, Kang L, Ma Y, Chen H, Kuang H, Huang Q, He M, Peng W (2014): Effects and mechanisms of 8-prenylnaringenin on osteoblast MC3T3-E1 and osteoclast-like cells RAW264.7. Food Sci Nutr <u>2</u>, 341–350
- Lutz H, Weber H, Billeter R, Jenny E (1979): Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits. Nature <u>281</u>, 142–144
- Maddalozzo GF, Iwaniec UT, Turner RT, Rosen CJ, Widrick JJ (2008): Whole-body vibration slows the acquisition of fat in mature female rats. Int J Obes (Lond) <u>32</u>, 1348–1354
- McClung JM, Davis JM, Wilson MA, Goldsmith EC, Carson JA (2006): Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. Journal of Applied Physiology <u>100</u>, 2012–2023
- McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE, Brazeau GA (2004): Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. J Muscle Res Cell Motil <u>25</u>, 21–27

- Meijer AE (1970): Histochemical method for the demonstration of myosin adenosine triphosphatase in muscle tissues. Histochemie <u>22</u>, 51–58
- Messina M (2014): Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. Am J Clin Nutr <u>100 Suppl 1</u>, 423S–30S
- Moline SW, Glenner GG (1964): Ultrarapid Tissue Freezing in Liquid Nitrogen. J Histochem Cytochem <u>12</u>, 777–783
- Morales-Lopez JL, Agüera E, Rodriguez-Barbudo MV, Diz A (1990): [Adaptation of the fibrillar composition of the lumbar longissimus muscle to resistance training]. Anat Histol Embryol <u>19</u>, 369–377
- Mukai R, Horikawa H, Fujikura Y, Kawamura T, Nemoto H, Nikawa T, Terao J (2012): Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice. PLoS ONE <u>7</u>, e45048
- Mulisch M, Welsch U: Romeis Mikroskopische Technik. Springer-Verlag, Berlin u.a. 2010
- Negrão R, Costa R, Duarte D, Taveira Gomes T, Mendanha M, Moura L, Vasques L, Azevedo I, Soares R (2010): Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. J Cell Biochem <u>111</u>, 1270–1279
- Nielsen B, Wegener HC (1997): Public health and pork and pork products: regional perspectives of Denmark. Rev Off Int Epizoot <u>16</u>, 513–524
- Noh KK, Chung KW, Sung B, Kim MJ, Park CH, Yoon C, Choi JS, Kim MK, Kim CM, Kim ND, Chung HY (2015): Loquat (Eriobotrya japonica) extract prevents dexamethasoneinduced muscle atrophy by inhibiting the muscle degradation pathway in Sprague Dawley rats. Mol Med Rep 3607–3614
- Novikoff AB, Shin WY, Drucker J (1961): Mitochondrial localization of oxidative enzymes: staining results with two tetrazolium salts. J Biophys Biochem Cytol <u>9</u>, 47–61
- Novotny SA, Warren GL, Hamrick MW (2015): Aging and the muscle-bone relationship. Physiology (Bethesda) <u>30</u>, 8–16
- Overk CR, Guo J, Chadwick LR, Lantvit DD, Minassi A, Appendino G, Chen S-N, Lankin DC, Farnsworth NR, Pauli GF, et al. (2008): In vivo estrogenic comparisons of Trifolium

pratense (red clover) Humulus lupulus (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. Chem Biol Interact <u>176</u>, 30–39

- Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE (1972): Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry <u>11</u>, 2627–2633
- Pette D (2002): The adaptive potential of skeletal muscle fibers. Can J Appl Physiol <u>27</u>, 423– 448
- Pette D, Staron RS (1990): Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev Physiol Biochem Pharmacol <u>116</u>, 1–76
- Petzold J: Parameter des Muskelenergiestoffwechsels in genetisch differenten Schweinen. Diss. med. vet. Hannover 2006
- Piccone CM, Brazeau GA, McCormick KM (2005): Effect of oestrogen on myofibre size and myosin expression in growing rats. Exp Physiol <u>90</u>, 87–93
- Poluzzi E, Piccinni C, Raschi E, Rampa A, Recanatini M, De Ponti F (2014): Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. Curr Med Chem <u>21</u>, 417–436
- Rahn B (1976): The fluorochrome sequence labelling of the bone. Nova Acta Leopold 249– 255
- Raiteri M, Arnaboldi L, McGeady P, Gelb MH, Verri D, Tagliabue C, Quarato P, Ferraboschi P, Santaniello E, Paoletti R, et al. (1997): Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation. J Pharmacol Exp Ther <u>281</u>, 1144–1153
- Ranvier, Louis-Antoine (1873): Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. C R Acad Sci Paris <u>77</u>, 1030 1034
- Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K: Duale Reihe Biochemie, 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2012
- Richard D (1986): Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol <u>250</u>, R245–R249

- Romanul FC (1964): Enzymes in Muscle. I. Histochemical Studies of Enzymes in Individual Muscle Fibers. Arch Neurol <u>11</u>, 355–358
- Roubenoff R, Hughes VA (2000): Sarcopenia: current concepts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 55, M716–724
- Rubin C, Judex S, Qin Y-X (2006): Low-level mechanical signals and their potential as a nonpharmacological intervention for osteoporosis. Age Ageing <u>35 Suppl 2</u>, ii32–ii36
- Ruß A: Arzneimittel pocket 2015. 20. aktual. u. erw. Auflage; Börm Bruckmeier, München 2014
- Sanchez B, Li J, Bragos R, Rutkove SB (2014): Differentiation of the intracellular structure of slow- versus fast-twitch muscle fibers through evaluation of the dielectric properties of tissue. Phys Med Biol <u>59</u>, 2369–2380
- Sasa T, Sairyo K, Yoshida N, Ishikawa M, Fukunaga M, Yasui N (2004): Muscular Oxidative Capacity in Ovariectomized Rats Discussion on the Endurance Performance of Female Athletes with Sports-Related-Amenorrhea. J Sports Sci Med <u>3</u>, 15–22
- Schneider AG: Frühe Veränderungen der Genexpression im schnellen m. Tibialis anterior der Ratte bei chronisch niederfrequenter Elektrostimulation. Diss. rer. nat. Konstanz 1999
- Schwartz-Giblin S, Rosello L, Pfaff DW (1983): A histochemical study of lateral longissimus muscle in rat. Exp Neurol <u>79</u>, 497–518
- Sehmisch S, Komrakova M, Kottwitz L, Dullin C, Schmelz U, Stuermer, K. M. (2015): Effects of urocortin on spine? Osteologie <u>24</u>, 99–106
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2013): Plant derived alternatives for hormone replacement therapy (HRT). Horm Mol Biol Clin Investig <u>16</u>, 35–45
- Shinoda M, Latour MG, Lavoie J-M (2002): Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. Int J Obes Relat Metab Disord <u>26</u>, 335–343
- Stark H: Die 3D-Architektur der Muskelfaszikel in ausgewählten Muskeln und ihre Relevanz zur Kraftentwicklung. Diss. rer. nat. Jena 2008

- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999): Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. Histochem Cell Biol <u>111</u>, 117–123
- Stevens JF, Page JE (2004): Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry <u>65</u>, 1317–1330
- Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM (2010a): Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. Langenbecks Arch Surg <u>395</u>, 163–172
- Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, et al. (2010b): Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. Calcif Tissue Int <u>87</u>, 168–180
- Stuermer EK, Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Dullin C, Schaefer N, Hallecker J, Stuermer KM (2014): Whole body vibration during fracture healing intensifies the effects of estradiol and raloxifene in estrogen-deficient rats. Bone <u>64</u>, 187–194
- Tarantino U, Piccirilli E, Fantini M, Baldi J, Gasbarra E, Bei R (2015): Sarcopenia and fragility fractures: molecular and clinical evidence of the bone-muscle interaction. J Bone Joint Surg Am <u>97</u>, 429–437
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone <u>17</u>, 1255–133S
- Tienboon P, Jaruwangsanti N (2014): A prospective analytical study of the effects and adverse events of alendronate (Aldren70) treatment in Thai postmenopausal women. J Med Assoc Thai <u>97</u>, 621–628
- Toth MJ, Poehlman ET, Matthews DE, Tchernof A, MacCoss MJ (2001): Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab <u>280</u>, E496–501
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD (2001): Animal models for osteoporosis. Rev Endocr Metab Disord <u>2</u>, 117–127
- Ulfig N: Kurzlehrbuch Histologie. 2., korr. Auflage; Thieme, Stuttgart 2005

- Velders M, Diel P (2013): How sex hormones promote skeletal muscle regeneration. Sports Med <u>43</u>, 1089–1100
- Velders M, Schleipen B, Fritzemeier KH, Zierau O, Diel P (2012): Selective estrogen receptor- β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. FASEB J <u>26</u>, 1909– 1920
- Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S (2004): Effect of 6-Month Whole Body Vibration Training on Hip Density, Muscle Strength, and Postural Control in Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Pilot Study. J Bone Miner Res <u>19</u>, 352–359
- Visser M, Harris TB, Fox KM, Hawkes W, Hebel JR, Yahiro JY, Michael R, Zimmerman SI, Magaziner J (2000): Change in muscle mass and muscle strength after a hip fracture: relationship to mobility recovery. J Gerontol A Biol Sci Med Sci <u>55</u>, M434–440
- Wade GN (1972): Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. Physiol Behav <u>8</u>, 523–534
- Wehrle E, Liedert A, Heilmann A, Wehner T, Bindl R, Fischer L, Haffner-Luntzer M, Jakob F, Schinke T, Amling M, Ignatius A (2015): The impact of low-magnitude highfrequency vibration on fracture healing is profoundly influenced by the oestrogen status in mice. Dis Model Mech <u>8</u>, 93–104
- Welsch U: Sobotta Lehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2010
- 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 <u>14</u>, 528–534
- Wigston DJ, English AW (1992): Fiber-type proportions in mammalian soleus muscle during postnatal development. J Neurobiol <u>23</u>, 61–70
- Wiik A: Estrogen Receptors in Skeletal Muscle Expression and Activation. Diss. Ph.D. Stockholm 2008
- Wiik A, Ekman M, Morgan G, Johansson O, Jansson E, Esbjörnsson M (2005): Oestrogen receptor beta is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. Histochem Cell Biol <u>124</u>, 161–165

- Wolfe RR (2006): The underappreciated role of muscle in health and disease. Am J Clin Nutr 84, 475–482
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. JAMA <u>288</u>, 321–333
- Wuttke W, Jarry H, Haunschild J, Stecher G, Schuh M, Seidlova-Wuttke D (2014): The nonestrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (Cimicifuga or Actaea racemosa). J Steroid Biochem Mol Biol <u>139</u>, 302–310
- Xie L, Rubin C, Judex S (2008): Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibrations. J Appl Physiol <u>104</u>, 1056–1062
- Zierau O, Kretzschmar G, Möller F, Weigt C, Vollmer G (2008): Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. Mol Cell Endocrinol <u>294</u>, 92–99
- Żołnierczyk AK, Mączka WK, Grabarczyk M, Wińska K, Woźniak E, Anioł M (2015): Isoxanthohumol - Biologically active hop flavonoid. Fitoterapia <u>103</u>, 71–82
9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Muskulatur5
Abbildung 2: Vereinfachter Aufbau eines Sarkomers7
Abbildung 3: Der Querbrückenzyklus: die Interaktion von Aktin und Myosin während der Muskelkontraktion
Abbildung 4: chemische Strukturformeln von Xanthohumol (A), Isoxanthohumol (B) und 8-Prenylnaringenin (C)
Abbildung 5: Versuchsablauf mit Darstellung der Behandlungseinheiten24
Abbildung 6: Haltungskäfige vom Typ Makrolon [®] IV26
Abbildung 7: Ligatur des murinen Ovars während der Ovariektomie27
Abbildung 8: Ganzkörpervibration der Versuchstiere in der Vibrationsschale
Abbildung 9: Frequenzumrichter Commander SE, eingestellt auf eine Frequenz von 35 Hz
Abbildung 10: M. gastrocnemius und M. soleus gekennzeichnet am Hinterbein des Versuchstieres (<i>Rattus norvegicus</i>)
Abbildung 11: Schematische Darstellung des M. longissimus beim Versuchstier (Rattus norvegicus)
Abbildung 12: Verschiedene Muskelfasertypen im M. longissimus der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)
Abbildung 13: Oxidative Muskelfasern im M. soleus der Ratte (Rattus norvegicus)
Abbildung 14: Amylase-PAS-Färbung des M. gastrocnemius der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>) mit Darstellung der Kapillaren und Basalmembranen

Abbildung 15: Körpergewichtskurven mit Darstellung der Mittelwerte über den
Versuchs-zeitraum von der Ovariektomie (Woche 0) bis zum Versuchsende
(Woche 15)43
Abbildung 16: Futteraufnahmekurven mit Darstellung der Mittelwerte pro Versuchstier
und pro Tag über den Versuchszeitraum Woche 1 bis 1543
Abbildung 17: Alendronataufnahmekurven mit Darstellung der Mittelwerte und
Standardabweichungen pro Versuchstier und pro Tag über den
Behandlungszeitraum Woche 5 bis 15
Abbildung 18: Uterusgewichte der Versuchstiere in Gramm (g) bei Versuchsende
(Woche 15)45
Abbildung 19: Gewichte des M. gastrocnemius in Gramm (g) zum Versuchsende46
Abbildung 20: Verhältnis des Gewichts des M. gastrocnemius in Gramm (g) zum
Körpergewicht des Versuchstieres in Gramm (g) zum Versuchsende46
Abbildung 21: Gewicht des M. soleus in Gramm (g) zum Versuchsende47
Abbildung 22: Verhältnis des Gewichts des M. soleus in Gramm (g) zum Körpergewicht
des Tieres in Gramm (g) zum Versuchsende47
Abbildung 23: Korrelation zwischen Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g) und
M. gastrocnemius in Gramm (g)48
Abbildung 24: Korrelation zwischen Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g) und
M. soleus in Gramm (g)48
Abbildung 25: Kreatinkinase-Konzentrationen (U / I) im Serum der Versuchstiere zum
Versuchsende49
Abbildung 26: Flächen der glykolytischen Fasern des M. longissimus in μm^2 51
Abbildung 27: Verhältnis der Flächen der glykolytischen Fasern des M. longissimus in
μm ² zum Körpergewicht der Ratte in g51
Abbildung 28: Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. longissimus in µm51

Abbildung 29: Verhältnis der Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. longissimus
in μm zum Körpergewicht der Ratte in g52
Abbildung 30: Flächen der intermediären Fasern des M. longissimus in μm^2 53
Abbildung 31: Verhältnis der Flächen der intermediären Fasern des M. longissimus in
μm ² zum Körpergewicht der Ratte in g53
Abbildung 32: Durchmesser der intermediären Fasern des M. longissimus in μm 53
Abbildung 33: Verhältnis der Durchmesser der intermediären Fasern des M.
longissimus in μ m zum Körpergewicht der Ratte in g54
Abbildung 34: Flächen der oxidativen Fasern des M. longissimus in μm^2
Abbildung 35: Verhältnis der Flächen der oxidativen Fasern des M. longissimus in μm^2
zum Körpergewicht der Ratte in g55
Abbildung 36: Durchmesser der oxidativen Fasern des M. longissimus in μ m55
Abbildung 37: Verhältnis der Durchmesser der oxidativen Fasern des M. longissimus in
μm zum Körpergewicht der Ratte in g56
Abbildung 38: Flächen der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in μm^2 57
Abbildung 39: Verhältnis der Flächen der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in
μm ² zum Körpergewicht der Ratte in g57
Abbildung 40: Durchmesser der glykolytischen Fasern des M. gastrocnemius in μ m58
Abbildung 41: Verhältnis der Durchmesser der glykolytischen Fasern des M.
gastrocnemius in μm zum Körpergewicht der Ratte in g58
Abbildung 42: Flächen der intermediären Fasern des M. gastrocnemius in μm^2 59
Abbildung 43: Verhältnis der Flächen der intermediären Fasern des M. gastrocnemius
in μm ² zum Körpergewicht der Ratte in g59
Abbildung 44: Durchmesser der intermediären Fasern des M. gastrocnemius in μm 60
Abbildung 45: Verhältnis der Durchmesser der intermediären Fasern des M.
gastrocnemius in μm zum Körpergewicht der Ratte in g60

Abbildung 46: Flächen der oxidativen Fasern des M. soleus in μm^2 61
Abbildung 47: Verhältnis der Flächen der oxidativen Fasern des M. soleus in μm^2 zum
Körpergewicht der Ratte in g62
Abbildung 48: Durchmesser der oxidativen Fasern des M. soleus in μm 62
Abbildung 49: Verhältnis der Durchmesser der oxidativen Fasern des M. soleus in μ m
zum Körpergewicht der Ratte in g63
Abbildung 50: Die Kapillardichte in einem 1 mm ² -Ausschnitt des M. longissimus64
Abbildung 51: Verhältnis der Kapillardichte des M. longissimus zum Körpergewicht der
Ratte in g64
Abbildung 52: Die Kapillardichte in einem 1 mm ² -Ausschnitt des M. gastrocnemius65
Abbildung 53: Verhältnis der Kapillardichte des M. gastrocnemius zum Körpergewicht
der Ratte in g65
Abbildung 54: Die Kapillardichte in einem 1mm ² -Ausschnitt des M. soleus66
Abbildung 55: Verhältnis der Kapillardichte des M. soleus zum Körpergewicht der
Ratte in g66

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Muskulaturarten	4
Tabelle 2: Unterschiedliche Nomenklaturen der verschiedenen Muskelfasertypen	12
Tabelle 3: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen mit endgültiger Anzahl	23
Tabelle 4: Körpergewichte	114
Tabelle 5: Futteraufnahme	115
Tabelle 6: Alendronat-Dosisaufnahme	116
Tabelle 7: Uterusgewichte	116
Tabelle 8: M. gastrocnemius-Gewicht	117
Tabelle 9: M. soleus-Gewicht	117
Tabelle 10: Kreatinkinase-Konzentrationen	118
Tabelle 11: Faserflächen und -durchmesser	118
Tabelle 12: Kapillardichte	123

11 Anhang

11.1 Rezepturen für die mATPase-Färbung

Folgende Lösungen wurden frisch angesetzt. Die Nummerierung entspricht der Stationsbezeichnung im Färbeverlauf. Eine Küvette entspricht hier allgemein einem Färbebehältnis für 14 Objektträger mit einem Fassungsvermögen von 60 ml. Je nachdem wie viele Objektträger man gleichzeitig färben wollte, entschied man sich für eine, zwei oder drei Küvetten mit entsprechender Mengenangabe.

1.) Fixierungslösung nach Meijer (1970)

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH + Co. KG,			
Karlsruhe, Deutschland)	0,6 g	1,2 g	1,8 g
CaCl2-2-hydrat (Sigma-Aldrich Laborchemikalien			
GmbH, Seelze, Deutschland)	0,588 g	1,176 g	1,764 g
Saccharose (AppliChem GmbH, Darmstadt,			
Deutschland)	3,6 g	7,2 g	10,8 g
Aqua dest.	60 ml	120 ml	180 ml

Aqua dest. wurde als letztes Agens dazugegeben. Der pH-Wert von 6,3 - 6,6 wurde kurz vor der Benutzung mittels Titrierung eingestellt. Es genügten nur wenige μl NaOH (Natronlauge) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bzw. HCL (Salzsäure) (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) zur pH-Wertveränderung der Lösung.

4.) Diaphorase-Inkubationslösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
NADH-Dinatriumsalz (AppliChem GmbH, Darmstadt,			
Deutschland)	13 mg	26 mg	35 mg
Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4)	2.08 ml	4.16 ml	5.6 ml
Nitro-BT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) (Carl Roth			
GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	2.6ml	5.2 ml	7.0 ml
Aqua dest.	3.12 ml	6.24 ml	8.4 ml
Die Inkubationslösung wurde bis zur Benutzung im Kühlschrank aufbewahrt.			

500 μl der Lösung genügten für einen Objektträger in der feuchten Kammer.

6.) Saure Vorinkubation

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
CaCl2-Stammlösung	6.67 ml	12.2 ml	18 ml
Eisessig (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland)	0.27 ml	0.49 ml	0.72 ml
Aqua dest.	60 ml	110 ml	162 ml

Der pH-Wert von 4.2 wurde kurz vor der Benutzung eingestellt.

7.) Tris-CaCl2-Lösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (Carl			
Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	0.74 g	1.48 g	2.18 g
CaCl2-Stammlösung	6.1 ml	12.2 ml	18 ml
Aqua dest.	55 ml	110 ml	162 ml

8.) ATPase Inkubationslösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
KCI (Kaliumchlorid, M=75 g / mol) (Merck, KgaA,			
Darmstadt, Deutschland)	226 mg	452 mg	666 mg
ATP (Adenosin-5'-triphosphat, M=551,2 g / mol)			
(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	93 mg	186 mg	274 mg
Glycinpuffer	55 ml	110 ml	162 ml
CaCl2-Stammlösung (wurde zuletzt dazugegeben,			
da sonst eine ATP-Blockade entstehen würde)	6.1 ml	12.2 ml	18 ml

Die Lösung wurde bei 37 °C aufbewahrt und kurz vor der Verwendung der pH-Wert von 9.4 eingestellt.

12.) Kobaltchlorid-Lösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Kobaltchlorid (AppliChem GmbH, Darmstadt,			
Deutschland) (CoCl2.6H2O)	1.2 g	2.4 g	3.6 g
Aqua dest.	60 ml	120 ml	180 ml

16.) Ammoniumsulfid-Lösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Ammoniumsulfid (Merck, KgaA, Darmstadt,			
Deutschland)	0.08 ml	0.16 ml	0.24 ml
Aqua dest.	60 ml	120 ml	180 ml

Gearbeitet wurden unter dem Abzug wegen des unangenehmen Geruchs.

Folgende Lösungen waren länger haltbar und wurden nur bei Bedarf hergestellt:

1.) Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7,4)

Lösung 1:

	0.1 M prim. Natriumphosphat (Merck, KgaA,	
	Darmstadt, Deutschland) (NaH2PO4.H2O)	18.8 g
	Aqua dest.	11
Lösung 2:	0.1 M sek. Natriumphosphat (Merck, KgaA,	
	Darmstadt, Deutschland) (Na2HPO4.2H2O)	17.8 g
	Aqua dest.	11
Ansatz:	15.9 ml Lösung 1 + 84.1 ml Lösung 2 = 100 ml Phosphat	ouffer

Die pH-Werteinstellung (7,4) erfolgte mit Lösung 1 zum sauren Bereich bzw. mit Lösung 2 zum alkalischen.

2.) Nitro-BT-Stammlösung

Nitro-blaues Tetrazoliumchlorid (Carl Roth GmbH +				
Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	40 mg			
Aqua dest.	40 ml			
Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahren.				
3.) CaCl2-Stammlösung				
CaCl2-2hydrat (M=147.02g/mol) (Sigma-Aldrich				
Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland)				

Aqua dest.

250 ml

4.) CaCl2-Waschlösung

CaCl2-2hydrat (M=147.02 g / mol) (Sigma-Aldrich	
Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland)	10 g
Aqua dest.	11
5.) Glycin-Stammlösung	
Glycin (M=75.07 g / mol) (AppliChem GmbH,	
Darmstadt, Deutschland)	7.51 g
Aqua dest.	250 ml
Der pH-Wert wurde auf 9.4 eingestellt.	
6.) Glycinpuffer	
Glycin-Stammlösung	125 ml
NaOH (0.4M) (8 g / 500 ml)	42 ml
(wurde mit Aqua dest. aufgefüllt auf 500 ml)	
Der pH-Wert wurde auf 9.4 eingestellt.	

11.2 mATPase-Färbeprotokoll

1. pH 6.3 - 6.6	Fixierung nach Meijer (1970)	1 min
2.	Aqua dest.	5 min
3.	Aqua dest.	5 min
4.	Diaphoraseinkubation	60 min, 37 °C
	(in feuchter Kammer, Lösung wurde auf	
	den Objektträger aufgetropft)	

5.	Aqua dest.	15 min
6. pH 4,2	Saure Vorinkubation	15 min
7. pH 7.8	Tris-CaCl2-Lsg.	2 min
8. pH 9.4	ATPase-Inkubationslösung	30 min, 37 °C
9.	CaCl2-Waschlösung	30 sec
10.	CaCl2-Waschlösung	30 sec
11.	CaCl2-Waschlösung	30 sec
12.	Kobaltchloridlösung	2 min
13.	Aqua dest.	45 sec
14.	Aqua dest.	45 sec
15.	Aqua dest.	45 sec
16.	Ammoniumsulfidlösung	2 min
17.	Leitungswasser (fließend)	10 min
18.	Aqua dest.	5 min

Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) bedeckt und mit einem Deckgläschen versehen.

11.3 Rezepturen für die Amylase-PAS-Kapillarfärbung

Folgende Lösungen wurden frisch angesetzt.

1.) Fixierungslösung

			1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Ethanol (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland)				86 ml	129ml
(Merck,	KgaA,	Darmstadt,			
			8 ml	16 ml	24 ml
(Merck,	KgaA,	Darmstadt,			
			2.7 ml	5.4 ml	8.1 ml
	k, KgaA, Dar (Merck, (Merck,	k, KgaA, Darmstadt, Do (Merck, KgaA, (Merck, KgaA,	k, KgaA, Darmstadt, Deutschland) (Merck, KgaA, Darmstadt, (Merck, KgaA, Darmstadt,	1 Küvette k, KgaA, Darmstadt, Deutschland) 43ml (Merck, KgaA, Darmstadt, 8 ml (Merck, KgaA, Darmstadt, 2.7 ml	1 Küvette 2 Küvetten k, KgaA, Darmstadt, Deutschland) 43ml 86 ml (Merck, KgaA, Darmstadt, 8 ml 16 ml (Merck, KgaA, Darmstadt, 2.7 ml 5.4 ml

2.) Amylaselösung

	1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Amylase (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH,			
Seelze, Deutschland)	185 mg	370 mg	555 mg
Aqua dest.	60 ml	120 ml	180 ml

3.) Perjodsäure

							1 Küvette	2 Küvetten	3 Küvetten
Perjodsäure	(Carl	Roth	GmbH	+	Co.	KG,			
Karlsruhe, De	utschla	nd)					0.6 g	1.2 g	1,8 g
Aqua dest.							60 ml	120 ml	180 ml

4.) Schiff's Reagenz

(Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fertig angemischt

Folgende Lösung war länger haltbar und musste nicht frisch angesetzt werden.

5.) <u>SO2-Wasser</u>	
Aqua dest.	600 ml
Kaliumdisulfidlösung (K2S2O5, 10 %ig)	30 ml
HCL (1 N)	30 ml

11.4 Amylase-PAS-Färbeprotokoll

1.) Fixierlösung	1 h, 4 °C, dann 10 min RT
2.) Aqua dest.	10 x spülen
3.) Amylase	25 min, 37 °C
4.) Aqua dest.	10 x spülen
5.) Perjodsäure	30 min
6.) Aqua dest.	10 x spülen
7.) Schiff's Reagenz	zw. 2 min – 25 min, je nach Anfärbung
8.) SO2-Wasser	30 min
9.) Leitungswasser	10 min, fließend
10.) Aqua dest.	3 min

Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland) bedeckt und mit einem Deckgläschen versehen.

11.5 Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme der Versuchstiere über

den gesamten Versuchszeitraum

Die Versuchstiere wurden wöchentlich gewogen und das Gewicht notiert (vgl. Abbildung 15). Es sollen hier der Einfachheit halber jedoch nur die Mittelwerte der Messdaten zu vier bestimmten Zeitpunkten miteinander verglichen werden: Woche 0 als Beginn des Versuchs (Ovariektomie), Woche 5 (Beginn der Behandlungen), Woche 9 (Osteotomie und Osteosynthese) und Woche 15 - das Versuchsende (Obduktion).

Tabelle 4: Körpergewichte

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Körpergewichte in Gramm (g) sowie Ergebnisse der Varianzanalyse mittels Tukey HSD-post-hoc-Test (Tukey HSD) zu den Versuchswochen 0 (Ovariektomie), 5 (Beginn der Behandlungen), 9 (Osteotomie und Osteosynthese) und 15 (Obduktion) (a: unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen, b: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant, **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant)

Vorcushsaruppo	Kennzahl	Versuchswoche					
versuchsgruppe		0	5	9	15		
	М	258,00	298,00	337,00	347,00		
NON-OVX	SD	8,86	29,00	15,00	19,00		
	Tukey HSD		a***				
	Μ	265,25	355,00	387,00	401,00		
OVX	SD	13,58	30,00	36,00	47,00		
	Tukey HSD			b***	b***		
	Μ	258,25	365,00	376,00	393,00		
OVX + VIB	SD	11,78	22,00	25,00	24,00		
	Tukey HSD			b**	b**		
	Μ	257,54	354,00	389,00	407,00		
Alendronat	SD	12,49	15,00	23,00	24,00		
	Tukey HSD			b***	b***		
	Μ	259,69	356,00	380,00	395,00		
Alendronat + VIB	SD	16,49	23,00	26,00	29,00		
	Tukey HSD			b**	b**		
8-PN	Μ	264,08	358,00	372,00	388,00		
	SD	10,80	20,00	24,00	21,00		
	Tukey HSD			b*	b*		
8-PN + VIB	Μ	256,00	354,00	359,00	367,00		
	SD	14,29	17,00	18,00	22,00		
	Tukey HSD			e*	e*		

Tabelle 5: Futteraufnahme

Vereisebegrunne	Kannahl	Versuchswoche					
versuchsgruppe	Kennzani -	1	5	9	15		
	М	18,53	21,33	20,42	21,48		
NON-OVX	SD	1,94	1,13	0,68	0,69		
	Tukey HSD						
	М	16,83	26,44	22,06	21,44		
OVX	SD	1,89	1,84	1,19	1,43		
	Tukey HSD		b**				
OVX + VIB	М	17,27	28,10	22,06	22,00		
	SD	1,28	0,86	0,78	0,96		
	Tukey HSD		b***				
	М	17,33	27,09	22,30	23,26		
Alendronat	SD	0,58	0,85	1,06	3,62		
	Tukey HSD		b**				
	М	17,20	28,16	22,31	18,93		
Alendronat + VIB	SD	0,22	1,90	1,67	2,29		
	Tukey HSD		b***				
	М	17,21	28,46	21,41	22,20		
8-PN	SD	1,51	0,76	0,66	0,95		
	Tukey HSD		b***				
	М	18,81	27,30	20,39	20,85		
8-PN + VIB	SD	4,08	1,58	1,08	1,51		
	Tukey HSD		b**				

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Futteraufnahme in Gramm (g) zu den Versuchswochen 1 (erste errechnete Futteraufnahme), 5 (Beginn der Behandlungen), 9 (Osteotomie und Osteosynthese) und 15 (Obduktion) (b: signifikant verschieden von NON-OVX; **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))

11.6 Alendronat-Dosisaufnahme

Tabelle 6: Alendronat-Dosisaufnahme

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Alendronat Dosisaufnahme der Gruppen Alendronat und Alendronat+VIB pro Ratte pro Tag in Milligramm (mg) im Behandlungszeitraum Woche 5 bis 15 (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

Woche	Alend	Ironat	Alendrona	at + VIB
woene	Μ	SD	М	SD
5	0,26	0,01	0,26	0,02
6	0,27	0,02	0,26	0,01
7	0,25	0,01	0,23	0,01
8	0,24	0,01	0,22	0,01
9	0,22	0,01	0,22	0,02
10	0,16	0,01	0,16	0,02
11	0,21	0,00	0,20	0,02
12	0,21	0,01	0,19	0,03
13	0,22	0,01	0,20	0,03
14	0,22	0,01	0,21	0,02
15	0,23	0,04	0,19	0,02

11.7 Uterusgewichte zum Versuchsende

Tabelle 7: Uterusgewichte

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) in Gramm (g) der Uteri aller Versuchsgruppen zum Versuchsende (a: unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen; ***: höchstsignifikant (Tukey HSD-Test))

Parameter	Kennzahl	NON- OVX	ονχ	OVX + VIB	Alendronat	Alendronat + VIB	8-PN	8-PN + VIB
Uterusgewicht (g)	М	0,66	0,11	0,10	0,10	0,11	0,16	0,17
	SD	0,16	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03
	Tukey HSD	a***						

11.8 Gewichte des M. gastrocnemius und M. soleus zum Versuchsende

Tabelle 8: M. gastrocnemius-Gewicht

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Gewichte des M. gastrocnemius der Ratten zum Versuchsende in Gramm (g) (absolut und im Verhältnis zum Körpergewicht (mg/g x 10⁻³)) (b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX; *: signifikant, **: hochsignifikant (Tukey HSD-Test))

Paramater	Kennzahl	NON-	OVX	OVX +	Alendronat	Alendronat	8-PN	8-PN
		OVX		VIB		+ VIB		+ VIB
Muskelgewicht g	М	2,1	2,4	2,4	2,5	2,4	2,4	2,2
	SD	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2
	Tukey HSD		b*	b*	b**	b*		
Muskelgewicht	Μ	6,1	6,1	6,2	6	6,1	6,1	6,2
g/Körpergewicht g (x 10 ⁻³)	SD	0,6	0,4	0,4	0,3	0,4	0,6	0,5

Tabelle 9: M. soleus-Gewicht

Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Gewichte des M. soleus der Ratten zum Versuchsende in Milligramm (mg) (absolut und im Verhältnis zum Körpergewicht (mg/g x 10⁻³)) (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD-Test))

Parameter	Kenn- zahl	NON- OVX	ονχ	OVX + VIB	Alendronat	Alendronat + VIB	8-PN	8-PN + VIB
Muskelgewicht mg	Μ	148,0	156,0	165,0	165,0	163,0	171,0	148,0
	SD	16,0	33,0	16,0	20,0	18,0	18,0	25,0
Muskelgewicht	М	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
mg/Korpergewicht g (x 10 ⁻³)	SD	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1

11.9 Kreatinkinase-Konzentrationen im Serum zum Versuchsende

Tabelle 10: Kreatinkinase-Konzentrationen

Mittelwerte M und Standardabweichungen SD der Kreatinkinase-Konzentrationen in U / I im Serum zum Versuchsende (keine signifikanten Unterschiede (Tukey HSD))

Parameter	Kennzahl	NON-	OVX	OVX +	Alendronat	Alendronat +	8-PN	8-PN
		ονχ		VIB		VIB		+ VIB
Kreatinkinase U / I	М	7903	8220	7506	7466	8078	6517	5269
	SD	1679	2127	1339	1715	1371	1655	2483

11.10 Ergebnisse der mATPase-Färbung in Kombination mit Diaphorase

Tabelle 11: Faserflächen und -durchmesser

Ergebnisse der Faserflächen und -durchmesser bzw. der Verhältnisse dieser zum Körpergewicht in Gramm (g). Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) sowie Ergebnisse des Tukey HSD-post-hoc-Tests (T) bzw. Dunns-post-hoc-Tests (D) zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden der verschiedenen Versuchsgruppen, Muskelarten und Fasertypen mit ihren Flächen, Durchmessern und Verhältnissen zum Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g). (a: unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen, b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX, c: unterscheidet sich signifikant von OVX, d: unterscheidet sich signifikant von OVX + VIB, e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat, f: unterscheidet sich signifikant von Alendronat + VIB, g: unterscheidet sich signifikant von 8-PN, h: unterscheidet sich signifikant von 8-PN + VIB; *: signifikant, **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant; post-hoc: Post-hoc Test)

Versuchs- gruppe	Muskelart	Fasertyp	Kennzahl	Fläche (μm²)	Fläche (µm ²) /Körperge- wicht (g)	Durchmes- ser (µm)	Durchmesser (µm)/ Körpergewicht (g)
NON-OVX	M. longis- simus	glykolytisch	м	4206	12,21	73,47	0,21
			SD	1065	3,31	8,03	0,03
			post-hoc				T: e*
		intermediär	М	1793	5,19	47,62	0,14
			SD	421,7	1,28	5,49	0,02
			post-hoc				D: e***, f**
		oxidativ	М	1454	4,22	42,88	0,12
			SD	304,4	0,97	4,61	0,02
			post-hoc		T: e**		D: c**, e***, f*, g**
	M. gast- rocnemius	glykolytisch	Μ	4711	13,63	76,5	0,22
			SD	1248	3,6	9,17	0,03
			post-hoc		T: g***, h*		D: e**, g***, h***

Versuchs- gruppe	Muskelart	Fasertyp	Kennzahl	Fläche (μm²)	Fläche (µm ²) /Körperge wicht (g)	Durchmes- ser (μm)	Durchmesser (μm)/ Körper- gewicht (g)
NON-OVX	M. gast- rocnemius	intermediär	м	2251	6,51	52,72	0,15
	locitettido		SD	518,8	1,54	6	0,02
			post-hoc		D: g**, h*		D: c**, e***, g***. h***
	M. soleus	oxidativ	м	3539	10,27	66,39	0,19
			SD	591,3	2,02	5,39	0,02
			post-hoc				
ονχ	M. longissimus	glykolytisch	м	4644	11,7	76,12	0,19
			SD	949,3	2,48	7,8	0,03
			post-hoc				
		intermediär	М	1936	4,85	48,93	0,12
			SD	465,5	1,14	6,01	0,02
			post-hoc			10.05	
		oxidativ		1497	3,75	43,06	0,11
			SD nost-hoc	357,5	0,86	5,31	0,02
	M gost		post-noc				
	rocnemius	glykolytisch	Μ	5249	13,13	80,54	0,2
			SD	1378	3,16	10,22	0,03
			post-hoc	D: g*, h**	T: g**	D: g*, h**	
		intermediär	M	2269	5,74	53,16	0.40
			SD	333,8	1,1	3,97	0,13
	NA	a dala di s	post-hoc	2022	0.64	CO OO	0,02
	IVI. SOIEUS	OXIDATIV		3823	9,61	68,98	0,17
			SD nost has	403,5	1,22	4,09	0,02
	NA lawaia		post-noc				
OVX+VIB	simus	glykolytisch	М	5176	13,21	80,09	0,21
			SD	1423	3,81	10,91	0,03
			post-hoc				
		intermediär	М	2105	5,36	50,93	0,13
			SD	527,5	1,3	6,42	0,02
			post-hoc				
		oxidativ	Μ	1706	4,34	46	0,12
			SD	399,2	0,98 T **	5,4 T **	0,01
	M gast_		post-hoc	I: e**	l:e**	I: e**	D: e***
	rocnemius	glykolytisch	М	5164	13,14	79,85	0,2
			SD	1337	3,21	10,47	0,03
			post-hoc	D: g*, h**	T: g**	D: g*, h**	

Versuchs- gruppe	Muskelart	Fasertyp	Kennzahl	Fläche (µm²)	Fläche (µm ²) /Körperge wicht (g)	Durchmes- ser (μm)	Durchmesser (μm)/ Körper- gewicht (g)
OVX+VIB	M. gast- rocnemius	intermediär	М	2441	6,2	54,87	0,14
			SD	635,6	1,5	7,1	0,02
			post-hoc	T: g* <i>,</i> h*		D: h*	
	M. soleus	oxidativ	М	3757	9,57	68,56	0,18
			SD	469,2	1,01	4,26	0,01
			post-hoc				
Alendro- nat	M. longis- simus	glykolytisch	м	4829	11,9	77,59	0,19
			SD	1107	2,74	8,74	0,02
			post-hoc				
		intermediär	М	1866	4,59	47,89	0,12
			SD	572,4	1,37	7,16	0,02
			post-hoc				
		oxidativ	М	1386	3,42	41,42	0,1
			SD	358,4	0,93	5,37	0,02
			post-hoc				
	M. gast- rocnemius	glykolytisch	Μ	4975	12,26	78,48	0,19
			SD	1238	3,11	9,56	0,03
			post-hoc	D: h*	T: g*	D: h*	
		intermediär	М	2313	5,68	53,38	
			SD	614,1	1,41	7,14	0,13
			post-hoc				0,02
	M. soleus	oxidativ	М	3825	9,4	68,97	0,17
			SD	744	1,68	6,59	0,02
			post-hoc				
Alendro- nat+VIB	M. longis- simus	glykolytisch	м	4673	11,86	76,44	0,19
			SD	1035	2,61	8,12	0,02
			post-hoc				
		intermediär	М	1815	4,61	47,5	0,12
			SD	351,3	0,89	4,58	0,01
			post-hoc	1501			
		oxidativ	MI CD	1501	3,82	43,32	0,11
			SD	276,3	0,75	3,95	0,01
	M. gast-		ροςι-πος				
	rocnemius	glykolytisch	М	5106	12,9	79,48	0,2
			SD	1360	3,29	10,61	0,03
			post-hoc	D: g*, h**	T: g**	D: g*, h**	

Versuchs- gruppe	Muskelart	Fasertyp	Kennzahl	Fläche (µm²)	Fläche (µm ²) /Körperge wicht (g)	Durchmes- ser (µm)	Durchmesser (μm)/ Körper- gewicht (g)
Alendro- nat+VIB	M. gast- rocnemius	intermediär	М	2390	6,05	54,44	
			SD	570,6	1,39	6,23	0,14
			post-hoc	T: g*, h*		D: h*	0,02
	M. soleus	oxidativ	М	3893	9,9	69,64	0,18
			SD	702,6	1,94	6,15	0,02
			post-hoc				
8-PN	M. longis- simus	glykolytisch	Μ	4440	11,42	4440	0,19
			SD	1229	3,02	1229	0,02
			post-hoc				
		intermediär	М	1929	4,96	1929	0,13
			SD	604,1	1,48	604,1	0,02
			post-hoc				
		oxidativ	М	1462	3,76	1462	0,11
			SD	409	0,99	409	0,01
			post-hoc				
	M. gast- rocnemius	glykolytisch	Μ	4052	9,6	4052	0,18
			SD	1118	4,17	1118	0,03
			post-hoc				
		intermediär	М	1978	5,16	1978	0,13
			SD	393,3	1,13	393,3	0,02
			post-hoc				
	M. soleus	oxidativ	М	3529	9,11	3529	0,17
			SD	322,3	0,98	322,3	0,01
			post-hoc				
8-PN+VIB	M. longis- simus	glykolytisch	Μ	4740	13	4740	0,21
			SD	1191	3,56	1191	0,03
			post-hoc				T: e*
		intermediär	Μ	1876	5,12	1876	0,13
			SD	457,6	1,24	457,6	0,02
			post-hoc				D: e*
		oxidativ	M	1498	4,09	1498	0,12
			SD	3/4	1	3/4	0,02
	M σast₋		post-hoc		I:e**		D: 6
	rocnemius	glykolytisch	М	3951	10,8	3951	0,17
			SD	1504	4,15	1504	0,07
			post-hoc				

Versuchs- gruppe	Muskelart	Fasertyp	Kennzahl	Fläche (μm²)	Fläche (μm ²) /Körperge wicht (g)	Durchmes- ser (µm)	Durchmesser (µm)/ Körper- gewicht (g)
8-PN+VIB	M. gast- rocnemius	intermediär	М	1964	5,38	1964	0,12
			SD	616,1	1,76	616,1	0,04
			post-hoc				
	M. soleus	oxidativ	М	3766	10,28	3766	0,19
			SD		1 01	609 7	0.02
			post-hoc	698,2	1,91	090,2	0,02

11.11 Ergebnisse der Amylase-PAS-Kapillarfärbung

Tabelle 12: Kapillardichte

Ergebnisse der Kapillardichte bzw. der Kapillardichte geteilt durch das Körpergewicht in Gramm (g). Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) sowie Ergebnisse des Tukey HSD-post-hoc-Tests (T) bzw. Dunns-post-hoc-Tests (D) zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden der verschiedenen Versuchsgruppen und Muskelarten mit ihrer Kapillardichte für 1mm^2 bzw. der Kapillardichte geteilt durch das Körpergewicht der Versuchstiere in Gramm (g). (b: unterscheidet sich signifikant von NON-OVX, c: unterscheidet sich signifikant von OVX, d: unterscheidet sich signifikant von OVX + VIB, e: unterscheidet sich signifikant von Alendronat; *: signifikant, **: hochsignifikant, ***: höchstsignifikant; *post-hoc*: Post-hoc-Test)

Versuchs- gruppe	Muskelart	Kennzahl	Kapillardichte für 1mm ²	Kapillardichte durch Körpergewicht (1x10 ⁻³ /g)
NON-OVX	M. longissimus	М	1,13	3,27
		SD	0,22	0,55
		post-hoc	T: e*	
	M. gastrocnemius	М	1,32	3,82
		SD	0,26	0,73
		post-hoc		
	M. soleus	М	1,20	3,47
		SD	0,22	0,62
		post-hoc		
OVX	M. longissimus	М	1,16	2,92
		SD	0,24	0,64
		post-hoc		
	M. gastrocnemius	М	1,35	3,46
		SD	0,38	1,16
		post-hoc		
	M. soleus	м	1,27	3,20
		SD	0,29	0,70
		post-hoc		
OVX+VIB	M. longissimus	М	1,30	3,30
		SD	0,23	0,48
		post-hoc		
	M. gastrocnemius	м	1,35	3,45
		SD	0,32	0,65
		post-hoc		
	M. soleus	Μ	1,34	3,42
		SD	0,15	0,38
		post-hoc		
Alendronat	M. longissimus	М	1,34	3,31
		SD	0,31	0,68
		post-hoc		
	M. gastrocnemius	М	1,43	3,50
		SD	0,28	0,56
		post-hoc		

Versuchs- gruppe	Muskelart	Kennzahl	Kapillardichte für 1mm ²	Kapillardichte durch Körpergewicht (1x10 ⁻³ /g)
Alendronat	M. soleus	Μ	1,68	4,15
		SD	0,29	0,72
		post-hoc	T: b***, c***, d***	T: c*
Alendro- nat+VIB	M. longissimus	Μ	1,26	3,22
		SD	0,18	0,54
		post-hoc		
	M. gastrocnemius	М	1,39	3,50
		SD	0,38	0,86
		post-hoc		
	M. soleus	М	1,78	4,51
		SD	0,30	0,55
		post-hoc	T: b***, c***, d***	T: b**, c***, d**
8-PN	M. longissimus	М	1,23	3,17
		SD	0,24	0,43
		post-hoc		
	M. gastrocnemius	Μ	1,42	3,67
		SD	0,39	1,00
		post-hoc		
	M. soleus	М	1,80	4,66
		SD	0,20	0,49
		post-hoc	T: b***, c***, d***	T: b**, c***, d***
8-PN+VIB	M. longissimus	Μ	1,09	2,98
		SD	0,16	0,31
		post-hoc	T: e**	
	M. gastrocnemius	Μ	1,34	3,67
		SD	0,35	0,97
		post-hoc		
	M. soleus	м	1,80	4,94
		SD	0,36	1,00
		post-hoc	T: b***, c***, d***	T: b***, c***, d***

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Michael Stürmer als Abteilungsleiter für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG SE 1966/5-1), welche diese Studie gefördert hat.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Stephan Sehmisch für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das interessante Thema dieser Arbeit. Ich danke ihm für die schnelle Korrektur und die guten Anmerkungen.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Marina Komrakova für die hilfreiche, stets zügige und freundliche Betreuung. Sie war jederzeit erreichbar, gab mir gute Anregungen sowie konstruktive Kritik und ohne ihre Hilfestellung und Betreuung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Großer Dank gebührt weiterhin den MTAs Frau Ramona Castro Machguth und Frau Annette Witt, die mir mit ihren Erfahrungen tatkräftig zur Seite standen, immer als Ansprechpersonen anwesend waren und überhaupt die ganze Arbeit ins Rollen brachten.

Ich danke weiterhin der freundlichen und warmherzigen Frau Ruth Wigger, die mir beim Auswerten der Histologieschnitte in der Abteilung für Landwirtschaftswissenschaft eine unglaubliche Hilfe war, mir jederzeit geduldig alles erklärte und mit der ich viele nette Stunden verbrachte.

Lebenslauf

Am 3. Juni 1988 wurde ich, Charlotte Hanna Maren Rechholtz, als Tochter von Frauke und Hartmut Rechholtz und jüngere Schwester von Steffen Rechholtz in Windhoek (Namibia) geboren. Ich wuchs in Namibia auf, wo ich 13 Jahre lang die Deutsche Höhere Privatschule Windhoek besuchte und im November 2007 meine Hochschulreife mit 1,2 erlangte. Anschließend absolvierte ich mein Krankenpflegepraktikum im Windhoek Central Hospital in der Abteilung für Onkologie und zog Anfang des Jahres 2008 nach Deutschland. Im April desselben Jahres begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, welches ich im November 2014 mit der Note -gut- abschloss. Das Praktische Jahr absolvierte ich im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende in der Abteilung für Innere Medizin und Unfallchirurgie, im Bnai Zion Medical Center in Haifa (Israel) in der Abteilung für Allgemeinchirurgie sowie im Krankenhaus Neu-Mariahilf in Göttingen in der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie. Ab März 2013 erfolgte studienbegleitend unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. Stephan Sehmisch die Anfertigung meiner Dissertation in der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie.

Im Zeitraum Juli 2015 bis Januar 2016 arbeitete ich als Assistenzärztin im Amper-Klinikum Dachau auf der Kardiologie. Seit Februar 2016 bin ich in der Abteilung Innere Medizin und Geriatrie in der Amper-Klinik Indersdorf tätig.