

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie

(Prof. Dr. med. Lehmann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss der selektiven Inhibition pro-inflammatorischer Lipoxygenasen auf die Skelettmuskulatur der ovariektomierten Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ilka Meyer

aus

Wittingen

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. S. Sehmisch

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. J. Schmidt

Prüfungskommission

Referent/in

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss der selektiven Inhibition pro-inflammatorischer Lipoxygenasen auf die Skelettmuskulatur der ovariectomierten Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die verschiedenen Muskelgewebe.....	2
1.2 Charakteristika der Skelettmuskulatur	4
1.2.1 Aufbau einer Muskelzelle.....	4
1.2.2 Aufbau der Myofibrillen	5
1.2.3 Die Kontraktion	6
1.2.4 Bindegewebshüllen des Muskels	7
1.2.5 Die Verbindung der Muskulatur zum Knochen	8
1.2.6 Die motorische Einheit und Muskelfasertypen.....	9
1.2.7 Die Erregungsübertragung.....	12
1.2.8 Training und die folgende Muskeladaptation.....	13
1.2.9 Verletzung der Muskulatur.....	15
1.3 Sarkopenie.....	16
1.3.1 Entwicklung einer Sarkopenie.....	17
1.3.2 Diagnostik der Sarkopenie	18
1.3.3 Wirtschaftliche Aspekte der Sarkopenie	20
1.3.4 Zusammenhang zwischen Muskulatur und Knochen.....	21
1.3.5 Therapie der Sarkopenie	22
1.4 Die Lipoxxygenase Inhibition.....	25
1.4.1 Baicalein	26
1.4.2 Zileuton.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Die Versuchstiere	31

2.2	Der Versuchsablauf	32
2.3	Die Ovariectomie	33
2.4	Die Behandlung.....	36
2.5	Die Osteotomie.....	37
2.6	Die polychrome Sequenzmarkierung	38
2.7	Die Dekapitation und Muskelpräparation	38
2.8	Die Herstellung der Muskelschnittpräparate	41
2.9	Das Anfärben der Präparate	42
2.9.1	Die Amylase-PAS-Färbung.....	42
2.9.2	Die ATPase-Färbung: Muskeltypenunterscheidung.....	44
2.10	Die Auswertung der gefärbten Muskelpräparate	47
2.10.1	Die Auswertung der Amylase-PAS-Kapillarfärbung.....	47
2.10.2	Die Auswertung der ATPase-Diaphorasefärbung	49
2.11	Auswertung der Serumanalyse	51
2.12	Statistische Auswertung.....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Körpergewichte, Futter- und Dosisaufnahme und Muskelgewichte.....	54
3.1.1	Körpergewichte	54
3.1.2	Analyse der Futteraufnahme	55
3.1.3	Analyse der Dosisaufnahmen.....	57
3.1.4	Uterusgewichte.....	58
3.1.5	Muskelgewichte	59
3.2	Verhältnis der Kapillaren zu Muskelfaseranzahl.....	62
3.2.1	M. longissimus.....	62
3.2.2	M. soleus	63
3.2.3	M. gastrocnemius.....	64
3.3	Auswertung der ATPase-Färbung.....	65
3.3.1	M. longissimus.....	65

3.3.2	M. soleus	73
3.3.3	M. gastrocnemius.....	77
3.4	Die Analyse der Serumparameter.....	87
3.5	Tabelle zur Veranschaulichung der Ergebnisse	88
4	Diskussion.....	90
4.1	Die Sprague-Dawley-Ratte als Tiermodell für die Muskuloskelettaleforschung.....	90
4.2	Analyse der Körper- und Muskelgewichte.....	91
4.2.1	Analyse der Futtermenge	93
4.2.2	Analyse der Uterusgewichte	94
4.2.3	Analyse der Muskeldurchblutung hinsichtlich der Kapillarisation nach der Ovariectomie .	95
4.2.4	Analyse der Wirkung von den Lipoxygenasehemmern auf die Kapillarisation	96
4.2.5	Analyse der Muskelfaserdurchmesser und Muskelfaserfläche nach der Ovariectomie.....	97
4.2.6	Analyse der Wirkung von Baicalein auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche	99
4.2.7	Analyse der Wirkung von Zileuton auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche	99
4.2.8	Analyse der Wirkung von Baicalein und Zileuton auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche	101
4.3	Analyse der Verteilung der Muskelfasertypen im M. longissimus.....	102
4.4	Analyse der Serumparameter	103
4.5	Schlussfolgerung.....	104
5	Zusammenfassung.....	106
6	Anhang.....	108
7	Literaturverzeichnis	116
	Danksagung.....	127
	Lebenslauf.....	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Muskelfaser.....	4
Abbildung 2: Der Aufbau der Muskulatur zusammen mit den Bindegewebshüllen	8
Abbildung 3: Faktoren die zur Ausbildung der Sarkomerie führen	18
Abbildung 4: Strukturformel Baicalein	28
Abbildung 5: Strukturformel von Baicalein und seiner Metaboliten.....	28
Abbildung 6: Strukturformel von Zileuton.....	30
Abbildung 7: Operationsvorbereitung a) Rasur des Operationsbereichs; b) Inhalationsnarkose und Schmerzmittel-Gabe	34
Abbildung 8: Die Ovariectomie a) erster Hautschnitt zur Ovariectomie; b) freipräparierte Adnexe	35
Abbildung 9: Abschluss der Operation a) Muskelnäht mit Einzelknopftechnik; b) Hautnäht mit Metallklammern.....	35
Abbildung 10: Postoperative Desinfektion mit Betaisadonna.....	36
Abbildung 11: Guillotine für die Dekapitation der Ratten	39
Abbildung 12: Präparation der Wadenmuskulatur der Ratte, mit Pinzette gehalten: M. soleus.....	40
Abbildung 13: Präparation der Wadenmuskulatur der Ratte a) M. soleus präpariert; b) M. gastrocnemius präpariert.....	40
Abbildung 14: Präparation M. longissimus, gehalten mit Pinzette	41
Abbildung 15: Präparation am Mikrotom a) Mikrotom zum Schneiden; b) Schneidmesser mit befestigten Muskel.....	42
Abbildung 16: Objektträger mit Muskelpräparaten des M. longissimus nach Amylase-PAS-Färbung	44
Abbildung 17: Objektträger mit Muskelpräparaten des M. longissimus nach ATPase-Färbung	47
Abbildung 18: Muskelpräparate des M. longissimus nach Amylase-Färbung	48
Abbildung 19: Muskelpräparate des M. longissimus nach Amylase-Färbung mit Beschriftung	49
Abbildung 20: Muskelpräparate des M. gastrocnemius nach ATPase-Färbung	50
Abbildung 21: Muskelpräparate des M. soleus nach ATPase-Färbung.....	51
Abbildung 22: Körpergewichte zu Versuchsende.....	54
Abbildung 23: Körpergewichte im Verlauf.....	55
Abbildung 24: Aufgenommene Futtermenge pro Tier in mg pro Tag im Verlauf.....	56
Abbildung 25: Aufgenommene Dosismenge pro Tier in mg pro Tag im Verlauf.....	57
Abbildung 26: Uterusgewichte nach Tötung	58
Abbildung 27: Muskelgewichte des M. soleus	59
Abbildung 28: Muskelgewichte des M. soleus in Relation zum Körpergewicht.....	60
Abbildung 29: Muskelgewichte des M. gastrocnemius.....	60
Abbildung 30: Muskelgewichte des M. gastrocnemius in Relation zum Körpergewicht	61

Abbildung 31: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim <i>M. longissimus</i>	62
Abbildung 32: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim <i>M. soleus</i>	63
Abbildung 33: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim <i>M. gastrocnemius</i>	64
Abbildung 34: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. longissimus</i>	65
Abbildung 35: Durchmesser der Typ-II-Muskelfasern des <i>M. longissimus</i>	66
Abbildung 36: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. longissimus</i>	67
Abbildung 37: Fläche der Typ-II-Muskelfasern des <i>M. longissimus</i>	68
Abbildung 38: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des <i>M. longissimus</i> zum Körpergewicht .	69
Abbildung 39: Verhältnis von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des <i>M. longissimus</i> zum Körpergewicht	69
Abbildung 40: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser des <i>M. longissimus</i> zum Körpergewicht	70
Abbildung 41: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche des <i>M. longissimus</i> zum Körpergewicht.....	71
Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Muskelfasern-Typ-I zur Summe aller Fasern des <i>M. longissimus</i> .	72
Abbildung 43: Prozentualer Anteil der Muskelfasern-Typ-II zur Summe aller Fasern des <i>M. longissimus</i>	72
Abbildung 44: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. soleus</i>	73
Abbildung 45: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. soleus</i>	74
Abbildung 46: Relation von dem Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des <i>M. soleus</i> zum Körpergewicht ...	75
Abbildung 47: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des <i>M. soleus</i> zum Körpergewicht.....	75
Abbildung 48: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser zum Muskelgewicht des <i>M. soleus</i>	76
Abbildung 49: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche zum Muskelgewicht des <i>M. soleus</i>	77
Abbildung 50: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	78
Abbildung 51: Durchmesser der Typ-II-Muskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	78
Abbildung 52: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	79
Abbildung 53: Fläche der Typ-II-Muskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	80
Abbildung 54: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des <i>M. gastrocnemius</i> zum Körpergewicht	81
Abbildung 55: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des <i>M. gastrocnemius</i> zum Körpergewicht...	81
Abbildung 56: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser des <i>M. gastrocnemius</i> zum Körpergewicht	82
Abbildung 57: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche des <i>M. gastrocnemius</i> zum Körpergewicht .	83
Abbildung 58: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser zum Muskelgewicht des <i>M. gastrocnemius</i>	84
Abbildung 59: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche zum Muskelgewicht des <i>M. gastrocnemius</i> ...	85
Abbildung 60: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser zum Muskelgewicht des <i>M. gastrocnemius</i>	85
Abbildung 61: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche zum Muskelgewicht des <i>M. gastrocnemius</i> ..	86

Abbildung 62: Kreatinkinase im Serum..... 87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern	12
Tabelle 2: Diagnostik der Sarkopenie und ihre Richtwerte	20
Tabelle 3: Die 5 Versuchsgruppen	31
Tabelle 4: Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere.....	32
Tabelle 5 : Reaktionsschritte der Kreatinkinase	53
Tabelle 6: Übersicht zu den Ergebnissen für die Kapillarisation im M. gastrocnemius.....	88
Tabelle 7: Übersicht zu den Ergebnissen der relativen Muskelfaserdurchmesser von den verschiedenen Muskeln.....	89
Tabelle 8: Übersicht zu den Ergebnissen der relativen Muskelfaserfläche der verschiedenen Muskeln.....	89
Tabelle A1: Gewichte der Tiere zu Versuchsbeginn, nach Osteotomie und zum Versuchsende.....	108
Tabelle A2: M. soleus-Gewicht zu Versuchsende.....	108
Tabelle A3: M. gastrocnemius-Gewicht zu Versuchsende	108
Tabelle A4: Uterus-Gewicht zu Versuchsende.....	108
Tabelle A5: Futteraufnahme der Ratten in Futter mg/Tier/Tag	10109
Tabelle A6: Dosis der Lipoxigenasehemmer per kg BW	110
Tabelle A7: Dosis per kg BW/Woche im Gesamtverlauf	110
Tabelle A8: Kapillare/mm ² M. longissimus	111
Tabelle A9: Kapillare/mm ² M. soleus	111
Tabelle A10: Kapillare/mm ² M. gastrocnemius.....	111
Tabelle A11: M. longissimus: Muskelfaserdurchmesser in μm	111
Tabelle A12: M. longissimus: Muskelfaserfläche in μm^2	112
Tabelle A13: M.longissimus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g KG	112
Tabelle A14: Verhältnisse der Fasertypen im M. longissimus in % am Gesamtfaseranteil pro 1 mm ²	112
Tabelle A15: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser in μm	113
Tabelle A16: M. soleus: Muskelfaserfläche in μm^2	113
Tabelle A17: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g KG.....	113
Tabelle A18: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g MG.....	113
Tabelle A19: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser in μm	113
Tabelle A20: M. gastrocnemius: Muskelfaserfläche in μm^2	113
Tabelle A21: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g KG	114
Tabelle A22: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g MG	115

Abkürzungen

A-Bande	Anisotrope-Bande
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Alizarin Komplexon
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest	Aqua destillata
BIA	bioelektrische Impedanzanalyse
CG	Calcein Grün
DEXA	Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie
HSP70	Hitzeschutzprotein 70
I-Bande	Isotrope-Bande
KG	Körpergewicht
MyHC	<i>myosin heavy chain</i> , schwere Myosinketten
MyLC	<i>myosin light chain</i> , leichte Myosinketten
Non-OVX	nicht-ovariectomierte Gruppe
OVX	ovariectomierte Gruppe
SD	Standardabweichung
SM	Skelettale Muskelmasse
SMI	Skelettmuskelmassenindex
TC	Tetracyclin
Typ-I Fasern	slow-/S-Fasern, oxidative Fasern
Typ-II-Fasern	fast/F-Fasern, glykolytische Fasern
XO	Xylenol-Orange

1 Einleitung

Die heutige Gesellschaft ist geprägt von einer immer älter werdenden Bevölkerung. Der Anteil der Älteren nimmt in den meisten Industriestaaten im Verhältnis zur arbeitenden Bevölkerung deutlich zu. Somit steigt jedoch auch die Zahl der Patienten mit altersbedingten Erkrankungen an. Es ist daher wichtig, diesen Krankheiten eine größere Bedeutung zuzumessen, um ihre Entstehung, Prävention und Heilung besser verstehen zu können und eine bessere Behandlung zu ermöglichen.

Eine wichtige und häufig unterschätzte altersbedingte Krankheit ist die Osteoporose. Die Anzahl der an Osteoporose erkrankten Menschen lag 2010 in Industrienationen wie Nordamerika, Europa, Japan und Australien schon bei etwa 49 Millionen (Wade et al. 2014).

Durch den bereits erwähnten demographischen Wandel wird die Prävalenz weiter steigen. Bereits in einer 2015 veröffentlichten Studie betrug das Risiko einer 75-jährigen Frau eine osteoporotische Fraktur zu erleiden 20%. Bei Männern lag dieser Wert bei 11,5%. Auch wenn es geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, ist ein proportionaler fast schon exponentieller Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Auftreten von Osteoporose zu erkennen (Prior JC et al. 2015). Weitere Forschungen zur Therapie sind daher unbedingt notwendig. Die hier vorgelegte Studie befasst sich mit einer neuen Therapieform zur Behandlung der Osteoporose.

Gleichzeitig mit der Knochenfragilität kommt es physiologisch mit steigendem Alter auch zu einer Rückbildung der Muskulatur. Geschieht dies in einem pathologischen Ausmaß, wird diese Rückbildung als Sarkopenie bezeichnet.

Es zeigte sich, dass besonders bei Männern, die an einer Sarkopenie und einer niedrigen Knochenichte leiden, ein deutlich erhöhtes Risiko besteht, sich osteoporotische Frakturen zuzuziehen (Chalhoub et al. 2015). Auch bei Frauen konnte festgestellt werden, dass eine starke Muskulatur das Risiko an osteoporotischen Frakturen deutlich senkt. Muskel und Knochen hängen in ihrer Funktion eng zusammen. Sie beeinflussen sich gegenseitig. Da ein enger Zusammenhang zwischen der Knochenmasse und der Muskulatur besteht, wird der Fokus in dieser Arbeit auf die Untersuchung und Analyse von drei Muskeln in der postmenopausalen Phase gelegt. Zum einen konzentriert sich die Studie auf die Wadenmuskeln *M. gastrocnemius* und *M. soleus* und weiter auf den Rückenmuskel *M. longissimus*.

Ziel dieser Studie ist es zu eruieren, in wie weit sich die Muskelstruktur hinsichtlich der Kapillarisierung im Verhältnis zur Myofibrillenanzahl postmenopausal verändert. Weiter wird der Einfluss der Therapie auf die Muskelfasertypen, -Fläche, bzw. -Durchmesser und der Serumproteinanteile

erarbeitet. Mit Hilfe dieser Parameter können Rückschlüsse auf die Muskelfunktion und Muskelveränderungen in der postmenopausalen Phase und der Medikamentenwirkung gezogen werden.

Die weiblichen ovariectomierten Ratten werden dafür therapeutisch mit den Lipoxygenasehemmer Baicalein oder Zileuton behandelt. Sowohl jeweils nur mit einem Hemmer als auch in Kombination der beiden Stoffe. Zur deutlichen Abgrenzung der Untersuchungsergebnisse wird eine unbehandelte ovariectomierte Gruppe geführt sowie eine Kontrollgruppe, bei der keine Therapie stattfindet.

Lipoxygenasehemmer, wie Baicalein und Zileuton, hemmen das gleichnamige Enzym, die Lipoxygenase und verhindern so die Bildung von Leukotriene aus der Arachnoidonsäure. Leukotriene sind wichtige Entzündungsfaktoren im Körper (Silbernagl und Despopoulos 2007). Aus diesem Grund geht man davon aus, dass Lipoxygenasehemmer eine positive Wirkung auf entzündliche Vorgänge im Körper, wie der Osteoporose und der Sarkopenie, haben (Lightfoot et al. 2014).

In vorherigen Studien konnte bereits eine positive Wirkung des Baicaleins auf die Sarkopenie und Osteoporose festgestellt werden, jedoch kam es in diesen Versuchen zu Nebenwirkungen durch subkutane Verabreichung des Medikaments (Kling 2016; Saul et al. 2017b).

Daher soll in dieser Studie gezeigt werden, dass auch eine orale Gabe positive Ergebnisse auf die Muskulatur hat.

Um die histologische Auswertung zur Funktion der Muskulatur zu stützen werden zudem Serumparameter abgenommen und erhoben. Mit Hilfe dieser und weiterer Arbeiten sollen neue mögliche Therapieoptionen für die Prävention einer Osteoporose und Sarkopenie gefunden werden. Ferner sollen diese eine therapeutische Lösung bei einer bereits bestehenden Osteoporose und Sarkopenie sein. Beides ist für die heutige Gesellschaft von sehr großer Bedeutung.

1.1 Die verschiedenen Muskelgewebe

Unser Körper besteht aus ca. 220 Einzelmuskeln der quergestreiften Muskulatur, die im Schnitt etwa 40% des Gesamtgewichtes des Menschen ausmachen. Die Muskulatur als Organ ist folglich das schwerste, wobei es sich zu 75% aus Wasser, 20% Protein, 3% anorganisch Bestandteil, wie Kalziumionen und 2% niedermolekular organische Bestandteil, wie Triglyzerid, zusammensetzt.

Physiologisch verringert sich die Muskelmasse im Alter und der Fettanteil erhöht sich. Dies ist unterschiedlichen Faktoren zuzuschreiben, wie zum Beispiel der im Alter zunehmenden körperli-

chen Inaktivität. Aber auch verschiedene hormonelle Faktoren spielen eine Rolle (Schünke et al. 2007).

Innerhalb des Muskelgewebes unterscheidet man zwischen drei Gewebeformen: Erstens dem glatten Muskelgewebe, zweitens dem Herzmuskelgewebe und drittens dem Skelettmuskelgewebe, wobei die beiden letzteren zur quergestreiften Muskulatur zählen. Die Unterschiede liegen vor allem in der Funktion, wohingegen die molekulare Interaktion der kontraktilen Filamente nahezu identisch ist.

So ist das glatte Muskelgewebe für innere Transportvorgänge, Blutdruckregulation und den Tonus der inneren Organe unabdingbar, das Herzmuskelgewebe für den Herzschlag. Hingegen wird die Skelettmuskulatur für die Bewegung und Wärmeproduktion gebraucht (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Die drei Muskelgewebe sind aus Myozyten aufgebaut. Auch wenn viele Zellen kontraktile Eigenschaften haben, so ist der gesamte Aufbau in den Myozyten genau auf seine Funktion ausgerichtet. Dieser kontraktile Apparat ist aus filamentärem Aktin, Myosin und weiteren Proteinen zusammengesetzt.

1. Die glatte Muskulatur besitzt im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur weniger regelmäßig aufgebaute Strukturen. Hier finden sich keine zu Fibrillen angeordneten Myofilamente. Sie bildet die Grundlage von Wänden der Hohlorgane wie z.B. des Magendarmtrakts, aber auch Blutgefäße und die Atemwege kleidet sie aus. Die Innervation erfolgt unwillkürlich durch das vegetative, autonome Nervensystem.

2. Die Myozyten des Herzmuskelgewebes bezeichnet man als Kardiomyozyten. Sie sind untereinander über die sogenannten, mikroskopisch erkennbaren Glanzstreifen mechanisch und funktionell verbunden. Über diese Verbindung erfolgt auch die elektrische Kopplung, sodass ein funktionelles Synzytium entsteht. Durch die regelmäßige Anordnung der Sarkomere wird die Zuordnung zur quergestreiften Muskulatur im Längsschnitt, wie bei der Skelettmuskulatur, deutlich. Die Erregung der Herzmuskulatur erfolgt über spezielle Herzmuskelzellen, den Schrittmacherzellen.

3. Die Skelettmuskulatur bildet die Grundlage für die im Allgemeinen bezeichnete Muskulatur. Sie findet sich aber auch in inneren Organen, wie zum Beispiel dem Ösophagus. Sie setzt sich aus Myofibrillen zusammen, welche aus den hochgeordneten kontraktilen Proteinen wie Aktin und Myosin bestehen und die charakteristische Querstreifung bilden. Durch die Innervation von Motoneuronen an der motorischen Endplatte ist sie willkürlich ansteuer- und kontrollierbar (Sobotta und Welsch 2006).

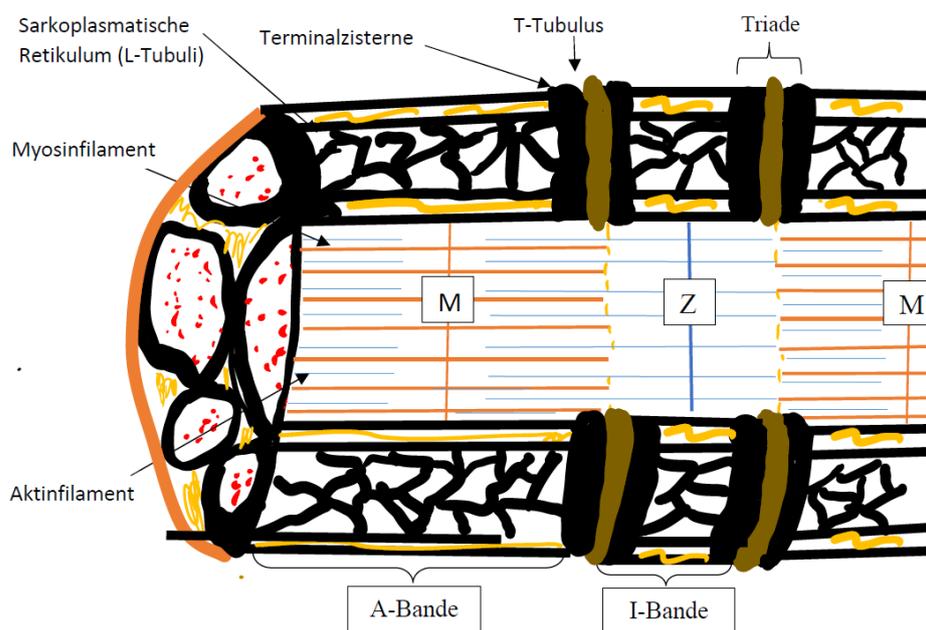
Da in dieser Studie nur die Skelettmuskulatur der Ratte untersucht wurde, werden im Folgenden nun die Charakteristika der Skelettmuskulatur genauer erläutert und beschrieben.

1.2 Charakteristika der Skelettmuskulatur

1.2.1 Aufbau einer Muskelzelle

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Muskelfaser

(nach: Schmidt 2010)



Embryologisch geht die Skelettmuskulatur aus dem mittleren Keimblatt hervor, dem Mesoderm. Die mesenchymalen Progenitorzellen bilden unreife aber mitotisch aktive Myoblasten. Aus mehreren Myoblasten entsteht durch Verschmelzung ein langer dünner Myotubus und nach Differenzierung der charakteristische Aufbau der Skelettmuskulatur.

Die Skelettmuskulatur setzt sich aus mehreren vielkernigen Muskelzellen, den Muskelfasern zusammen, die aus der Fusion von einkernigen Myoblasten entstanden sind. Durch die Myofibrillenentwicklung und der sie umgebenden Basalmembran entsteht schließlich die für die Skelettmuskulatur typische Querstreifung. Innerhalb der Basalmembran finden sich noch weitere teilungsfähige Myoblasten, die nach Fusion weitere neue Zellkerne liefern. Die Zellkerne liegen zunächst zentral, im Verlauf reifen die Myotuben zu komplexen Muskelfasern heran, sodass sich der Zellkern an den Rand verschiebt (Junqueira 1986).

Beim Menschen hat die Muskelfaser im Schnitt einen Durchmesser von 40-80 μm und eine Länge von bis zu mehreren Zentimetern. An den Enden einer Muskelfaser befinden sich Kollagenfibrillen für die Muskel-Sehnen-Übertragung. Dies ist die Verbindungsstelle der Sehne zum Knochen. Im Sarkoplasma jeder Muskelzelle findet man die Myofibrillen, Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum, die besonders wichtig für die Kontraktion sind. Das sarkoplasmatische Retikulum wird auch als L-Tubuli bezeichnet (longitudinales Tubuli-System), da es die Myofibrillen in Faserrichtung langgestreckt umgibt. Den L-Tubuli liegt von außen die Basalmembran der Muskelfaser auf. Die für die Kontraktion nötigen Calcium-Ionen werden durch das sarkoplasmatische Retikulum zur Verfügung gestellt. Das sarkoplasmatische Retikulum dient somit als Speicher und kann von dort schnell Calcium in das Sarkoplasma abgeben. Durch sogenannte terminale Zisternen (T-Tubuli) im Bereich der Z-Scheiben stehen die sarkoplasmatischen Retikuli zusätzlich mit dem Extrazellularraum in Verbindung. Auch die T-Tubuli besitzen zahlreiche Kalziumkanäle, die somit auch die Versorgung mit Kalziumionen aus dem Extrazellularraum sicherstellen.

Muskelfasern sind nicht mehr teilungsfähig. Die Regeneration der Fasern erfolgt bei einer Schädigung durch teilungsfähige Satellitenzellen. Diese Zellen sind ruhende Myoblasten und Stammzellen, die bei Bedarf zu mehreren Tochterzellen proliferieren und mit der reifen Muskelfaser fusionieren. Hierdurch vergrößert sich die Muskelfaser wieder. Bei der Muskelfaser handelt es sich um ein Synzytium, d.h. sie entsteht erst durch die Fusion mehrere einkerniger Zellen (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

1.2.2 Aufbau der Myofibrillen

Innerhalb einer Muskelzelle weisen die Myofibrillen eine regelmäßige Ordnung auf. Die Myofibrillen bestehen aus regelmäßig angeordneten Sarkomeren, die an der mikroskopisch sichtbaren Z-Scheibe miteinander verbunden sind. Sarkomere bestehen aus Myofilamenten, den dünnen Aktinfilamenten und dickeren Myosinfilamenten (siehe Abbildung). Durch ihre spezifische Anordnung bildet sich unter anderem die typische Querstreifung der Muskelfaser. Im Polarisationsmikroskop erkennt man die einzelnen Banden. Im Bereich der A-Bande (anisotrop) liegen Myosin und Aktin gemeinsam vor. Bei den an jedem Ende liegenden I-Banden (isotrop) handelt es sich um einen Bereich, in dem sich nur Aktinfilamente vorfinden. Des Weiteren gibt es die H-Zone, den Aktin-freien Bereich. Allerdings ist diese Zone nur sichtbar, wenn der Muskel im ruhenden Zustand oder unter Dehnung fixiert worden ist (Bommas-Ebert et al. 2006).

Die Aktinfilamente sind an ihren (+)-Enden mit den Z-Scheiben über Proteine wie dem Actinin verbunden. Im Abschnitt der M-Bande findet sich die Halterung für die Myosinfilamente. Sie sind mithilfe von Proteinen wie Myomesine befestigt. Zusätzlich findet man in der Skelettmuskel-

zelle das Titinfilament, welches unter anderem dafür dient, die Myosinfilamente in ihrer Position zu halten. Das Titin ist auch mit der Z-Scheibe verbunden und bewirkt neben der Zentrierung des Myosins, eine Stabilität und Elastizität innerhalb der Sarkomere. Durch seinen eigenen Spannungsanstieg bei passiver Dehnung, schützt es vor Schäden und bringt das Sarkomer nach der Dehnung wieder in den Ausgangszustand zurück. Titin wirkt wie eine elastische Feder (Huppelsberg und Walter 2013).

Ein weiteres wichtiges Protein ist das Tropomyosin. Es blockiert bei Ruhe die Myosin-Bindungsstelle des Aktinfilamentes. Zusammen mit den Troponin-Komplexen wirkt es als Regulator der Muskelkontraktion. Erst wenn genügend Calcium im Sarkoplasma vorliegt, wird dies vom Troponin gebunden und die Bindungsstelle kann vom Tropomyosin freigegeben werden.

Die Funktion und Zusammenarbeit all dieser Myofilamente und Proteine ist für eine reibungslose Muskelkontraktion unabdingbar (Huppelsberg und Walter 2013).

1.2.3 Die Kontraktion

Sobald die Aktin-Myosin-Bindungsstelle freigegeben wurde, beginnt die Muskelkontraktion, welche durch die Verkürzung der Sarkomere ermöglicht wird. Die Sarkomere können auf bis zu max. 70% verkürzt werden. Dabei gleiten die Aktinfilamente passiv zwischen die Myosinfilamente, sodass beide ihre ursprüngliche Länge behalten. Lediglich die I-Bande und die H-Zone werden schmaler. Sie verschwinden bei maximaler Kontraktion komplett, wohingegen sie ihre maximale Breite bei Dehnung erreichen.

Für das Gleiten ist das Motorprotein Myosin II verantwortlich. Über das Myosinköpfchen bindet das Myosin II an der Aktin-Myosin-Bindungsstelle. Das Aktinfilament wird dann mit dem Myosinköpfchen in Richtung seines (+)-Ende gezogen.

Das Motorprotein besitzt die für die Kontraktion wichtige ATPase-Aktivität. Die Kette von Sarkomeren ist am Ende einer Muskelfaser mit dem Sarkolemm verankert. Kommt es zur Verkürzung der Myofibrillen, wird dies über das Sarkolemm auf die Kollagenfibrillen der Muskelsehne übertragen, es folgt die Kontraktion des Muskels (Junqueira 1986). Wenn genügend Calcium verfügbar war, vom Troponin gebunden wurde und die Bindungsstelle schließlich freigeworden ist, verbindet sich das Myosinköpfchen mit dem Aktinfilament. Durch die ATP-Spaltung und der Abgabe von zunächst Phosphat und anschließend ADP, kippt das Myosinköpfchen aus seiner anfänglichen 90° Stellung in eine 45° Position. Erst wenn neues ATP an dem Myosinköpfchen bindet, kommt es zur Lösung des Aktin-Myosin-Komplexes. Der Muskel geht zurück in seine Ruhestellung. Dieser Vorgang wird auch als Querbrückenzyklus bezeichnet. Ohne neues ATP würde die Bildung als stabiler Rigorkomplex bestehen bleiben. Letztend-

lich kennzeichnet diese Stellung dann die sogenannte Totenstarre der Muskulatur (Silbernagl und Despopoulos 2007).

Damit der Querbrückenzyklus überhaupt möglich ist, muss zunächst genügend Calcium zur Verfügung stehen. Die Calcium-Konzentration im Sarkoplasma liegt normalerweise bei 10^{-7} mol/l. Die Bindungsstelle wird vom Tropomyosin jedoch erst bei einer Calcium-Konzentration von 10^{-5} mol/l freigegeben. Erst dann beginnt der Kontraktions-Zyklus. Durch eine elektromechanische Kopplung ist dieser Konzentrationsanstieg möglich. Erreicht ein Aktionspotential die Muskelfaser, öffnen sich spannungsabhängige Dihydropyridin-Rezeptoren im Bereich der T-Tubuli, es kommt zu einem Calcium Einstrom aus dem Extrazellularraum. Konsekutiv, durch Protein-Protein-Interaktion, öffnet sich schließlich der Ryanodin-Rezeptor. Hierdurch fließt nun auch Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Sarkoplasma. Das Calcium wird mittels einer Ca^{2+} -ATPase wieder in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt und die Kontraktion beendet (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

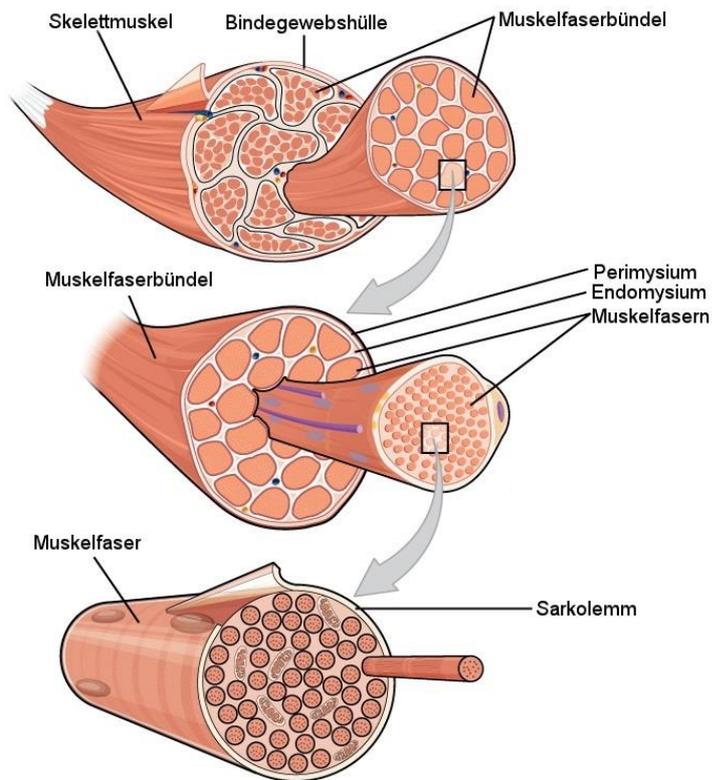
1.2.4 Bindegewebshüllen des Muskels

Der Muskelfaser liegt die Basalmembran auf. Sie ist eine Basallamina, die hauptsächlich aus mehreren dünnen Schichten von Kollagenfibrillen besteht. Darüber umschließt das Endomysium eine Muskelfaser. Diese dünne bindegewebige Schicht besteht vor allem aus retikulären Fasern. Die retikulären Fasern sind maßgeblich für die Reißfestigkeit der Muskelfaser verantwortlich.

Das Perimysium internum umfasst bis zu 250 Muskelzellen, die parallel zueinander liegen. Auf diese Weise bilden sie ein Primärbündel. Mehrere Gruppen von Muskelzellen werden vom Perimysium externum umgeben, welches mit lockerem Bindegewebe gefüllt ist. Durch das Perimysium externum werden die Sekundärbündel gebildet (Sobotta und Welsch 2006).

Die Sekundärbündel werden schließlich vom Epimysium bindegewebig umgeben, welches gleichzeitig zur Faszie des Muskels gehört. Durch diese bindegewebigen Hüllen können Nerven und Blutgefäße bis ins Endomysium ziehen und die Muskelfasern mittels Kapillaren versorgen (Aumüller und Wolff 2010).

Abbildung 2: Der Aufbau der Muskulatur zusammen mit den Bindegewebshüllen (Hazzard-County-Engineer 2015, CC-BY-SA-3.0)



1.2.5 Die Verbindung der Muskulatur zum Knochen

Die Muskulatur wird über Sehnen mit dem Skelett verbunden. Der Aufbau der verschiedenen Sehnen, Zugsehnen und Aponeurosen, unterscheidet sich. Sie können rund und strangförmig sein oder flach, dünn oder breit. Grundsätzlich bestehen sie aber aus straffen Bindegewebe, dem Kollagen Typ I. Sehnen sind zugfest und werden durch viele Kollagenfaserbündel, die von dem Peritendineum internum (lockerem Bindegewebe) umgeben werden, gebildet. Das Peritendineum externum umgibt die gesamte Sehne an sich und enthält zuführende Blutgefäße (Junqueira 1986).

Eine Sehne ist mit der Muskulatur über eine komplexe, erst im Elektronenmikroskop sichtbare, Struktur verbunden. Endständig haben die Muskelfasern fingerförmige Ein- und Ausstülpungen, die bis in die Basallamina des Muskels einziehen und mit den sehnigen Kollagenfibrillen verflochten sind. Die Typ III-Kollagenfibrillen, die den gesamten Muskel umspinnen, verbinden sich eng mit den sehnigen Kollagenfibrillen. Letztendlich wird die Verbindung über Integrine hergestellt, die in der Außenmembran jeder Muskelzelle liegen. Intrazellulär entsteht die Verankerung der Integrine mit den Aktinfilamenten der Muskelzelle über Anheftungsplaques (Sobotta und Welsch 2006).

Als Sehnenansatz bezeichnet man den Teil vom Knochen, an dem die Sehne inseriert. Von hier erfolgt auch das Wachstum einer Sehne. Der mazerierte Knochen weist an dieser Stelle eine angeraute Oberfläche mit sogenannten Grübchen auf. Die Kollagenfasern werden am Sehnenansatz von Faserknorpel umgeben, der zum Knochen hin mineralisiert. Als sogenannte Sharpey-Fasern ziehen die Kollagenfasern durch die aufgeraute Oberfläche in den Knochen hinein. Elastische Fasern am Übergang wirken als Dehnungsdämpfer bei gedehnter Sehne und verhindern so Verletzungen (Aumüller und Wolff 2010).

Die Sehnenansätze sind ein sehr stabiles Konstrukt. Im jungen Alter kommt es höchstens zu Überbelastungen, Entzündungen oder kleineren Ausrissen am Knochenansatz. Nur selten sind komplette Rupturen feststellbar. Mit fortgeschrittenem Alter jedoch steigt der Anteil an kleineren Verletzungen am myotendinalen Übergang. Schließlich kann es dann, durch die altersbedingte Degeneration und vorheriger Schädigungen, sowie degenerativer Veränderungen, wie der Osteoporose und Sarkopenie, doch zu einer Ruptur kommen. Insbesondere ist die Rotatorenmanschette betroffen (Bohndorf et al. 2014). Die Ruptur bringt deutliche Einschränkungen in der Bewegung und somit gleichzeitig an Lebensqualität mit sich und sollte deswegen unbedingt verhindert werden (Likar et al. 2005).

1.2.6 Die motorische Einheit und Muskelfasertypen

Eine motorische Einheit setzt sich aus einer Gruppe von Muskelfasern zusammen, die alle von einer motorischen Nervenfasern stimuliert werden. Dabei unterscheidet man kleine motorische Einheiten von <100 Muskelfasern von großen Einheiten >1000 Muskelfasern.

In der Regel differenziert man zunächst zwischen zwei Faserarten, den sogenannten Zuckungsfasern und den Tonusfasern. Letztere findet man nur vereinzelt in Muskelspindeln oder in den äußeren Augenmuskeln. Tonusfasern sind in der Lage die Faserverkürzung stufenweise zu regulieren.

Die Zuckungsfasern hingegen reagieren nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz, wenn ein Aktionspotential die Faser erreicht.

Man unterteilt sie weiter in verschiedene Typen, wobei sich die Isoformen auch unter den Säugetieren unterscheiden. Beim Menschen findet man primär die Typ-I-(slow-/S-) Fasern, Typ-II-A-(fast/F-) Fasern und die Typ II-X-(fast/F-) Fasern. Bei Ratten liegen überdies noch die Isoform der Typ II-B-Fasern und die intermediären Typ-II-Fasern vor. Für die Einteilung der Fasern ist vor allem die schwere Myosinketten-Isoform entscheidend (Sobotta und Welsch 2006).

Das dicke Filament des Sarkomers, das Myosin, weist eine Dimere Struktur auf, die wiederum aus sechs Untereinheiten bestehen. Dieses Hexamer besteht aus 2 sogenannten schweren Ketten

(MyHC), die den Fasertypen der Muskelzelle bestimmen und 4 leichten Ketten (MyLC). Das Aktinfilament ist bei allen Muskelfasertypen gleich aufgebaut (Sobotta und Welsch 2006).

Die Typ-I-Fasern werden auch als Slow-twitch oder oxidative Fasern bezeichnet, weil sie im Vergleich zu beiden anderen eine deutlich niedrigere ATPase-Aktivität besitzen und dadurch die ATP-Spaltung langsamer verläuft. Die ATPase-Aktivität ist im MyHC-Typ-II-B am schnellsten, gefolgt von Typ-II-X, Typ-II-A und zuletzt dem MyHC-Typ-I. Aus diesem Grund werden die Typ-II-Fasern auch als Fast-twitch bzw. wegen ihres Stoffwechsels als glykolytische Fasern, bezeichnet (Toigo 2015).

Wie genau im Endeffekt die Verteilung der Fasern im Muskel ist, wird zum einem genetisch festgelegt, hängt aber zum anderen stark von der anatomischen Lokalisation des Muskels und den Anforderungen, die an ihn bestehen, ab. Alle Fasern einer motorischen Einheit setzen sich jedoch grundsätzlich nur aus einem Muskelfasertyp zusammen (Schünke et al. 2007).

Vereinfacht ausgedrückt sind die Typ-I-Fasern die langsamen Zuckungsfasern, die auf Grund ihres hohen Myoglobingehaltes makroskopisch rot erscheinen. Sie sind durch ihren hohen oxidativen Stoffwechsel wichtig für die Ausdauerleistung eines Muskels. Man findet die Typ-I-Fasern an großen motorischen Einheiten und in der Haltemuskulatur wie zum Beispiel dem M.erector spinae oder dem M.soleus.

Die Typ-II-Fasern sind die schnellen Fasern, fast-twitch. Da sie durch ihren hohen glykolytischen Stoffwechsel eher für schnelle und kurzandauernde Bewegungen gebraucht werden, findet man sie vor allem in kleinen motorischen Einheiten und in der Bewegungsmuskulatur, wie zum Beispiel dem M.gastrocnemius. Sie sind notwendig für die schnellen Bewegungen mit einer raschen kurzen Kontraktion (Schünke et al. 2007).

Die intermediären Fasern stellen einen Zwischentyp dar. Dies zeigt sich schon makroskopisch an ihrer eher rot/rosa Farbe, denn sie besitzen deutlich mehr Myoglobin als die Typ-II. Sie sind gleichzeitig aber sowohl glykolytisch als auch oxidativ aktiv. Somit werden sie für die meisten alltäglichen Bewegungen zusammen mit den Typ-I-Fasern benötigt.

Für die Differenzierung der Fasertypen ist, auch im Hinblick auf den späteren Untersuchungsbefund, der Gehalt der ATPase entscheidend. Das Enzym ist in den Typ-II-Fasern deutlich mehr enthalten. Die ATPase dient der Spaltung von ATP, in ADP und Phosphat. Dies liefert die Grundlage für die Kontraktion (Sobotta und Welsch 2006).

In der Körpermuskulatur des Menschen findet man insgesamt eine gleichmäßige Verteilung an Typ-I- und II-Fasern. Es gibt aber Muskelgruppen, die eine Dominanz eines Fasertypen aufwei-

sen, je nach ihrer hauptsächlichen Funktion. So weisen Muskelgruppen für dauerhafte Belastungen eher mehr Typ-I-Fasern auf. Muskelgruppen, die für die Zielmotorik zuständig sind, bestehen überwiegend aus Typ-II-Fasern. Die roten Fasern sind in der Lage sich in weiße umzuwandeln, dies geschieht nach veränderter Innervation (Sobotta und Welsch 2006).

Bei Nagetieren wie zum Beispiel bei der Ratte, ist die Verteilung der Muskelfasertypen nicht so heterogen wie beim Menschen. In den tiefergelegenen Muskelgruppen ihrer Haltemuskulatur finden sich andere Anteile an Myosinisoformen als in höher gelegenen Gruppen. Der Soleus, ein tiefergelegener Muskel weist eine höhere relative Expression von MyHC-Isoformen MyHC-I / β und MyHC-IIa auf, diese sind mit einem oxidativen Phänotyp assoziiert. Hingegen weist der oberflächliche Muskel M. gastrocnemius zum großen Teil MyHC-II-X und MyHC-II-B auf, die mit einem glykolytischen Stoffwechsel assoziiert sind. In ihm liegt eine Verteilung der Muskelfasertypen von I < IIX < IIA < IIB vor. (Haizlip et al. 2015) Die Muskelfaserverteilung ist jedoch im medialen und lateralen Anteil des M. gastrocnemius bei der Ratte gleichmäßig (Cornachione et al. 2011).

Es zeigt sich, dass menschliche Muskelgruppen im Vergleich zu Nagermuskelgruppen eine eher homogene Mischung aus langsamen und schnell zuckenden Fasern aufweisen. Bei Nagern zeigen sich deutlich extremere Unterschiede an Faseranteilen vom Typ-I oder Typ-II im jeweiligen Muskel (Jensen et al. 2012). Die Anteile sind jedoch vergleichbar mit den menschlichen, nur sind sie beim Menschen nicht so stark ausgeprägt.

Der Soleus der Ratte enthält zu 84% langsam zuckende Fasern und 16% schnell zuckende oxidative-glykolytische Fasern oder auch intermediäre Fasern genannt.

Der Gastrocnemius setzt sich hingegen aus etwa 58% schnell zuckende glykolytischen, 37% intermediären und nur 5% langsam zuckenden Fasern zusammen (Ariano et al. 1973).

Der Longissimus, ein wichtiger Haltemuskel der Rückenmuskulatur, enthält auch alle 3 Fasertypen, es überwiegen jedoch die schnell zuckenden glykolytischen Fasern. (Schwartz-Giblin et al. 1983) Im Alter nehmen besonders die Typ-II-Fasern durch Atrophie stärker ab als die Typ-I-Fasern. Bei beiden kommt es zum Rückgang der Anzahl an Muskelfasern. (Dickhuth et al. 2010) Die folgende Tabelle fasst die genannten Differenzierungen zwischen den Typ-I und Typ-II Fasern zusammen: (mittels Lüllmann-Rauch und Paulsen (2012))

Tabelle 1: Unterschiede Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern

Typ-I-Fasern	Typ-II-Fasern
<ul style="list-style-type: none"> • makroskopisch rot (Myoglobingehalt↑) • Mitochondrienreich • oxidativer Stoffwechsel • aerob • wenig Glykogen (PAS -) • Zuckungsdauer: 100ms • langsam ermüdend, Ausdauer • gut durchblutet • z.B. M. soleus 	<ul style="list-style-type: none"> • makroskopisch weiß (Myoglobingehalt↓) • Mitochondrienarm • glykolytischer Stoffwechsel • anaerob • viel Glykogen (PAS +), viel ATPase • Zuckungsdauer: 30ms • schnell ermüdend • wenig kapillarisiert • weitere Unterteilung in Typ- 2A, 2B (versch. Myosin-Isoformen), intermediär • z.B. M.gastrocnemius

1.2.7 Die Erregungsübertragung

Signale aus dem Gehirn erreichen die motorische Einheit jeweils über eine Synapse, die auch neuromuskuläre Synapse genannt wird. Dabei unterscheidet sich diese Synapse im Wesentlichen nicht von anderen chemischen Synapsen.

Innerviert wird die Skelettmuskulatur willkürlich über α -Motoneuronen, wobei jede Muskelfaser einzeln angesteuert wird. Im Vorderhorn des Rückenmarks liegen die Somata der α -Motoneuronen. Um jede Faser zu erreichen teilt sich das Axon astförmig auf. Eine weitere Verzweigung findet im Bereich der Muskelfaser statt. Diese Endfüßchen bilden am Ort der Erregungsübertragung dann die motorische Endplatte. Sie stellt die Verbindung zwischen Nerv und Muskelfaser dar, zwischen denen der synaptische Spalt liegt (Sobotta und Welsch 2006).

Ausgehend von der präsynaptischen Seite, den Endfüßchen des Nervens, kommt es dann zur Transmitterfreisetzung, dem Acetylcholin, in den synaptischen Spalt hinein. Das Acetylcholin bindet postsynaptisch an den nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren und leitet so die Erregung fort. Im synaptischen Spalt ermöglicht die an die Basallamina gebundene Acetylcholin-Esterase eine schnelle Spaltung des Acetylcholin, sodass dieses in Form von Acetat und Cholin wieder in das Axonende zurücktransportiert werden kann (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Die Fasern, die zu einer motorischen Einheit zusammen gehören, liegen nicht alle nebeneinander, sondern sind über den Querschnitt eines Muskels schachbrettartig verteilt und mit anderen motorischen Einheiten durchmischt. Diese Anordnung ergibt schließlich eine typische schachbrettartige Verteilung der Muskelfasertypen in einem histologischen Schnittbild. Ist dieses Muster zerstört und liegt eine Gruppierungsformation vor, so kann man davon ausgehen, dass im Mus-

kel eine Reinnervation nach kurzer Denervation stattgefunden hat oder andere pathologische Prozesse an der motorischen Einheit im Gange waren (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Die Art der Erregung ist entscheidend für die letztendliche Muskelkraft, denn die Muskelkraft ist Frequenzcodiert und wird somit zentralnervös reguliert. Je höher die Impulsrate der Motoneuronen ist, desto höher die Kontraktionskraft. Eine motorische Einheit alleine kontrahiert immer mit beinahe gleicher Kraft pro Einzelzuckung, es gilt das Alles-oder-Nichts-Gesetz. Die Kontraktionskraft der Skelettmuskulatur kann auch über die Rekrutierung verschiedener Anzahl an motorischen Einheiten gesteuert werden. Werden mehrere motorische Einheiten gleichzeitig innerviert, steigt die Muskelkraft deutlich an. Daraus ergibt sich auch, dass je kleiner die motorischen Einheiten sind, d.h. nur wenige Muskelfasern gehören zu einer Einheit (5-1000 Fasern), desto feiner kann schließlich auch die Kraft abgestimmt werden. Dieser Aufbau und die damit verbundenen Eigenschaften sind besonders wichtig für die Feinmotorik oder auch der Gesichtsmuskulatur (Schmidt und Lang 2007).

1.2.8 Training und die folgende Muskeladaptation

Training beruht auf dem Prinzip, wonach es im menschlichen Körper durch spezifische Reize zu bestimmten Anpassungsvorgängen kommt. So wird letztendlich versucht durch einen minimalen Aufwand einen maximalen Effekt zu erzielen. Folglich verändert sich durch Training auch die Muskulatur. Sogar die eigentlich zum großen Teil genetisch bedingte Zusammensetzung der Muskelfasertypen kann sich auf den Bedarf des Muskels anpassen. Diese muskuläre Veränderung findet sich sowohl im makroskopisch sichtbaren Bereich bis hinein in die nur unter dem Mikroskop erkennbaren intrazellulären und ultrastrukturellen Bereiche des Muskels. Die Art der Anpassung hängt dabei stark von der Belastungsintensität, -dauer und -häufigkeit ab (Diehl 2009).

Sowohl das Gehirn, der Hypothalamus, die Hypophyse, die Schilddrüse und auch die Nebenniere sind an der Veränderung beteiligt. Insgesamt kommt es durch Training zu einer Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Diehl 2009).

Über das Training kommt es im Muskel intrazellulär zu einer Auslösung von Stress. Dieser wiederum induziert die Bildung vom Hitzeschutzprotein 70 (HSP70), welches stabilisierend auf die entsprechende Zelle wirkt. In der Muskelfaser bewirkt das Protein eine Aufrechterhaltung der Integration, eine Regeneration und schützt vor Apoptose. Im Weiteren wird durch das HSP 70 auch die Muskeladaptation eingeleitet. Diese reicht von einer Muskelhypertrophie, einer Verhinderung der Muskelatrophie, einer Muskelfasertransformation bis hin zu einer verbesserten Muskelfunktion (Senf 2013).

Bei Training verändert sich der gesamte Muskel sichtbar, er hypertrophiert, d.h. die Faserdicke nimmt zu. Dafür sind die Satellitenzellen zuständig, die mittels Proliferation, Mitose und schließlich Fusion, neue Zellkerne an die Muskelfasern liefern. Genau das Gegenteil passiert bei Atrophie, hier nimmt die Faserdicke ab, denn es kommt zu einem beschleunigten Proteinabbau. Folglich findet man hier auch weniger Satellitenzellen (Dickhuth et al. 2010).

Sowohl in der Muskulatur von Ratten als auch in der von Menschen verändert sich die Myosin-Isoform je nach Aktivitätslevel. Bei weniger Aktivität kommt es zu einem Anstieg der schnelleren Myosin Unterformen, wohingegen Ausdauertraining bzw. mehr Aktivität einen Anstieg der langsameren Myosin-Isoformen bewirkt (Daugaard und Richter 2001). Ausdauersportler mit extensiven Belastungen weisen daher eine Typ-I-Dominanz auf. Sprinter, mit kurzen intensiven Belastungen, besitzen hingegen deutlich mehr Typ-II-Fasern in ihrer Muskulatur, denn hier ist die Schnell- und Maximalkraft sehr wichtig (Dickhuth et al. 2010).

Es lässt sich festhalten, dass ergo Typ-II-Fasern bei Sprinttraining zunehmen, wohingegen bei Ausdauertraining die Typ-I-Fasern dominieren und bei Pausen etwa gleich bleiben (Dickhuth et al. 2010).

Ein neues Aktivitätslevel löst sowohl eine morphologische als auch metabolische Veränderung im Muskel und im menschlichen Körper aus. Nach einem mehrwöchigen Kurz- und Langstreckensprinttraining stellte man einen starken Anstieg von Enzymen fest, die besonders wichtig für den Energiestoffwechsel sind. Dazu gehören die Laktatdehydrogenase, die Phosphofruktokinase und die Glykogenphosphorylase. Nach einer Trainingspause von 7 Wochen bis 6 Monaten fielen diese Enzyme auf ihren ursprünglichen Level zurück. Auch veränderten sich wichtige Enzyme innerhalb der Mitochondrien (Ross und Leveritt 2001).

Den metabolischen Veränderungen folgen dann konsekutiv die morphologischen Modifikationen. Zum einen verändert sich der Anteil eines bestimmten Muskelfasertyps. Um zu bestimmen welcher Muskelfasertyp zugenommen hat, werden die verschiedenen Myosin-Isoformen bestimmt. Zugleich wird der Anteil an MHC schweren und leichten Ketten eruiert. Des Weiteren beinhalten die metabolischen Veränderungen eine Volumenzunahme der sarkoplasmatischen Retikula, sodass Calcium schneller und effektiver freigesetzt werden kann. Auch folgt eine allgemeine Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche (Cadefau et al. 1990). Für die Messung von veränderten kontraktile Eigenschaften eignen sich als eine nicht invasive Methode die Messung mittels Elektromyographie und Elektroneurographie (Ross und Leveritt 2001).

Um eine ausreichende Versorgung der stärker beanspruchten Muskulatur aufrechterhalten zu können, ist aber die trainingsbedingte verstärkte Kapillarisation von besonderer Bedeutung. Der

Muskel wird dadurch weiterhin ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Im Gegenzug können Abbauprodukte wie Laktat besser abtransportiert werden. Neben einer deutlich verstärkten Kapillarisation stellte man einen verbesserten Glukosestoffwechsel der Muskulatur nach einem 6-monatigen aeroben Ausdauertraining fest (Prior SJ et al. 2015).

Zusammengefasst verändern sich durch zelluläre Mechanismen die Enzymzusammensetzung und schließlich auch der gesamte Muskel. Die trainingsspezifische Adaptation wirkt sich so schließlich auf die Muskelfasertypen, den Querschnitt und die Durchblutung aus.

1.2.9 Verletzung der Muskulatur

Bei Verletzungen der Muskulatur muss differenziert werden, ob die Basalmembran intakt oder die Kontinuität durchbrochen ist. Eine gute Regeneration gelingt nur, solange diese Kontinuität erhalten ist. Denn sie dient zur Versorgung und hier sitzen die wichtigen Satellitenzellen. Ist eine Verletzung fraktioniert, vernarbt die Muskelfaser bindegewebig, sie kann aber an den durchtrennten Stellen myotendinös regenerieren (Schröder 1982).

Wenn die Basalmembran nach einem Mikrotrauma oder bei Muskeldystrophien intakt geblieben ist, regeneriert der Muskel innerhalb der umgebenen Membranen. Dies geschieht in zwei Phasen. In der Reparaturphase entfernen Makrophagen zunächst die nekrotischen Überreste und setzen gleichzeitig verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine frei, die die Satellitenzellen zur Proliferation anregen. Liegt gleichzeitig jedoch eine Muskeldystrophie vor, ist der Vorrat an Satellitenzellen irgendwann erschöpft und die Bereiche können nicht wieder repariert werden und es käme zu einem Funktionsverlust dieses Muskels (Schröder 1982; Kieb et al. 2010).

Zuletzt folgt die Remodellingphase, bei der die eigentliche Muskelfunktion wieder hergestellt wird. Voraussetzung dafür ist die Einsprossung von Kapillaren und Nerven in den narbigen Bereich. Der Zeitraum bis ein Muskel wieder vollständig regeneriert und belastbar ist, ist im Normalfall beim Menschen relativ kurz (Kieb et al. 2010).

1.3 Sarkopenie

Mit höherem Lebensalter nimmt der Anteil der aktiven Körpermasse, also das Gesamtkörpergewicht minus dem Körperfettanteil ab und wird durch Fettmasse ersetzt. Die aktive Körpermasse, auch fettfreie Masse, stellt die gesamte Muskulatur und ihre Bestandteile dar. Insgesamt kommt es folglich zu einem Verlust an Muskelmasse. Dies ist zum einen altersbedingt, zum anderen liegt es an veränderten stoffwechsellanabolen und -katabolen Faktoren. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die ansteigende Inaktivität im Alter. Die katabolen Faktoren führen zu einer Muskelreduktion und erschweren einen weiteren Aufbau an Muskeln. Neben der Muskelmasse reduziert sich aber auch die Muskelkraft, was zu einer allgemeinen Schwäche im Alter führt. Diese neuromuskulären Veränderungen bezeichnet die Sarkopenie. Eine anerkannte Definition der Sarkopenie ist der altersbedingte Verlust an Muskelmasse, -kraft, -kontraktilität und Funktion (Dickhuth et al. 2010).

Die Anzahl der Muskelfasern reduziert sich, wobei alle Fasertypen betroffen sind. Besonders aber jeweils die schweren Myosinketten. Nur bei Typ II kommt es zudem zu einer Atrophie, d.h. der Muskelfaserquerschnitt nimmt ab. Ersetzt werden die Muskelfasermasse und die muskuläre Proteinmasse dann durch Fett- und Bindegewebeinlagerungen (Dickhuth et al. 2010). In Muskeln mit Sarkopenie ist neben der Muskelfaseratrophie, eine Beeinträchtigung in der Muskelzellautophagie zu beobachten. Zusätzlich ist die Muskelzellapoptose deutlich erhöht. Gleichzeitig liegt häufig eine Mitochondriendysfunktion vor, was zu wesentlichen Regulationsstörungen in der Muskelzelle führt (Ali und Garcia 2014).

Der Verlust an Muskelmasse beginnt schon mit dem 30. Lebensjahr. Jährlich nimmt die Muskelmasse um etwa 1% ab und mit dem 80. Lebensjahr ist nur noch 70% der ursprünglichen Masse vorhanden. Der von einer Sarkopenie betroffene Bevölkerungsanteil schwankt zwischen 10-25% (je nach Untersuchungsmethode und untersuchter Bevölkerungsgruppe). Bei den über 80-jährigen Personen liegt er allerdings bei 50% (Ali und Garcia 2014).

Dies hat erhebliche Folgen für die Gesellschaft. Mit dem Verlust der Muskelmasse kommt es auch zu einem deutlich erhöhten Risiko an Stürzen mit der Folge von Brüchen. Auch eine allgemeine Schwäche und eine reduzierte Lebensqualität können festgestellt werden (Ali und Garcia 2014). Sarkopenie wirkt nicht nur auf den Muskel, sondern ist obendrein mit dem Stoffwechsel eng assoziiert, sodass dort durch gleichzeitige metabolische Veränderungen vermehrt verschiedene Syndrome zu beobachten sind. Neben einer reduzierten peripheren Insulinresistenz, einem Typ-2-Diabetes und veränderten Blutfettwerten, liegen gehäuft Atherosklerosen, Fettlebern, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen und kognitive Dysfunktionen vor. All diese Folgen

schaden der älteren Bevölkerung erheblich und erhöhen dabei deutlich ihre Mortalität (Kwon et al. 2017).

1.3.1 Entwicklung einer Sarkopenie

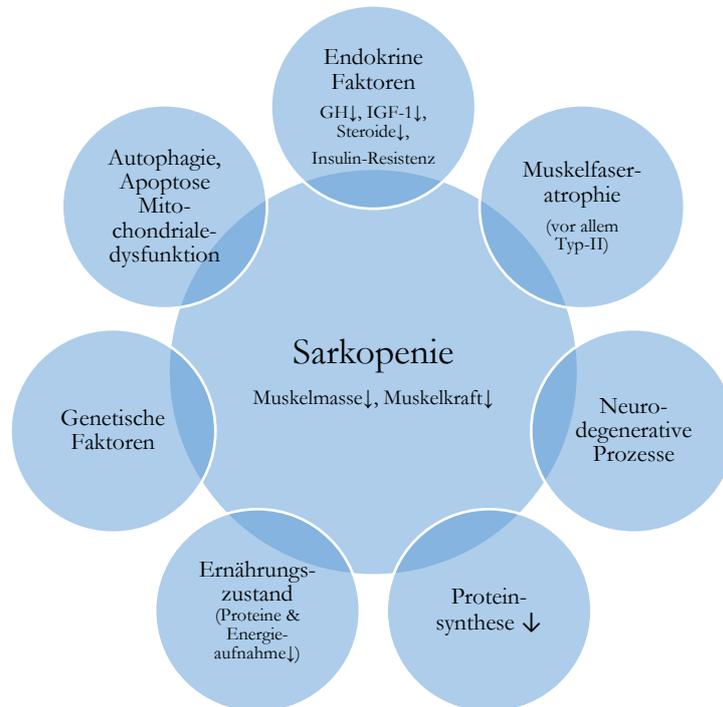
Sarkopenie entsteht pathophysiologisch auf Grund verschiedener Faktoren. So finden sich genetische, neurodegenerative und endokrine Faktoren (GH, IGF-1, Sexualhormone↓). Aber auch die rückgehende Beweglichkeit, Proteinsynthese und zu geringe Protein- und Energieaufnahme über die Nahrung, eine Insulinresistenz, erhöhte proinflammatorische Zytokine und Entzündungsfaktoren sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung (Ali und Garcia 2014).

Insgesamt sind die Prozesse eng mit einem ansteigenden Anteil am Tumornekrose-Faktor TNF- α , einem pro-inflammatorisches Zytokin und dem Wachstumsfaktor Myostatin verknüpft. Gleichzeitig ist der gesamte freie pro-inflammatorische Zytokinanteil im Muskel erhöht (Diehl 2009).

Des Weiteren sinkt der Anteil des wichtigen HSP 70. Dieses Protein ist bedeutsam für die Stabilität und den Aufbau der Muskelfaser und liegt während Trainingsphasen in erhöhten Mengen vor. Man hat festgestellt, dass bei Inaktivität und im Alter die Expression vom HSP 70 deutlich zurückgeht. Wodurch Muskelatrophien, Dysfunktionen in der muskulären Kontraktilität und verringerte Regeneration auftreten. (McArdle et al. 2004). In einer Studie mit Mäusen, die kein HSP70 mehr bilden konnten, fand man neben einer reduzierten Muskelkraft und einem reduzierten Muskelfaserquerschnitt, auch einen erhöhten Entzündungsanteil nach Verletzungen. Auch beobachtete man einen deutlich verlängerten und schlechteren Heilungsprozess. Dieses Ergebnis zeigt, dass das HSP 70 wesentlich zu einer Sarkopenie im Alter beiträgt (Senf 2013). Die Abbildung 3 zeigt zusammenfassend die verschiedenen Prozesse, die zur Ausbildung einer Sarkopenie führen (Abb.3) (Dickhuth et al. 2010).

Abbildung 3: Faktoren die zur Ausbildung der Sarkopenie führen

(modifiziert nach Dickhuth et al. 2010)



1.3.2 Diagnostik der Sarkopenie

Die Sarkopenie ist wie die Osteoporose immer noch unterdiagnostiziert, da Unstimmigkeiten bezüglich des richtigen Ansatzes für eine Diagnostik herrschen. Auch das Erkennen von Risikopatienten konnte in den letzten Jahren nicht verbessert werden. Besonders Patienten mit chronischen Erkrankungen, die mit einer Muskelreduktion zusammenhängen, wie zum Beispiel Diabetes und chronische Herz-, Lungen- und Nierenerkrankungen, sollten bezüglich dieses Muskelschwundes regelmäßig überprüft werden. Zu diesen Patienten sollten auch langjährig Mal- und Unterernährte, Patienten mit einem schnellen Gewichtsverlust von >5%, Alkoholiker sowie chronisch Bettlägerige gezählt werden. Auch wenn hier überwiegend eher eine Kachexie statt einer Sarkopenie vorliegt. Des Weiteren sollten unbedingt und vorrangig Patienten mit einer Ganggeschwindigkeit von weniger als 0,8 m/s über eine Distanz von 4 m beobachtet werden, da dies ein erstes Kennzeichen für eine entwickelnde Sarkopenie darstellt (Ali und Garcia 2014).

Diese gesamte Problematik wurde erstmals im Jahr 2010 durch die Europäische Arbeitsgruppe „Sarkopenie bei älteren Menschen“ aufgegriffen. Es wurden Leitlinien eingeführt, die bei der Diagnostik einer Sarkopenie helfen sollten (Ali und Garcia 2014).

Um eine Sarkopenie diagnostizieren zu können, muss eine niedrige Muskelmasse plus eine niedrige Muskelkraft und/oder eine verringerte körperliche Leistungsfähigkeit vorliegen. Die Kombination von 2 Kriterien ist ausreichend, da die Muskelkraft nicht in einem linearen Zusammenhang zur Muskelmasse steht (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Die Muskelmasse kann über die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) in absoluter Muskelmasse (ohne appendikuläre Muskeln) pro Körpergröße zum Quadrat, dies entspricht der Skelettalen Muskelmasse (SM) gemessen werden. Zu den appendikulären Muskeln zählen die der oberen und die der unteren Extremitäten. Nach den Daten von NHANES III liegt bei Patienten ≥ 60 Jahre eine schwere Sarkopenie vor wenn der Muskelindex bei Männern $\leq 8,50 \text{ kg/m}^2$, bei Frauen $\leq 7,75 \text{ kg/m}^2$ beträgt. Normale Muskelindizes liegen bei Männern bei $\geq 10,76 \text{ kg/m}^2$ und bei Frauen bei $\geq 6,76 \text{ kg/m}^2$. Alle Werte dazwischen zeigen eine leichte Sarkopenie an (National Center for Health Statistics 1996).

Eine weitere Möglichkeit den Skelettmuskelmassenindex (SMI)=Appendikuläre Muskelmasse/Größe² zu bestimmen, besteht in der Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA). Eine Sarkopenie liegt hiernach vor, wenn diese zwei Standardabweichungen unter dem Mittelwert von jungen gesunden Erwachsenen liegen. Die Mittelwerte liegen bei Männer bei $7,26 \text{ kg/m}^2$ und bei Frauen bei $5,5 \text{ kg/m}^2$ (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Die Muskelkraft wird via der Handgriffkraft mit Hilfe von einem Dynamometer bestimmt. Bei Männern ist die Kraft verringert, wenn ein Wert von unter 30 kg festgestellt, bei Frauen ein Wert von unter 20 kg ermittelt wird (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Die Muskelfunktion bzw. körperliche Leistungsfähigkeit und eingeschränkte Selbstständigkeit wird mit Hilfe des Short Physical Performance Battery Test überprüft. Dabei werden die Ganggeschwindigkeit $< 1 \text{ m/s}$, der Aufsteh-und-Geh-Test und der Tandemstand überprüft. Ergeben diese Untersuchungen insgesamt ≤ 8 Punkte, so liegt eine eingeschränkte Muskelfunktion vor (Ali und Garcia 2014).

Gerade die Muskelkraft und die Muskelfunktion lassen sich ohne großen Mehraufwand gleichzeitig mit anderen geriatrischen Beurteilungstests durchführen. Erste Hinweise auf eine mögliche Sarkopenie könnten so leicht aufgedeckt werden. Die Tabelle liefert eine Übersicht über die Diagnostik (Tab.2) (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Tabelle 2: Diagnostik der Sarkopenie und ihre Richtwerte (nach Cruz-Jentoft et al. 2010)

Variable	Messung	Referenz-Ergebnisse
Muskelmasse	Per Hand	Wadenumfang < 31 cm, Armumfang: Männer: < 32 cm; Frauen: < 18cm
	BIA	eine Sarkopenie liegt vor wenn die SM < 2 SD von jungen Erwachsenen Männer: schwere Sarkopenie: $\leq 8,50 \text{ kg/m}^2$ moderate S.: $8,51-10,75 \text{ kg/m}^2$ normale Muskelmasse: $\geq 10,76 \text{ kg/m}^2$ Frauen: schwere Sarkopenie: $\leq 7,75 \text{ kg/m}^2$ moderate S. $5,76-6,75 \text{ kg/m}^2$ normale Muskelmasse: $\geq 6,76 \text{ kg/m}^2$
	DEXA	eine Sarkopenie liegt vor: wenn SMI < 2 SD von jungen Erwachsenen Männer: $7,26 \text{ kg/m}^2$ Frauen: $5,5 \text{ kg/m}^2$
Muskelkraft	Handgriff mit Dynamometer	Männer: < 30 kg Frauen: < 20 kg
Muskefunktion	SPPB	≤ 8
	Ganggeschwindigkeit über 8m	< 1 m/s
	Aufsteh- / Geh-test	> 10 sek

1.3.3 Wirtschaftliche Aspekte der Sarkopenie

Der Anteil der Bevölkerung mit Sarkopenie wird in den nächsten Jahren deutlich zunehmen. Ursache hierfür ist das steigende Lebensalter. So werden im Jahr 2050 etwa 20% der Bevölkerung in den USA über 65 Jahre alt sein (Murphy 2012).

Die Prävalenz der Sarkopenie ist nach wie vor schwierig zu identifizieren. Sie schwankt zwischen 8,4 bis 27,6 %. Die Ursache hierfür liegt an dem bereits genannten fehlenden Konsens zur Diagnostik der Patienten (Baumgartner et al. 1998).

Es ist jedoch eindeutig, dass durch den demographischen Wandel auch der Anteil der Kosten für die Behandlung der Sarkopenie an den gesamten Gesundheitskosten steigen wird. Besonders wenn die Sarkopenie zu einem sehr späten Zeitpunkt erkannt wird, kommt es vermehrt zu Kom-

plikationen, wie Stürzen, Frakturen und Behinderungen, die wiederum eine Hospitalisierung und eine verstärkte Betreuung zur Folge haben. Im Jahr 2000 betrugen die direkten Kosten für die Behandlung der Sarkopenie schon 18,5 Milliarden Dollar. Damit nahm die Sarkopenie bereits einen Anteil von 1,5% der gesamten Gesundheitsausgaben in den USA ein. Es ist daher auch aus wirtschaftlichen Gründen wichtig, eine potenzielle Sarkopenie möglichst frühzeitig zu erkennen und zu behandeln. Durch Prävention der Sarkopenie würden die jährlichen Kosten für das Gesundheitssystem um bis zu 1,1 Milliarden Dollar in den USA gesenkt werden können. In diesen Kosten enthalten sind schon die Ausgaben für neue Kampagnen, Interventionen und weitere Gesundheitsausgaben (Janssen et al. 2004).

Gerade durch die zunehmende Alterung der Bevölkerung sind Investitionen in die Prävention der Sarkopenie ein wichtiger weltweiter Schritt, um die Gesundheitssysteme zukünftig nicht weiter mit horrenden Kosten für die Behandlung der Sarkopeniepatienten zu belasten (Janssen et al. 2004).

Sarkopenie stellt momentan sowohl eine hohe wirtschaftliche als auch gesellschaftliche Belastung dar. Mit einer verstärkten Prävention würde man gleichzeitig indirekt erreichen, dass die ältere Bevölkerung länger unabhängig von Pflege und Betreuung leben kann und eine längere Zeitspanne mit hoher Lebensqualität erhalten bleibt. Die Forschung an der Sarkopenie und ihrer Therapie ist daher zusätzlich unumgänglich (Beaudart et al. 2014).

1.3.4 Zusammenhang zwischen Muskulatur und Knochen

In verschiedenen Studien, wie zum Beispiel einer Studie an 590 finnischen postmenopausalen Frauen, konnten gezeigt werden, dass die Sarkopenie stark mit der Osteoporose zusammenhängt. So entwickeln Frauen mit Sarkopenie 12,9-mal häufiger eine Osteoporose und haben 2,7-mal häufiger Frakturen als solche ohne Osteoporose. Auch an der Handgriffstärke konnte ein Zusammenhang zur Osteoporose gezeigt werden (Sjöblom et al. 2013). Gleichzeitig konnte eine Relation zwischen Muskelgröße und Knochenstärke sowie Knochengröße, sowohl bei Männern als auch bei Frauen festgestellt werden. Zudem besteht ein wichtiger Zusammenhang zwischen der Ganggeschwindigkeit bei älteren Personen und deren Knochengröße, -stärke oder -dichte (Lindsey et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass Muskeln und Knochen sehr eng miteinander verknüpft sind.

Erklärbar wird die Muskel-Knochen-Größen-Relation über die Mechanostat-Hypothese. Sie wurde im Jahr 1960 von Harold Frost aufgestellt. Die Hypothese beschreibt auf Grundlage des Wolff'schen Gesetzes, dass der Muskel durch seine Arbeit und Kontraktion einen direkten mechanischen Reiz auf das Knochenskelett überträgt, sodass Biegemomente (Biegekraft auf Länge)

entstehen (Frost 2003). Osteozyten registrieren diese Spannung, die durch die Kräfte generiert wird. Sie können je nach Bedarf die Sclerostin-Produktion abstimmen und so die Osteoblastenaktivität regulieren (Frost 2003).

Letztendlich führen also dynamische Kräfte auf den Knochen ausgehend von der Muskulatur zur Anregung neuer Osteogenese. Diese Feststellung erklärt, wieso die Größe und Stärke der Muskulatur auch Einfluss auf die Knochengröße hat. Durch zu geringe Kräfte, d.h. niedrige Muskelkraft, ist auch der Knochen weniger gereizt. Es folgt ein Knochendichten- und Knochenfestigkeitsverlust (Edwards et al. 2013).

Gleichzeitig haben aber auch genetische und hormonelle Faktoren Einfluss auf das Wachstum und die Degeneration von Muskulatur und Knochen. Beide können sich direkt oder indirekt auf das muskuloskelettale System auswirken (Edwards et al. 2013).

Ferner zeigen Studien aber auch, dass bereits das Geburtsgewicht und das Gewicht im 1. Lebensjahr Einfluss auf eine spätere Osteoporose und in gleichen Maßen einer Sarkopenie haben können (Syddall et al. 2005).

Weiter spielt auch die Sezernierung von hormonellen Botenstoffen eine unterschätzte Rolle. Bei erhöhter Muskelaktivität kommt es zur Freisetzung von osteoanabol wirkenden Sexual- und Wachstumshormonen, Calcitriol und Parathormon, die sich dann wiederum positiv auf den Knochenstoffwechsel auswirken (Letzing 2009).

Abschließend darf man aber auch nicht das Training vergessen, durch welches sich beide deutlich stärken lassen, sowohl Muskelgröße und –kraft, als auch die Knochenstruktur (Edwards et al. 2013).

1.3.5 Therapie der Sarkopenie

Als wichtigste und medikamentfreie Therapieform sollte das Training und die allgemeine Fitness hervorgehoben werden. Der Zustand der körperlichen Konstitution hat eine starke Auswirkung auf das muskuloskelettale System. Dabei bewies sich vor allem das Progressive Widerstandstraining (PRT) als eine geeignete Methode zur Stärkung der Muskulatur und Knochen bei Sarkopenie.

Durch PRT können sowohl die Muskelmasse, die Muskelkraft aber auch die körperliche Leistung und die Ganggeschwindigkeit wieder verbessert werden. Ferner zeigten auch Aerobic-Übungen eine beträchtliche Verringerung der Gebrechlichkeit (Ali und Garcia 2014; Morley 2016).

Während der Therapie ist indes auf eine ausreichende Zufuhr von Proteinen und Kalzium zu achten, da eine Malnutrition als ein weiteres Risiko für die Sarkopenie agiert. Daneben sollte der 25-hydroxy-Vitamin D-Spiegel überprüft werden. Ist dieser dann zu niedrig sollte man das Vitamin-D substituieren (Beaudart et al. 2014).

Besonders die Supplementation von mit Leucin angereicherten essentiellen Aminosäuren (Molkeproteine) plus Vitamin D bewirkt laut verschiedener Studien eine erhöhte Muskelmasse, verbessert die Bewegung und die Muskelfunktion. Obendrein verringert diese Medikation besonders das Sturzrisiko (Morley 2016).

Medikamentöse Therapien konnten bisher noch keine effektiveren Ergebnisse erbringen als die oben genannten. In Studien wurden die verschiedensten Medikamente bzw. Stoffgruppen getestet. Sie zeigten auch gute bis teils sehr positive Ergebnisse. Jedoch besitzen all diese Medikamente und Stoffe noch sehr beträchtliche Nebenwirkungen, an denen weiter geforscht werden muss, bevor sie für den allgemeinen Gebrauch eingesetzt werden können. Zumal bisher noch kein Nachweis geliefert werden konnte, wonach sie eine bessere Wirkung auf die Sarkopenie im Vergleich zum Training erzielen können (Ali und Garcia 2014).

Zu diesen Medikamenten und Stoffgruppen gehört zum einen das Testosteron, welches in niedrigen Dosen gute Wirkung auf die Muskelkraft und -masse älterer Menschen hat. Allerdings steht es unter Verdacht, die Sterblichkeit und Herz-Kreislauf-Probleme zu erhöhen (Morley 2016).

Ein ähnlicher Ansatzpunkt für die Therapie ist die mit SARMs (Selektive Androgen Rezeptor Modulatoren), die in steroidaler und nichtsteroidaler Form zu finden sind. Gegenüber dem Testosteron konnten diese Mittel bisher aber auch noch nicht die gewünschten Ergebnisse zeigen.

Zwischenzeitlich erhoffte man sich durch die Gabe vom Wachstumshormon IGF-1 eine neue Option gefunden zu haben. Jedoch sind die einher gehenden Nebenwirkungen im Vergleich zum positiven Effekt, nicht tolerierbar. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Studie mit dem Hormon Ghrelin, welches eigentlich die Nahrungsaufnahme und Wachstumshormonproduktion verstärkt.

Viele weitere Medikamente und Ansatzpunkte, wie Inhibitoren des Myostatin oder Activin II Rezeptor Antagonisten, wurden bisher ohne Erfolg getestet. Daher ist es erforderlich, weiter nach einer wirksamen Komponente zu suchen und unterdessen die Sarkopenie durch Training und Vitamin D- und Proteingabe zu therapieren (Morley 2016).

Durch den Zusammenhang zwischen der Muskulatur und der Knochenstabilität sollte bei der Therapie einer Osteoporose oder der Sarkopenie folglich auch immer die Therapie des jeweiligen Gegenspielers in Betracht gezogen werden.

Einige Studien zeigen eindeutig, dass sich bei Frauen mit Osteoporose durch Training der Muskulatur auch die Stabilität der Knochen deutlich verbesserte. Folglich ist es notwendig, in der Osteoporose-Therapie auch die Muskulatur und ihre Struktur genau zu betrachten (Huovinen et al. 2016).

1.4 Die Lipoxygenase Inhibition

Die Lipoxygenasen sind Enzyme, die man im Körper von Menschen, Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen findet. An mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die ein Cis oder Cis-1,4-Penta-Struktur haben, katalysieren sie die Addition von Sauerstoff. Es gibt verschiedene Mitglieder innerhalb der Lipoxygenasefamilie. Im menschlichen Körper gibt es sechs verschiedene Lipoxygenasen (LOX), die 5-LOX, 12-LOX, 12/15-LOX, 15-LOX Typ II, die 12(R)-LOX und die epidermale LOX. Dabei beschreibt die Präfixzahl, die Stelle, wo die Insertion des Sauerstoffs stattfindet (Rådmark et al. 2015).

Die 15-Lipidoxygenase katalysiert die Insertion von molekularem Sauerstoff an das C-15 der Arachnoidonsäure oder der Linolsäure und bildet so die gefäßaktiven Lipoxine. Eine weitere wichtige Lipoxygenase ist die 5-LOX, die man gehäuft in neutrophilen Granulozyten findet. Sie modifiziert die Arachnoidonsäure am C-5-Atom so, dass über 5-Hydroperoxyeikosatetraenoat das Leukotrien A₄ entsteht. Aus diesem können dann die Leukotriene C₃, D₄ und E₄ gebildet werden (Silbernagl und Despopoulos 2007; Heinrich und Müller 2014). 5-LOX wird innerhalb der Zelle stark reguliert und somit auch die Synthese seiner Produkte. Zu finden ist die 5-LOX unter anderem in Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, neutrophilen und dendritischen Zellen sowie B-Lymphozyten. Erst wenn verschiedene Stimuli vorliegen und damit Signalwege aktiviert werden, kann die LOX Leukotriene bilden (Rådmark et al. 2015).

Leukotriene werden auch als „Slow reacting substances of anaphylaxia“ bezeichnet, dies deutet schon auf ihre Mediatorfunktion bei Entzündungs- und Allergievorgängen hin. Sie sind in der Lage, glatte Muskulatur zu kontrahieren und sind so mitverantwortlich für Asthmaanfälle. Auch können sie bei Entzündungen die Kapillarpermeabilität erhöhen und damit zu Ödemen führen und Leukozyten anlocken (Heinrich und Müller 2014). Verschiedene Studien vermuten, dass Leukotriene auch einen wichtigen Einfluss bei Herzerkrankungen, Krebs und Osteoporose haben (Pergola und Werz 2010).

Als Derivat der Arachnoidonsäure findet man die Leukotriene ebenfalls in der Skelettmuskulatur. Obwohl ihre Bildung reguliert ist, stehen sie unter Verdacht für immune und nicht-immune Prozesse verantwortlich zu sein. Gerade bei Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen konnte ein erhöhtes Vorliegen an Muskelschwund, sowie Muskelschwäche und Myopathien festgestellt werden. Es zeigte sich eine Mitbeteiligung von Leukotrienen in der Regeneration eines Muskels, aber auch der Myogenese. Dieser Anteil der Leukotriene führte zur Überlegung, dass eine Hemmung an dieser Stelle möglicherweise eine Sarkopenie und eine postmenopausale Osteoporose reduzieren könnte (Korotkova und Lundberg 2014).

Die Produktion der Leukotriene kann mittels selektiven Lipoxygenase-Hemmer gehemmt werden. In diesem Versuch werden die Lipoxygenase-Hemmer Baicalein und Zileuton auf ihre Effekte auf die Skelettmuskulatur der postmenopausalen Ratte hin evaluiert.

1.4.1 Baicalein

Baicalein ist ein Phytopharmakon und Flavonoid, das aus der Wurzel der *Scutellaria baicalensis* Georgi isoliert werden kann. Dies ist eine Pflanze, die schon lange in der östlichen Medizin verwendet wird, besonders in der chinesischen. Von der *Scutellaria* gibt es über 350 Arten, die in temperierten Regionen und tropischen Gebirgen wachsen, unter anderem auch in Europa, Nordamerika und Ostasien. Außer dem Baicalein können von der Pflanze noch andere wirksame Flavonoide, Glykoside und Glucuronide wie dem Baicalin und Wogonin extrahiert werden (Gaire et al. 2014). Baicalein ist ein Kumarin-ähnliches Derivat, das schon über Jahrtausende zur Behandlung von Knochenkrankheiten benutzt wurde, beispielsweise für Frakturen oder Gelenkproblemen. Von der *Scutellaria baicalensis* werden verschiedene Wirkungen ihrer Bestandteile diskutiert, unter anderem soll sie anti-allergisch, anti-oxidantisch, anti-apoptotisch und anti-entzündlich, neuroprotektiv und anti-karzinogen wirken (Li et al. 2015).

Außerdem kann Baicalein mit der Summenformel $C_{15}H_{10}O_5$ chemisch hergestellt werden und wird von kommerziellen Chemielaboren verkauft (Abb.4) (Pubchem).

In einer Studie an Mäusen und deren Zellvorstufen von Osteoblasten, den MC3T3-E1 Zellen, fand man heraus, dass Baicalein Osteoblasten zur Differenzierung stimulieren kann. Durch Baicalein kommt es zu einer koordinierten Aktivierung von NF-kappaB einem wichtigen Transkriptionsfaktor und der MAP-Kinase, Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase, sodass schließlich der MAP-Kinase/NF-kappaB-Signalweg aktiviert wird, der zur Bildung von Osteoblasten-Differenzierungsmarkern führt (Kim JM et al. 2008). Des Weiteren induziert Baicalein die Aktivierung des Rapamycin-Komplex 1, mTORC1, dieser induziert auch die Bildung von Osteoblasten aus pre-Osteoblasten (Li et al. 2015). Auch auf die bei Osteoporose zu hohe Knochenresorption hat Baicalein Einfluss. So fand man heraus, dass Baicalein die Expression von Osteoklasten-assoziierten Genen und Transkriptionsfaktoren über den RANKL-Signalweg hemmen kann. Dadurch wird die Differenzierung von Osteoklasten gehemmt. Hinzu kommt, dass Baicalein die Apoptose von reifen Osteoklasten aktivieren kann. Obgleich dies bereits bekannt ist, sind weitere umfassendere Studien erforderlich, um seine biologische Wirksamkeit und die genauen Auswirkungen auf den osteoporotischen Knochen und die umliegende Muskulatur zu bestimmen (Kim MH et al. 2008).

Baicalein ist unter anderem auch ein Inhibitor der Lipoxygenase, durch erfolgreiches Hemmen der 12-/15-LOX zeigte sich ein positiver Effekt nach einem akuten ischämischen Insult (Lapchak et al. 2007). Durch die Hemmung der Lipoxygenasen hat Baicalein direkte Wirkung auf periphere Leukotriene, denn ihre Bildung wird dadurch ebenfalls blockiert. Daneben zeigen bereits gelauene Studien an osteoporotischen Knochen, dass sich die LOX-Hemmung durch Baicalein positiv auf die kortikale Knochenmineraldichte auswirkt (Saul et al. 2017b). Unter der parenteralen Gabe von verschiedenen Dosen Baicalein konnten bei ovariektomierten Ratten ebenfalls positive Wirkungen auf die Skelettmuskulatur exploriert werden. Hier wurden bereits positive Effekte auf die Kapillarisation der Muskulatur und einen Anstieg der Muskelfaserdicke bei den Ratten festgestellt. Jedoch traten an der Einstichstelle der Baicalein-Injektion lokale Entzündungen auf. Auf Grund dieser Nebenwirkung sollten in weiteren Versuchen geklärt werden, ob eine andere Applikationsform gegebenenfalls geeigneter ist (Kling 2016). In dieser Studie wurde sich schließlich für eine orale Gabe des Baicaleins mit dem Futter entschlossen.

Baicalein unterliegt einem sehr hohem „First-Pass“-Effekt. Die Metabolisierung ist bereits im Darm sehr hoch, aber auch die Leber ist daran beteiligt. Folglich ist die orale Bioverfügbarkeit nur relativ gering. Schon im Darm wird über 90% des Baicalein zu seinem Hauptmetabolit Baicalein-7-Glucuronid konvertiert. Neben diesen sind noch weitere bekannt, dabei handelt es sich vor allem um konjugierte Glucuronide, Sulfate und Methylate. In der Galle konnte man unter anderem das BGG Baicalein-O-di-Glucuronid, BGS Baicalein-O-Glucuronid-O-sulfate, BGGlu Baicalein-O-Glucose-O-Glucuronid, BG Baicalein-7-O-Glucuronid, MeBG Methyl-O-Baicalein-O-Glucuronid, BG' Baicalein-6-O-Glucuronide, BS Baicalein-O-Sulfat, MeBS Methyl-O-Baicalein-O-Sulfat, nachweisen. Die Abbildung 5 zeigt zum besseren Verständnis die jeweilige Strukturformel der einzelnen Metabolite. (Abb.5)

Ebenfalls bei einer parenteralen Gabe findet man einen hohen Metabolismus durch die Leber. Es lassen sich die gleichen Mono- und Dikonjugate wie bei oraler Gabe ausmachen (Zhang et al. 2011). Dieser hohe First-Pass-Effekt wurde in verschiedenen Studien deutlich. In Affen zeigt sich eine orale Bioverfügbarkeit bei einer oralen Dosisgabe von 50-500mg /kg Baicalein nur zwischen 13,1%-23,0%. Allerdings variiert dies zwischen verschiedenen Arten, was wahrscheinlich an einer unterschiedlichen Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) in den jeweiligen Spezies liegt (Tian et al. 2012). Dahingegen wird bei einer intravenösen Applikation etwa 25% des Baicaleins nicht metabolisiert, was für die Therapie von Vorteil sein könnte (Lai et al. 2003). Folglich sollte man dies bei der oralen Therapie und Verwendung mit Baicalein beachten und die Dosis ggf. anpassen.

Abbildung 4: Strukturformel Baicalein (Pubchem, CID 5281605)

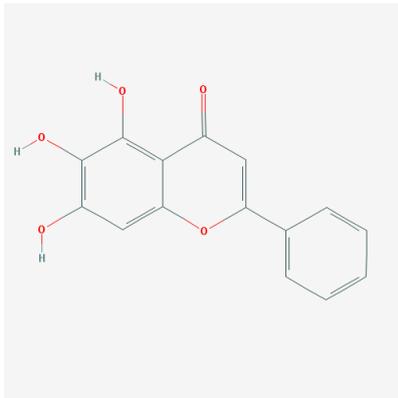
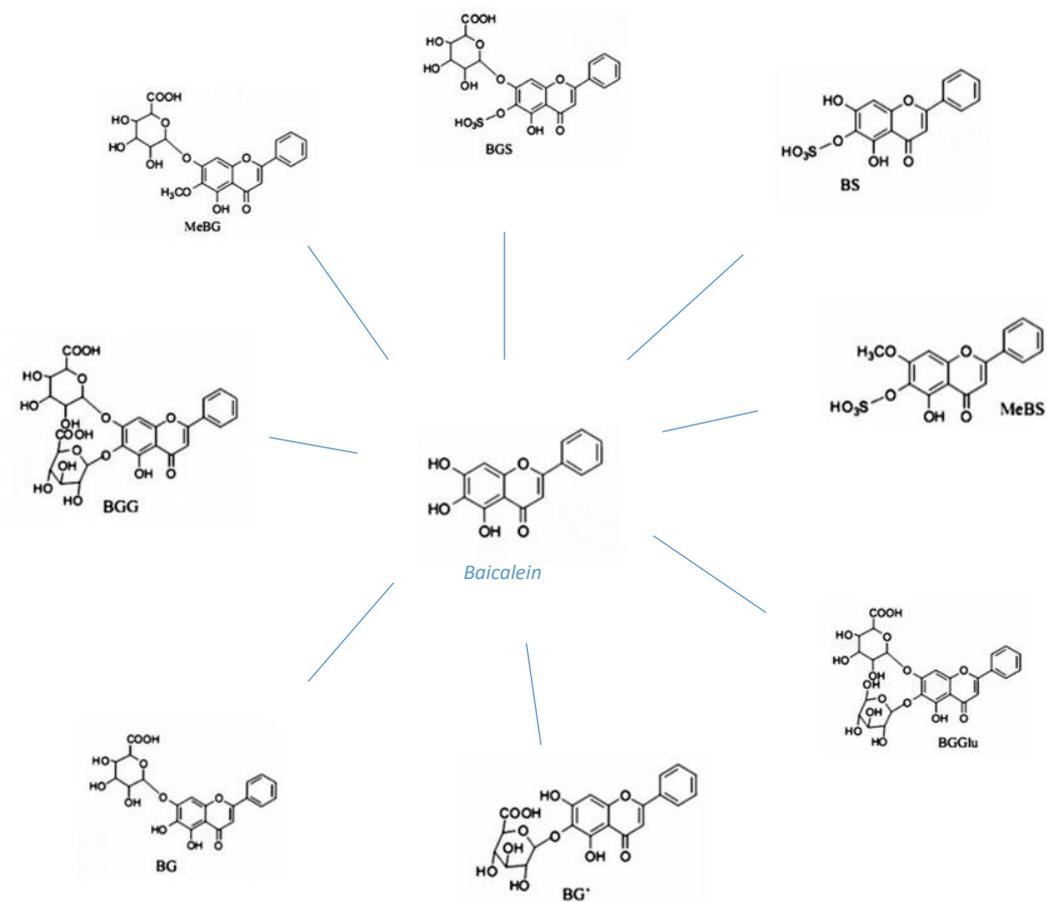


Abbildung 5: Strukturformel von Baicalein und seiner Metaboliten (nach Zhang et al. 2011)



1.4.2 Zileuton

Im Gegensatz zum Baicalein handelt es sich bei dem Zileuton nicht um ein natürliches Pharmazeutikum, sondern um einen extra entwickelten selektiven und reversiblen 5-Lipoxygenase-Hemmer. *N*-(1-benzo[*b*]thien-2-ylethyl)*N*-hydroxyurea wurde Anfang der 80er Jahre in dem Abbott Labor entwickelt. Mit Hilfe seines Ringsystems soll es das aktive eisenhaltige Zentrum von der 5-Lipoxygenase hemmen (Abb.6) (Pergola und Werz 2010). Es handelt sich dabei um eine kompetitive Hemmung, die von der Substratkonzentration abhängig ist. Verschiedene Zelltypen wie Eosinophile oder Mastzellen sind von der Hemmung betroffen, indem Zileuton in die Zellen eintritt und das Enzym intrazellulär blockiert und so die Bildung von Leukotrienen verhindert. Hingegen ist die Hemmung sehr selektiv hinsichtlich des Substrates, Zileuton hemmt gar nicht, oder nur in sehr hohen Konzentrationen über 100 µM die 12- / 15-Lipoxygenase oder die Cyclooxygenase. Zileuton wirkt dadurch anti-allergisch und antiinflammatorisch. Auch kann mit Zileuton erfolgreich Asthma, vor allem schweres persistierendes, therapiert werden. So verhindert das Zileuton zum einen den Bronchospasmus, zum anderen vermindert es die Antigen-induzierte Schleimbildung und die Migration von Eosinophilen in die Lunge (Folco et al. 1999). Durch die verringerte Leukotrinbildung zeigt Zileuton auch bei anderen Erkrankungen, wie Dermatosen, chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, Endotoxiämien, Metastasen der Leber, orale Karzinogenese, multiplen Organverletzungen und Schlaganfällen positive Effekte (Berger et al. 2007).

Zusätzlich bestätigte sich in Studien eine deutliche Reduktion an Prostaglandinen durch Zileuton. Dabei wird diese Produktion schon auf Ebene der Arachidonsäuren-Freisetzung von Makrophagen gehemmt und nicht nur durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase. Gerade dadurch wird der anti-inflammatorische Effekt begünstigt (Rossi et al. 2010).

Es konnte bereits exploriert werden, dass durch Zileuton das Knochenvolumen und das Kortikale- sowie Kallusvolumen in der Tibia zunahm. Des Weiteren konnte im Femur das kortikale Volumen distal und proximal das trabekuläre Volumen gesteigert werden. Allerdings kam es zu keiner Veränderung der Knochendichte. Wiederrum erhöhte sich die Genexpression von Osteocalcin und alkalischer Phosphatase (Saul et al. 2017).

Mit einer Halbwertszeit von 2,5 Stunden wird Zileuton recht schnell metabolisiert. Im Körper wird Zileuton zu 93 % an Plasmaproteine gebunden, hauptsächlich an Albumin und ein kleiner Teil an das α 1-acid Glykoprotein. Ausgeschieden wird Zileuton zum Großteil über den Urin als Zileuton-Glucoronid. Zileuton in seiner Reinform und seine *N*-dehydroxylierte Form werden in der Leber durch die Cytochrom P450-Iso-Enzyme CYP1A2, CYP3A und CYP2C9 oxidiert (Fels et al. 1982). Gleichzeitig ist die gegebene Dosis proportional zur Plasmakonzentration und nach mehrfacher Gabe stellt sich ein Steady-State ein. Die Gabe bzw. Einnahme von Zileuton zusam-

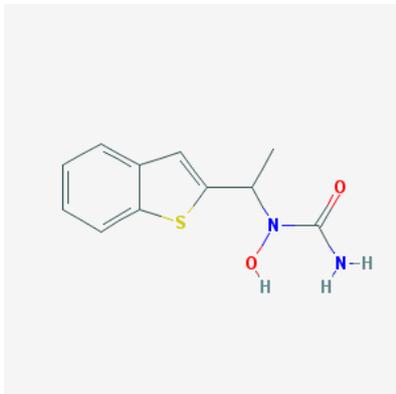
men mit Essen oder ohne unterscheidet sich nicht voneinander, sodass Zileuton den Ratten auch per Futter gegeben werden kann. Bereits bei einer einmaligen Dosis von 600 mg können 98% der Leukotriene B₄ über Blockade der 5-Lipoxygenase gehemmt werden. Die Stärke der Hemmung ist direkt verbunden mit dem prozentualen Anteil an Zileuton im Plasma (Berger et al. 2007).

Das Zileuton weist nur wenig Nebenwirkungen auf, allerdings müssen die Leberwerte, in Form von Transaminasen, kontrolliert werden, da es in 3% zu einer Hepatitis nach 3 Behandlungsmo-naten kommen kann. Des Weiteren verdoppelt sich durch Zileuton der Theophyllin-Spiegel bei gleichzeitiger Gabe, worauf bei gleichzeitiger Therapie geachtet werden muss (Rietbrock et al. 2013).

In Amerika ist Zileuton zur Behandlung von Asthma bereits zugelassen (Berger et al. 2007).

Bisher gibt es noch keine Studien über die Wirkung von Zileuton auf die Skelettmuskulatur. In diesem Versuch soll nun überprüft werden, wie sich das oral aufgenommene Zileuton auf den osteoporotischen Knochen und Muskulatur auswirkt.

Abbildung 6: Strukturformel von Zileuton (Pubchem, CID 60490)



2 Material und Methoden

2.1 Die Versuchstiere

Zu Beginn des Versuchs handelte es sich um 70 weibliche drei Monate alte Ratten von der Rasse Sprague-Dawley. Sie kamen von der Firma Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich.

Um die Ratten später genau identifizieren zu können, wurde ihnen ein Transponder in den Nacken gesetzt. Diese Iso-Transponder wurden subkutan appliziert (UNO MICRO-ID Transponder System 0,21 mm x 12 mm; Uno Roestast-staal BV, Zevenaar, Niederlande) Die Identifikation erfolgt mittels einer individuellen Kontrollnummer. Die Haltung der Tiere fand in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen statt. Dort ist es möglich, eine konstante Temperatur von 20°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55% zu halten und den Tieren einen Tag-Nacht-Rhythmus mittels artifiziellem Licht von 12 Stunden zu ermöglichen. So konnten alle äußeren Haltungsbedingungen konstant gehalten werden. Dabei lebten sie in Käfigen des Typs Makrolon® IV, in jedem Käfig befanden sich 3 - 4 Tiere. Diese Käfige wurden wöchentlich gegen frische desinfizierte ausgetauscht.

Die Tiere wurden in fünf Gruppen zu je 14 Tieren aufgeteilt. Vier Gruppen wurden ovariektomiert (OVX) und bei einer Gruppe, der Kontrollgruppe, fand keine Ovariektomie statt (NON-OVX).

Tabelle 3: Die 5 Versuchsgruppen

Gruppe	Behandlung
1	NON-OVX, keine weitere Behandlung, Kontrollgruppe
2	OVX
3	OVX + Prophylaxe Baicalein (im Futter)
4	OVX + Prophylaxe Zileuton (im Futter)
5	OVX + Prophylaxe Baicalein + Zileuton (im Futter)

Die Ratten hatten Zugang zu frischem demineralisiertem Trinkwasser über einen Spender, welches mindestens 2 mal pro Woche erneuert wurde. Als Nahrung bekamen die Ratten einmal wöchentlich sojafreies Futter zu je 1500 g pro Käfig. Das dann verbliebene Futter wurde gewogen, sodass man die gefressene Menge bestimmen konnte. Wobei die Tiere der Gruppe 3-5 spezielles Futter nach der Ovariektomie bekamen, siehe Tabelle 3. Auch wurden die Tiere einmal pro Woche gewogen.

Die Bezirksregierung Braunschweig genehmigte den Tierversuch im Rahmen des Forschungsprojektes.

2.2 Der Versuchsablauf

Die Tiere wurden zunächst in fünf Gruppen à 14 Tiere geteilt, die unterschiedlich behandelt wurden.

Tabelle 4: Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere

Gruppe	Behandlung	Anzahl am Ende
1	NON-OVX, keine weitere Behandlung, Kontrollgruppe	8
2	OVX	10
3	OVX + Prophylaxe Baicalein	10
4	OVX + Prophylaxe Zileuton	12
5	OVX + Prophylaxe Baicalein + Zileuton	10

Nachdem die Tiere die Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung erreicht hatten, fand drei Wochen später die Ovariectomie bei Gruppe 2 - 5 statt. Ein Tier aus Gruppe 5 musste zuvor auf Grund einer Entzündung am Bein getötet werden, ein weiteres aus Gruppe 3 verstarb während der OVX. Direkt nach der Operation bekamen die Tiere der Gruppe 3 - 5 als Prophylaxe gegen eine Entwicklung von Osteoporose spezielles, phytoestrogenarmes Futter verabreicht. Dabei erhielt die Gruppe dreimal pro Woche Futter, dem eine Dosis von 10 mg/kg KG Baicalein beigelegt worden ist, Gruppe 4 bekam stattdessen Futter mit 10 mg/kg KG Zileuton und Gruppe 5 wiederum wurde mit Futter gefüttert, das jeweils eine Dosis von 10 mg/kg KG Baicalein und 10 mg/kg KG Zileuton enthielt.

Nach acht Wochen fand dann eine bilaterale Osteotomie der Tibia an allen 68 Tieren statt. Perioperativ verstarben zwei Tiere, postoperativ kam es zu Komplikationen durch die Schmerzmittelgabe. Die Verabreichung von zweimal täglich 5 mg/kg Carprieve (Carprieve® 50 mg/ml Injekt, Norbrook Labs Ltd, Newry, Northern Ireland) führte bei einigen Tieren direkt zum Tod und andere mussten auf Grund starker Gewichtsabnahme getötet werden. Insgesamt starben 16 Tiere, die, wie sich in der pathologischen Biopsie herausstellte, durch die Schmerzmittelverabreichung an Magenperforationen gelitten haben. Untersucht wurden die verstorbenen Tiere in der Pathologie des Deutschen Primatenzentrum GmbH, Göttingen.

Um die Frakturheilung im Nachhinein besser beurteilen zu können wurden den Tieren vier verschiedene Farbstoffe zu verschiedenen Zeitpunkten subkutan gespritzt. Am 13. Tag nach der Osteotomie wurde den Ratten zunächst Xylenol Orange (XO) gespritzt. Als nächstes wurde bei ihnen am 20. Tag Calcein Grün (CG) und am 28. Tag Alizarin Komplexon (AK) appliziert. Zuletzt am 36. Tag erhielten sie noch Tetracyclin (TC). Die verwendeten Farbstoffe wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

Die Tiere wurden dann fünf Wochen nach der Osteotomie getötet, dies wurde mittels Dekapitation durchgeführt. Die Knochenheilung wurde im Rahmen anderer Arbeiten untersucht und beurteilt. Der Fokus dieser Studie liegt auf der Muskulatur, sowohl umliegend der Tibia: M. soleus und M. gastrocnemius als auch der Haltemuskulatur: M. longissimus.

2.3 Die Ovariectomie

Drei Wochen nach Ankunft der Ratten im Uniklinikum wurde bei Gruppe 2 - 5, insgesamt 56 Tieren die Ovariectomie durchgeführt. Durch das Entfernen beider Ovarien wird ein Hormonmangel ausgelöst, der einem postmenopausalen Zustand ähnlich ist, eingeleitet. Wie beim Menschen, kommt es auch bei der Ratte zu hormonellen Veränderungen, die schließlich auch zu einer Osteoporose führen können. Zunächst wurden die Ratten für die OP-Reihenfolge randomisiert eingeteilt, diese Reihenfolge wurde auch bei der Osteotomie und letztendlich der Dekapitation eingehalten. Die OP fand in den Sälen der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung an der UMG statt.

Die Tiere wurden auf die OP vorbereitet, indem sie alle zunächst einzeln vor ihrer OP durch Narkoseinhalation mit 3 V/% Isofluran (FORENE® 100%, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG) sediert wurden. Diese Inhalation wurde über die gesamte Operation hindurch verwendet. Gewogen wurden die Ratten mit Hilfe einer Kern® Präzisionswaage Modell 440-53N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland). Danach erhielt jede Ratte einen subkutan applizierten ISO-Transponder (UNO MICRO-ID Transponder System 0,21 mm x 12 mm; Uno Roestaststaal BV, Zevenaar, Niederlande), durch eine Nummer und mit einem Lesegerät (MiniMax II, Data-mars SA, Bedano, Schweiz) konnte so jede Ratte jederzeit genau identifiziert werden. Die Tiere wurden via Inhalation von 3 Vol.-% Isofluran narkotisiert. (FORENE® 100% (V/V) 250ml, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG)

Bevor der Schnitt gesetzt wurde, wurde die Ratte im OP-Bereich, vom Rippenbogen bis zum Hinterlauf kurzrasiert und erhielt eine Injektion von 10 mg/kg KG Langzeitantibiotikum (Bay-tril® 25 mg/ml Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) Gleichzeitig

wurde den Ratten zum Schutz der Augen während der Narkose ein Cornealgel®, Augengel (Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland) aufgetragen. (Abb.7a,b)

Abbildung 7: Operationsvorbereitung

a) Rasur des Operationsbereichs; b) Inhalationsnarkose und Schmerzmittel-Gabe

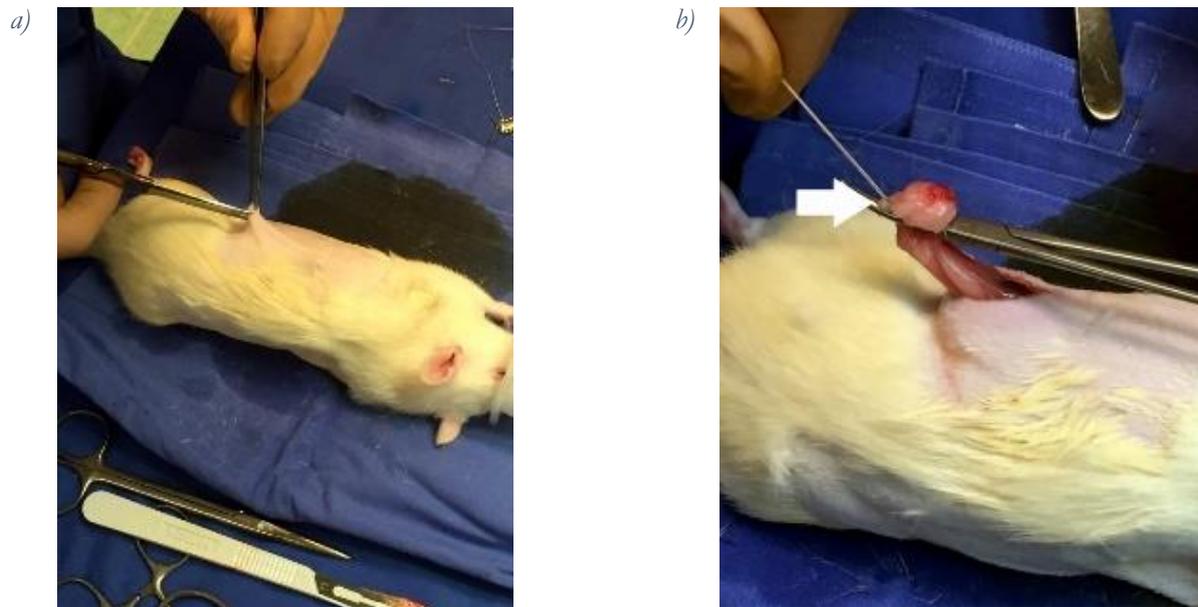


Nachdem das Operationsgebiet nun steril mit Octenisept® Desinfektionsspray (Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert wurde, wurde ein etwa 2cm scharfer Hautschnitt mittels Skalpell lateral der Wirbelsäule unterhalb des Rippenbogens gesetzt, wobei die Ratte auf der Seite lag. Die weitere Präparation und Freilegung der Adnexe erfolgte stumpf (Abb.8a,b). Die Operationsschritte entsprechen denen von vorherigen Studien an ovariectomierten Ratten. Bisher zeigten sie immer positive Ergebnisse in der OVX (Kling 2016; Rechholtz 2017).

An den Adnexen war das Ovar gut darstellbar und so konnten die zu- und abführenden Gefäße und die Tuba uterina mittels Ligation abgebunden werden. Mit dem Skalpell konnte die Adnexe dann abgetrennt werden und der Uterus und das umliegende Gewebe konnten wieder in ihre Normallage zurückgeführt werden (Abb.8b).

Abbildung 8: Die Ovariectomie

a) erster Hautschnitt zur Ovariectomie; b) freipräparierte Adnexe
weißer Pfeil markiert das Ovar



Die entstandene Wunde wird in zwei Schichten verschlossen. Dazu wird zunächst ein resorbierbarer Vicrylfaden, Vicryl® 4.0 Fäden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet, um die Muskulatur mit Einzelknopfnäht zuzunähen. Im zweiten Schritt wird die Kutis mit ca. 5 mm langen Metallklammern wieder reponiert und chirurgisch verschlossen (Abb.9a,b) (Michel-Klammern, 1,2 x 3 mm; Gebrüder Martin GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland).

Zum Schluss wird der Wundbereich noch mit Betaisadonna (Braunol® Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert (Abb.10). Auf beiden Seiten wird identisch vorgegangen.

Abbildung 9: Abschluss der Operation

a) Muskelnaht mit Einzelknopftechnik; b) Hautnaht mit Metallklammern

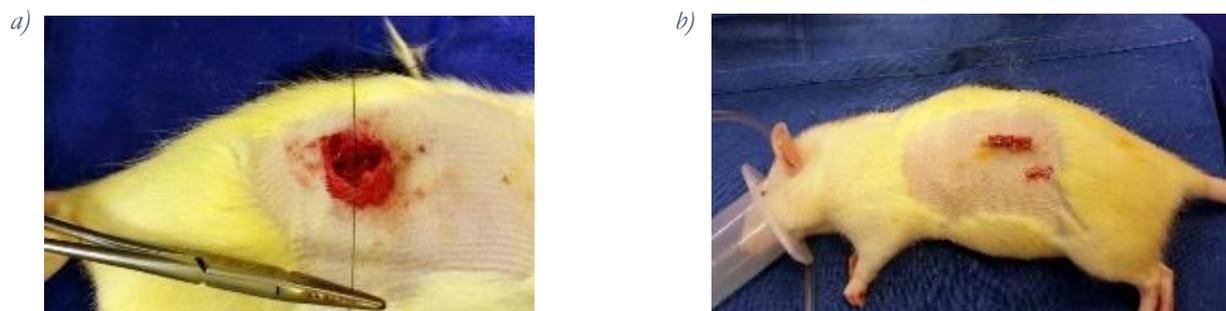


Abbildung 10: Postoperative Desinfektion mit Betaisadonna (Braunol® Lösung)



Um eine zu starke Auskühlung der Ratten zu vermeiden, wurde die OP zum einen zügig durchgeführt und zum anderen wurden sie postoperativ auf eine Wärmematte (Astopad® OPT 130, Stihler Electronic GmbH, Stuttgart, Deutschland) gelegt. Zusätzlich wurde ihnen noch eine subkutane Injektion von 3 ml 0,9%ige NaCl-Lösung (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) im Nackenbereich gegeben. Bereits weniger als eine Stunde nach der Operation konnten die Ratten wieder aufstehen und sich normal bewegen (Rechholtz 2017).

Trotz größter Vorsicht verstarb ein Tier perioperativ durch eine zu tiefe Narkose. Eine weitere musste auf Grund einer Beinenzündung getötet werden.

2.4 Die Behandlung

Postoperativ wurde dann mit der prophylaktischen Therapie der Gruppen 3 - 5 begonnen. So wurden sie schon vor Entwicklung einer manifesten Osteoporose therapiert. Dafür wurde eigens sojafreies Futter durch die Firma ssniff Spezialdiäten GmbH mit dem jeweiligen Wirkstoff hergestellt. Zusätzlich wurden die drei verschiedenen Futter angefärbt um eine Verwechslung untereinander und mit dem normalen Futter zu vermeiden. Die Gruppe 3 bekam als Prophylaxe Baicalein 10mg/kg Körpergewicht (KG), dafür befand sich in 10kg phytoestrogenarmen, violetten Futter 1,75g Baicalein. Gruppe 4 wurde mit Zileuton 10mg/kg KG prophylaktisch therapiert. In ihrem Futter, das auch phytoestrogenarm, aber grün eingefärbt war, befand sich 1,75g Zileuton pro 10kg. Eine weitere phytoestrogenarme, rote Futtermischung wurde aus 1,75g Zileuton und 1,75g Baicalein pro 10 kg hergestellt, dies bekam die Gruppe 5, somit erhielten sie Baicalein und Zileuton jeweils mit einer Dosis von 10 mg/kg KG.

Verwendet wurde das Baicalein von der Firma Sigma-Aldrich (Baicalein 500 mg, Sigma-Aldrich Inc., Darmstadt, Deutschland). Das Zileuton wurde von der Firma Cornerstone Therapeutics INC. (ZYFLO CR® 600mg, Cary, North Carolina) bezogen.

Einmal wöchentlich bekamen alle Tiere ihr jeweiliges Futter und die Restmengen wurden vor erneuter Gabe gemessen, sodass am Ende die tatsächlich aufgenommene Menge und bei Gruppe 3-5 auch die aufgenommene Wirkstoffmenge pro Ratte errechnet werden konnte.

Die Futteraufnahme und die Dosis der jeweiligen Medikamente, die jedes Tier eingenommen hatte, errechneten sich wie folgt:

$$\text{Futtermenge in Gramm pro Tier pro Tag} = \frac{(1500 \text{ g} - \text{Restfutter (g)})}{7 (\text{Tage}) \times \text{Rattenanzahl pro Käfig}}$$

$$\text{Futterdosis in Gramm pro Tier pro Tag} = \frac{1,75 \text{ g Substanz} \times \text{Futtermenge (g) pro Tier pro Tag}}{10000 \text{ g}}$$

$$\text{Futterdosis in Gramm pro g KG pro Tier} = \frac{1000 \text{ g KG} \times \text{Futterdosis (g) pro Tier pro Tag}}{\text{mittleres KG Tiere (g)}}$$

2.5 Die Osteotomie

Um die Frakturheilung in den Gruppen beurteilen zu können, wurden die Ratten acht Wochen nach der Ovariectomie, dieses Mal alle Gruppen, das heißt insgesamt 68 Tiere, erneut operiert. Die Durchführung dieser Operation basiert auf ein Verfahren, dass 2010 in einer Studie von Prof. Dr. Stürmer durchgeführt wurde (Stuermer et al. 2010; Komrakova et al. 2016).

Im Prinzip ist der Vorgang der OP zunächst hinsichtlich der Narkose und Vorbereitung der Tiere für die Operation mit der Ovariectomie identisch. Mittels eines Rasierers werden nun die beiden Rückläufe der Ratten kurz rasiert.

Die Narkose bestand dieses Mal zusätzlich zur Inhalationsnarkose aus einer intraperitonealen Gabe von 37,5 mg/kg Ketamin (Ketamin Inresa 10 ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland) und 2,5 mg/kg Midazolam (Midazolam Rotexmedica 5 mg/ml Injektionslösung, Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Deutschland). Nachdem die Ratte erfolgreich narkotisiert worden ist, wird die bilaterale Osteotomie der tibialen Metaphyse durchgeführt und gleich darauf die Plattenosteosynthese. Die entstandene Wunde wird wieder wie oben beschrieben verschlossen. Da man davon ausgeht, dass dieser Eingriff für die Ratten schmerzhafter ist, bekommen sie zusätzliche Schmerzmittel intra- und postoperativ gespritzt. Intraoperativ erhielten die Tiere jeweils einmal subkutan 50 mg/kg KG Novalgin (Novaminsulfon 500 mg Lichtenstein, Zentiva Pharma GmbH, Frankfurt, Deutschland). Je nach Bedarf wurde einzelnen Tieren zusätzlich Buprenorphin oder Sterofundin gespritzt (Rechholtz 2017).

Intraoperativ erlitten zwei Tiere den Narkosetod. Postoperativ verstarben 16 Tiere bzw. mussten auf Grund starker Gewichtsabnahme getötet werden. Es stellte sich heraus, dass diese Tiere eine Magenperforation erlitten haben, was durch die zu hohe Schmerzmitteldosis ausgelöst worden ist. Es konnte in der Pathologie kein Zusammenhang mit den prophylaktischen verabreichten Medikamenten gefunden werden.

2.6 Die polychrome Sequenzmarkierung

Um die Ossifikation nach der Fraktur besser beurteilen zu können und um feststellen zu können wann diese stattgefunden hat, wurde eine intramuskuläre polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt. Während der Knochenneubildung durch Osteoblasten können in der Phase der Apatitbildung Fluorochrome eingelagert werden. Mit weiterem Knochenwachstum werden die Fluorochrome in die Tiefe mitgezogen (Gradinger und Gollwitzer 2006). Bei der Frakturheilung verbinden sich die Farbstoffe mit Kalzium zu fluoreszierenden Chelatkomplexen, die dann in den gerade mineralisierenden Knochen eingelagert werden. Durch diese Methode sind eine Darstellung der Frakturheilung und die damit verbundene Dynamik im Knochenumbau darstellbar. Diese Bandenstruktur markiert zu welchem Zeitraum der entsprechende Kallus gebildet worden ist, sodass der Frakturheilung am Ende eine definierte Zeitspanne zugeteilt werden kann. Dies geschieht mit Hilfe einer quantitativen fluoreszenzmikroskopischen Analyse (Trautmann 2014).

In unserem Versuch wurden die Tiere an Tag 13 mit XO, am Tag 20 mit CG, am 28. Tag mit AK und am 36. Tag mit TC behandelt.

2.7 Die Dekapitation und Muskelpräparation

Nachdem die 50 verbliebenen Tiere fünf weitere Wochen standen und Gruppe 3 - 5 weiterhin ihr spezielles Futter bekommen hatten, fand die Dekapitation statt. Die Reihenfolge entsprach der von der Ovariectomie. Die Ratten wurden zuvor mit CO₂-Gas-Narkose betäubt. Erst dann wurden sie mit Hilfe einer Guillotine getötet, sodass der Kopf vollständig vom Körper getrennt war (Abb.11).

Abbildung 11: Guillotine für die Dekapitation der Ratten



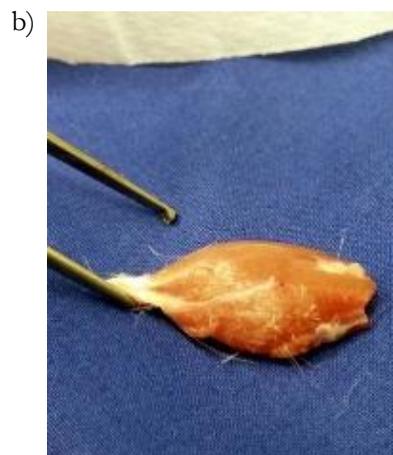
Als nächstes wurde der Uterus entnommen, um mit seinem Gewicht eine erfolgte Ovariektomie nachweisen zu können. Das Gehirn wurde für neurowissenschaftliche Analysen freipräpariert. Es folgte zügig die Präparation der für diese Arbeit wichtigen Muskulatur um postmortale Veränderungen zu vermeiden. Nacheinander wurde jeweils der M. gastrocnemius, M. soleus und M. longissimus entnommen (Abb.12). Dafür wurden zunächst die oberflächlichen Muskeln der Tibia scharf mit einem Skalpell freigelegt, bis der Muskelbauch des M. gastrocnemius zum Vorschein kommt. Nach Durchtrennung der distalen Achillessehne konnte der Gastrocnemius stumpf freigelegt werden, so dass darunter der Soleus zu sehen war. Beide Muskeln konnten mit einer Schere und einer Pinzette stumpf voneinander getrennt werden und proximal von der Tibia gelöst werden (Abb.13a,b). Diese beiden Wadenmuskeln wurden als nächstes gewogen bevor dann randomisiert jeweils eine Seite für spätere enzymatische Untersuchungen in Röhrchen verpackt und die andere Seite, die für histologische Untersuchungen gebraucht wurde, mit Talkumpulver bestäubt wurde. Der mit Talkum bestäubte M. gastrocnemius wurde zusätzlich noch in der Hälfte durchtrennt, um so später leichter Schnittpräparate erstellen zu können. Die Präparate vom Soleus und Gastrocnemius wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, wobei das Talkum der Oberflächenvergrößerung des Muskels dient, die dann ein gleichmäßigeres und gleichzeitiges schnelles Einfrieren mit weniger Zellschäden ermöglicht (Moline und Glenner, G.G. 1964).

Abbildung 12: Präparation der Wadenmuskulatur der Ratte, mit Pinzette gehalten: M. soleus

Pfeil: M. gastrocnemius



Abbildung 13: Präparation der Wadenmuskulatur der Ratte
a) M. soleus präpariert; b) M. gastrocnemius präpariert



Als nächstes wurde der Longissimus freigelegt indem die Haut lateral der Wirbelsäule aufgetrennt wurde und die oberflächliche Muskulatur entfernt wurde (Abb.14). Da aber nur ein Teil des Longissimus freipräpariert wurde, wird dieser nicht gewogen sondern eine Seite direkt im Röhrchen eingefroren und die kontralaterale Seite mit Talkum bestäubt in den flüssigen Stickstoff gegeben. Bevor die Muskelpräparate für die histologische Untersuchung eingefroren wurden, wurden sie in vorher passend beschrifteten Alufolien verpackt. Gelagert wurden sie bis zum Ende des Operationstages im flüssigen Stickstoff. Danach wurden die Präparate bei -80°C Temperatur in einer Kühltruhe sicher bis zur Auswertung verwahrt.

Abbildung 14: Präparation M. longissimus, gehalten mit Pinzette



Des Weiteren entnahm man von der Ratte noch beide Tibiae und Fibulae, beide Femura und fünf Lendenwirbel. Diese sind Teil anderer Arbeiten und werden hier deswegen nicht weiter erläutert.

2.8 Die Herstellung der Muskelschnittpräparate

Die histologische Untersuchung fand unter einem Lichtmikroskop statt, sodass zuvor Schnitte der jeweiligen Muskelgruppen für Objektträger erstellt werden mussten. Dafür stellte das Institut für Nutztierwissenschaften Göttingen sein Kryostat-Mikrotom, Modell CM 1900 der Firma Leica-Microsystems, Nussdorf, Deutschland, zur Verfügung. Mit Hilfe dieses Mikrotoms wurden feinste Gefrierschnitte von 12µm Dicke erstellt.

Für das Erstellen der Muskelschnitte wurde eine Temperatur von -20°C am Mikrotomschneidmesser benötigt. Zunächst wurde jeweils ein Muskel quer auf den Präparathalter mit einem Tropfen destilliertem Wasser befestigt und dann in den Schlitten eingespannt (Abb.15a,b).

Nach einem Schnitt liegt das geschnittene dünne Muskelpräparat auf dem Messer auf. Durch elektrostatische Kräfte konnte der Schnitt direkt auf einen Objektträger übertragen werden.

Die Schnitte wurden so erstellt, dass jede Muskelfaser im Querschnitt angeschnitten wurde. Pro Muskel wurden 3 - 4 Schnitte auf je zwei Objektträger gebracht. Bei 50 Tieren und jeweiligen drei Muskeln, ergab dies letztendlich 300 Objektträger. Bevor sie in die Tiefkühltruhe bei -20°C gelagert werden konnten, mussten sie 2 Stunden nach dem Erstellen trocknen.

Abbildung 15: Präparation am Mikrotom

a) Mikrotom zum Schneiden; b) Schneidmesser mit befestigten Muskel

weißer Pfeil markiert Muskel



2.9 Das Anfärben der Präparate

Die Objektträger wurden in einem nächsten Schritt histologisch gefärbt, um Unterschiede zwischen den Zelltypen bzw. Zellen und Kapillaren besser hervorzuheben. Dafür wurden zwei verschiedene Färbemethoden angewendet. Pro Ratte wurden jeweils ein Objektträger mit der ersten und ein weiterer mit der zweiten Färbung angefärbt.

1. Amylase-PAS-Färbung, nach Andersen (1975), sie dient der besseren Differenzierung zwischen Zellen und Kapillaren (Andersen 1975)
2. Myofibrilläre-ATPase-Färbung mit Diaphorase, nach Horák (1983), durch sie ist eine Differenzierung der Muskelfasertypen möglich (Horák 1983)

Im Anhang dargestellt finden sich die jeweiligen Färbeprotokolle und eine Erklärung zur Herstellung der angewandten Lösungen.

2.9.1 Die Amylase-PAS-Färbung

Dieses Verfahren dient zur genaueren Darstellung der Kapillaren in den Muskelschnittpräparaten. Durch diese Färbung werden hauptsächlich die Polysaccharide, die sich in der Basalmembran von den Kapillaren befinden, angefärbt. Gleichzeitig werden aber auch die Polysaccharide in der Basalmembran von den Muskelfasern angefärbt. Somit lassen sich die Zellgrenzen und Kapillare deutlich darstellen (Qu et al. 1997).

Während der Färbung kommt es zu der Perjodsäure-Schiff-Reaktion, wobei durch die Perjodsäure Glykolgruppen im Präparat zu Dialdehyde oxidiert werden. Mit dem Schiff'schen Reagenz, ein

basisches Fuchsin, werden die Dialdehyde dann nachgewiesen. Ohne die Vorbehandlung mit der Amylase wäre die PAS-Reaktion nur spezifisch für Glykolgruppen, die man aber auch an anderen Stellen als der Membran und extrazellulären Matrix findet. Amylase wirkt glykogenolytisch und spaltet so die Glykolgruppen. Folglich reagieren nur noch Kohlenhydrate positiv nach Zugabe der Perjodsäure. Das Schiff'sche Reagenz reagiert wieder mit ihnen und färbt vor allem das Kollagen und die Basalmembran der Präparate rötlich (Junqueira 1986).

Die Färbung wird nach Andersen durchgeführt, entsprechend dem Protokoll (Andersen 1975):

2.9.1.1 *Das Protokoll der Amylase-PAS-Färbung*

1. Fixierlösung, zunächst wurde eine Fixierlösung aus Ethanol, Chloroform und Essigsäure hergestellt. Diese Lösung gab man für 60 Minuten bei 4°C in die mit Objektträgern befüllten Küvetten.
2. Destilliertes Aqua, nun wurden die Küvetten 10-mal unter fließend destilliertem Wasser durchgespült
3. Amylase hinzufügen, als nächstes wurden die Küvetten mit in destilliertem Wasser gelöster Amylase gefüllt und bei 37°C reagierten sie miteinander für 25 Minuten.
4. Destilliertes Aqua, nachdem die Amylase entfernt wurde, wurden die Küvetten erneut 10-mal mit destilliertem Wasser durchgespült.
5. Reaktion mit Perjodsäure, mit Zugabe der Perjodsäure fand die wichtige Reaktion in der Färbung statt. Sie wurde in die Küvetten gefüllt und verbleibt dort für 30 Minuten, in dieser Zeit wurden die Glykolgruppen oxidiert.
6. Destilliertes Aqua, durch Entleeren der Küvetten wurde die Perjodsäure entfernt und wieder wurden die Küvetten 10-mal mit destilliertem Wasser durchgespült
7. Anfärben mit dem Schiff-Reagenz, für ca. 10 Minuten wurde das Schiff-Reagenz hinzugegeben, wodurch sich die Aldehydgruppen nach und nach anfärbten. Die Dauer dieser Reaktion kann variieren, da eine zu dunkle Färbung vermieden werden sollte und ggf. das Schiff-Reagenz vorher entfernt werden musste. Die Farbintensität wurde überprüft, indem ein Objektträger gegen Licht gehalten wurde.
8. Fixierung um die Färbung zu fixieren wurde anschließend für 30 Minuten schwefeliges Wasser in die Küvetten gegeben.
9. Spülung, dann wurden die Küvetten 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt.
10. Destilliertes Aqua, zuletzt wurden die Küvetten nochmals für drei Minuten mit destilliertem Wasser gefüllt.

Abschließend mussten die Deckgläschen auf die Objektträger aufgebracht werden um die Präparate zu schützen. Dafür wurden jeweils einzelne Objektträger aus der feuchten Küvette entnommen und von der Unterseite mit Papier trocken getupft. Um das Deckgläschen zu befestigen, wurde das wässrige Eindeckmittel Aquatex® der Firma Merck verwendet. Jeweils ein bis zwei Tropfen gab man auf das Präparat und mit Hilfe einer Pinzette legte man die Deckgläschen schließlich so auf das Präparat, dass keine Luftbläschen entstanden (Abb. 16). Das Deckgläschen war nach etwa drei Tagen fixiert, überschüssiger Kleber konnte mit einem feuchten Tuch entfernt werden und die Objektträger wurden in Kästchen zur Aufbewahrung gelegt, bis zur weiteren Untersuchung unter einem Mikroskop.

Abbildung 16: Objektträger mit Muskelpräparaten des *M. longissimus* nach Amylase-PAS-Färbung



2.9.2 Die ATPase-Färbung: Muskeltypenunterscheidung

Um unterscheiden zu können um welchen Muskelfasertypen es sich vor allem in den Präparaten der drei Muskeln handelt, färbt man sie mit der ATPase-Färbung und Diaphorase nach der Methode von Horák an. Hier macht man sich den bekannten Eigenschaften der Muskelfasern zu Nutze, dem Anteil der ATPase und der NADH-Diaphorase Aktivität. (Horák 1983).

Die NADH-Diaphorase ist eine andere Bezeichnung für die NADH-Dehydrogenase, ein Flavoprotein. Sie wirkt als Katalysator von Oxidationen und überträgt Elektronen von einem zum nächsten Stoff. Das NADH oder NAD^+ wirkt dabei als Elektronendonator bzw. -akzeptor. Das Enzym befindet sich im Mitochondrium und ist an der Atmungskette beteiligt. Das Anfärben mit

dem Nitro-Blauem Tetrazoliumchlorid ist daher ein Maß für die Menge an Mitochondrien, die sich in dem jeweiligen Muskelfasertyp befinden (Heinrich und Müller 2014).

Folglich lassen sich mit dieser Färbung oxydative, Typ-I und glykolytische, Typ-IIb Muskelfasertypen voneinander unterscheiden. Auch findet man in den Präparaten Muskelfasern vom intermediären Typ-IIa (Schröder 1982).

Bei der Färbung nutzt man zusätzlich noch die unterschiedliche pH-Stabilität und Aktivität der ATPasen in den Muskelfasertypen. Das Actomyosin, bestehend aus schnellen Typ-II Fasern hat eine 3-mal höhere ATPase Aktivität als die von langsameren Fasern und ist alkalistabiler und säurelabiler. Dies bedeutet, dass die ATPase der Typ-II Fasern nur bei höheren pH-Werten stabil bleibt, bei niedrigen jedoch an Stabilität und somit auch an Aktivität verliert. Das pH-Optimum der ATPase vom Typ-I liegt hingegen umgekehrt im sauren Bereich. Durch das Nutzen einer Inkubationslösung mit einem niedrigen pH-Wert wird die ATPase von Typ-II gehemmt und nur noch die Typ-I Fasern färben sich an (Guth und Samaha 1969).

2.9.2.1 *Das Protokoll der ATPase-Färbung*

1. Fixieren des Präparates, zunächst wurde eine Fixierlösung aus Paraformaldehyd, Calciumchloriddihydrat, Saccharose und destilliertem Wasser hergestellt. Dabei wurde ein pH-Wert von 6,3-6,6 eingestellt. Erst dann wurde sie für eine Minute in die, in Küvetten stehenden Objektträger, gegossen.
2. Destilliertes Aqua, zum Waschen wurden die Küvetten nun für 5 Minuten mit destilliertem Wasser befüllt, diesen Vorgang wiederholte man.
3. Inkubation mit Diaphorase, hierfür wurde zunächst die Inkubationslösung aus NADH-Dinatriumsalz, einem Phosphatpuffer, Nitro-Blauem Tetrazoliumchlorid und destilliertem Wasser hergestellt. Dann wurden die Objektträger in eine Feuchtekammer gelegt und dann mit der Inkubationslösung beträufelt. Die Feuchtekammer gab man dann in eine Inkubationskammer für 60 Minuten bei 37°C.
4. Destilliertes Aqua, erneut wurden die Objektträger in Küvetten platziert und mit Hilfe von destilliertem Wasser für 15 Minuten gewaschen.
5. Inkubation mit einer sauren Lösung. die saure Lösung bestand aus einer Calciumchlorid-Stammlösung, Eisessig, und destilliertem Wasser, sodass der pH Wert mit Hilfe von Salzsäure oder Natriumhydroxyd auf 4,2 eingestellt werden konnte. Diese wurde dann für 15 Minuten in die Küvetten gegeben.
6. Anwendung eines organischen Puffers. der Puffer wurde aus der Calciumchloridstammlösung, destilliertem Wasser und Tris-Aminomethan, einer schwachen basischen Verbin-

dung hergestellt. Die Tris-Calciumchloridlösung wurde nun für zwei Minuten zu den Objektträgern gegeben.

7. Inkubation mit der ATPase, nun fand die Färbung mittels einer Lösung aus Kaliumchlorid, ATP, Glycinpuffer und der Calciumchloridstammlösung statt. Mit Hilfe von Salzsäure oder Natriumhydroxyd wurde ein pH-Wert von 9,4 eingestellt. Wieder wurden die Küvetten in die Inkubationskammer für 30 Minuten gestellt.
8. Waschung mit Calciumchlorid, es folgte eine dreimalige Reinigung für jeweils 30 Sekunden mit Calciumchlorid, dies wurde aus Calciumchloriddihydrat und destilliertem Wasser hergestellt.
9. Waschung mit Kobaldchlorid, aus Kobaltchlorid und destilliertem Wasser wurde eine Lösung unter dem Abzug angefertigt, da Kobaldchlorid kanzerogen ist. Auch die Küvetten wurden unter dem Abzug für zwei Minuten mit der Lösung inkubiert.
10. Destilliertes Aqua, um die gesamte Kobaltlösung zu entfernen wurden die Küvetten als nächstes mit destilliertem Wasser dreimal für 45 Sekunden gewaschen.
11. Hinzugabe von Ammoniumsulfid, es folgte eine zweiminütige Hinzugabe von Ammoniumsulfid mit destilliertem Wasser.
12. Reinigung mit Leitungswasser, für etwa 10 Minuten stellte man die Küvetten unter fließendem Wasser.
13. Destilliertes Aqua, bevor die Präparate auf den Objektträger wieder mit Deckgläschen bedeckt wurden, füllte man die Küvetten wieder mit destilliertem Wasser. (Abb.17) Das weitere Vorgehen mit den Deckgläschen entspricht der Amylase-PAS-Färbung.

Abbildung 17: Objektträger mit Muskelpräparaten des *M. longissimus* nach ATPase-Färbung

2.10 Die Auswertung der gefärbten Muskelpräparate

Für die Auswertung der Muskelpräparate wurde das Mikroskop von dem Modell Nikon Eclipse E600 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) unter zehnfacher Vergrößerung mit eingebauter Kamera und Softwarekopplung von dem Institut für Nutztierwissenschaften Göttingen verwendet. Mit Hilfe des Mikroskops wurden die Präparate unter zehnfacher Vergrößerung betrachtet und zunächst von jedem Objektträger 3 Ausschnitte eines Präparates abfotografiert und als digitale .tif-Datei gespeichert.

Die Auswertung der beiden Färbungen konnten schließlich mit dem NIS-Elements AR-Programm (Advanced Research; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt werden.

2.10.1 Die Auswertung der Amylase-PAS-Kapillarfärbung

Diese Färbung dient der Untersuchung, wie sich die Kapillardichte in Relation zu der Zellzahl verändert hat. Dafür untersuchte man die 150 Präparate mit Hilfe des Programms. Hierfür zählte man in den drei Ausschnitten einer Ratte die Zellen und Kapillaren, die sich innerhalb eines Kästchens mit einer Seitenlänge von 500 μm mal 500 μm , also 0,25 mm^2 befanden. Die erhobenen Zahlen wurden in eine Excel-Datei eingefügt und das Verhältnis der Kapillaren zu den Zellen berechnet:

$$\text{Ratio Kapillaren pro Zelle } (n) = \frac{\text{Anzahl Kapillare } (n)}{\text{Anzahl Zellen } (n)}$$

Durch die Färbung ist vor allem die Basalmembran der Muskelfasern als auch der Kapillare leicht dunkler angefärbt als der Extrazellularraum oder das Sarkoplasma, sodass sich beide differen-

zieren lassen. Mit Hilfe des Programms NIS-Elements AR ließ sich eine Fläche von 0,25 mm² genau eingrenzen. In dieser Fläche konnten dann die Zellen und Kapillaren ausgezählt werden. Das Quadrat besitzt dabei zwei gestrichelte und zwei durchgezogene Ränder als Begrenzung. In dem entstandenen Quadrat wurden die Zellen, die die zwei gestrichelten Ränder überschritten noch mitgezählt. Solche Zellen, die jedoch die beiden durchgezogenen Ränder kreuzten, wurden nicht gezählt (vgl. Abb.18). Insgesamt wurde so das Verhältnis der Kapillarisation zur Zellzahl in den einzelnen Muskeln M.gastrocnemius, soleus und longissimus der verschiedenen Behandlungsgruppen ermittelt (Abb.19).

Abbildung 18: Muskelpräparate des M. longissimus nach Amylase-Färbung

Weißes Beispielquadrat, welches als Begrenzung diente; grünes Plus: einzelne ausgezählte Muskelzellen und Kapillare

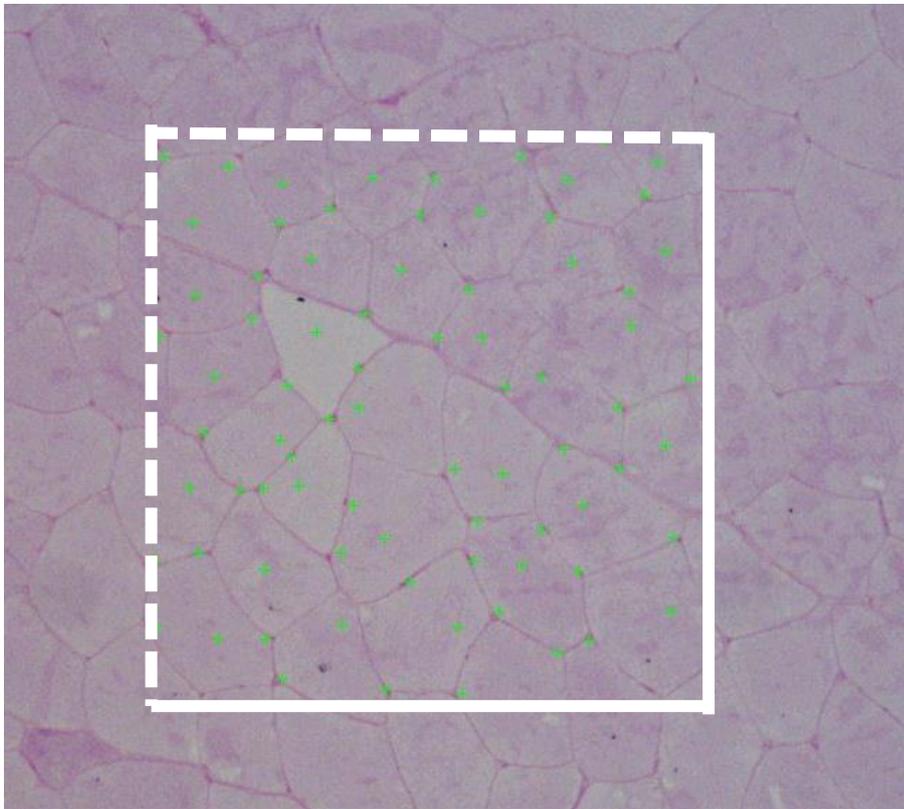
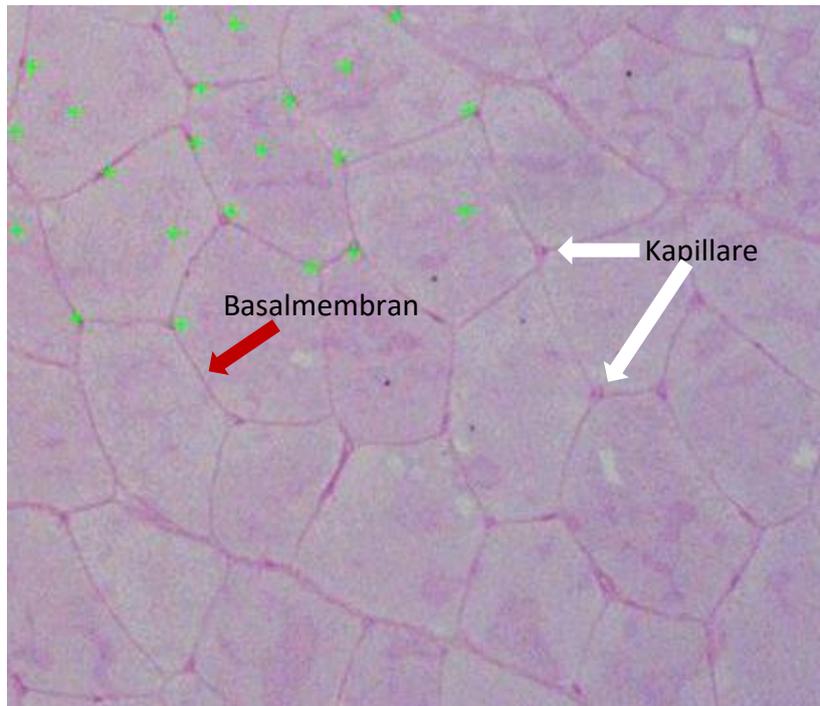


Abbildung 19: Muskelpräparate des M. longissimus nach Amylase-Färbung mit Beschriftung
roter Pfeil: Basalmembran, weiße Pfeile: Kapillare; grünes Plus: einzelne ausgezählte Muskelzellen und Kapillare



2.10.2 Die Auswertung der ATPase-Diaphorasefärbung

Mit Hilfe dieser Färbung wurde nun der Unterschied der verschiedenen Muskelfasertypen innerhalb eines Muskels deutlich. Die oxydativen Typ-I-Zellen sind stark dunkel-bläulich gefärbt, wohingegen sich die glykolytischen Typ-II Fasern hellbläulich darstellen. Ein weiterer Zelltyp sind die intermediären Typ-IIA. Diese sind ein Zwischentyp von beiden vorher genannten und haben einen gut erkennbaren dunkelbläulichen Rand. Die Färbung dient der Bestimmung des Durchmessers und der Fläche der jeweiligen Zelltypen.

Zunächst wurden beim M. longissimus je 30 Typ-I-Zellen und 30 Typ-IIA-Zellen pro Ausschnitt in drei verschiedenen Präparaten umrandet. Folglich zählte man 180 Zellen pro Tier. In den Präparaten konnte nicht zwischen dem Typ-IIA- und Typ-IIB- Fasertypen unterschieden werden, sodass beide zusammengefasst untersucht und als Typ-II benannt wurden.

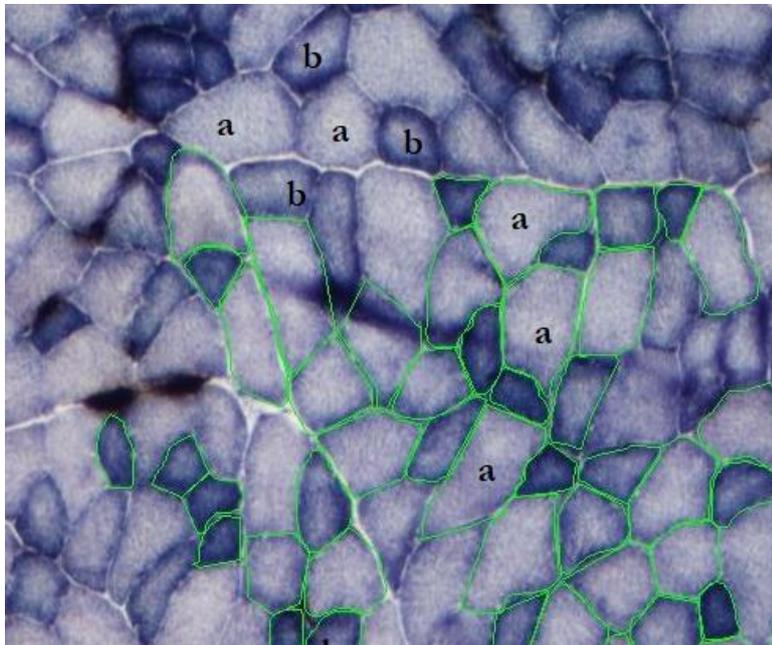
Die Zellen wurden mit einem Zeichentool innerhalb des Programms umrandet, so konnte die Fläche und später aus der Fläche der Durchmesser errechnet werden. Beim Longissimus wurden zusätzlich die Verhältnisse von Typ-I- zu Typ-II-Zellen auf 0,5 mm² ausgezählt, 500 µm mal 1000 µm.

Beim *M. gastrocnemius* ging man genau wie bei *M. longissimus* vor, sodass wieder 180 Zellen pro Tier umrandet wurden. Hier wird kein Verhältnis bestimmt, da die Verteilung der Muskeltypen immer sehr unterschiedlich ist (Abb.20).

Beide Muskeltypen wiesen zu wenig Differenzen zwischen den Typ-II-A- und B-Fasern auf, um sie repräsentativ auswerten zu können. Daraufhin wurde wie beim *M. longissimus* entschieden, beide zusammen als Typ-II-Muskelfasern mit den Typ-I-Fasern auszuzählen.

Es ist auffällig, dass die Anordnung der Muskelfasertypen in etwa einem Schachbrettmuster entspricht, dies findet man so auch beim Menschen (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Abbildung 20: Muskelpräparate des *M. gastrocnemius* nach ATPase-Färbung

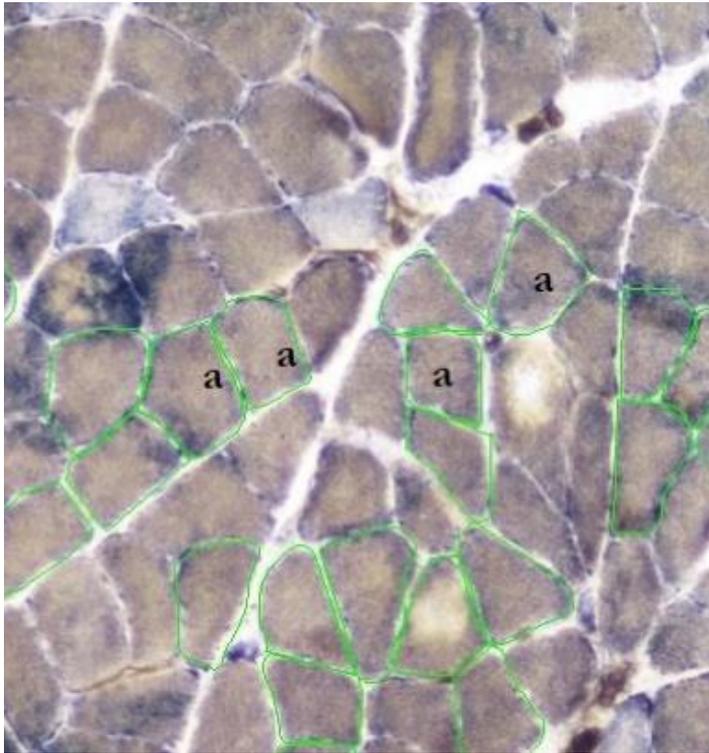


*a = Typ-II, b = Typ-I-Fasern;
grüne Umrandung einzelner Muskelzellen
zur Bestimmung des Durchmessers und
der Fläche*

Schließlich folgte die Analyse des *M. soleus*. Bei diesem Muskel findet sich überwiegend der Typ-I-Zelltyp, sodass pro Ausschnitt nur 30 Zellen ausgewertet wurden (Abb.21). Da dieser Muskel zu über 90% aus dem Muskelfasertypen, Typ-I, besteht, wurden nur diese Fasern gemessen (Kling 2016). Dafür werden die Zellen in 3 Schnitten umrandet, sodass insgesamt 90 Flächen in die Auswertung kommen. Nach Berechnung der Durchmesser und der Fläche der einzelnen Muskelfasern wurde schließlich ein Mittelwert pro Tier für jeden Parameter gebildet und weiter statistisch untersucht.

Abbildung 21: Muskelpräparate des M. soleus nach ATPase-Färbung

a = Typ-I; grüne Umrandung einzelner Muskelzellen zur Bestimmung des Durchmessers und der Fläche



2.11 Auswertung der Serumanalyse

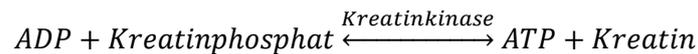
Nach der Dekapitation wurde Blut von jeder Ratte entnommen und zur Analyse in Eppendorf Röhrchen gefüllt (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Diese Röhrchen wurden zunächst bei -20 Grad gelagert. Die weitere Analyse der Serumparame-ter wurde in der Klinischen Chemie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt (Kling 2016).

Mit Hilfe der Bestimmung der Serumproteine kann schließlich eine Aussage zu der Muskelfunk-tion und dem Muskelzustand erhoben werden.

Eine besondere Bedeutung hat die Kreatinkinase im Muskel. Sie katalysiert die Reaktion zwischen Kreatin mit ATP zu Kreatinphosphat und speichert so die Energie, um sie für folgende Muskel-kontraktionen nutzen zu können. Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen der Kreatin-kinase. Die CK-BB, die sich im Gehirn findet, die CK-MB des Herzens sowie die CK-MM der Skelettmuskulatur (Dörner 2009). Das Kreatinkinase-System ist unabdinglich für das wiederauf-bauen der ATP aus ADP in einer Muskelzelle. Dabei wird von Kreatinphosphat das Phosphat

auf das ADP intrazellulär übertragen, sodass schließlich Kreatin zurück bleibt. Man nennt dies auch ein anaerobes Phosphorylierungssystem (Diehl 2009).

Um zu ermitteln wie viel Kreatinkinase sich quantitativ in der Serumprobe befindet, wurde das Creatine Kinase Assay in der Klinischen Chemie verwendet. Dies befindet sich innerhalb des Architect c16000 Analysiergeräts der Firma Abbott, Wiesbaden. Grundlage ist die gezeigte Reaktion der Kreatinkinase.



Im Serum wird die Kreatinkinase durch zusätzlich hinzugefügtes N-Acetylcystein (NAC) aktiviert. Das gebildete ATP wird mit Glucose durch die Hexokinase in Glucose-6-phosphat und ADP umgewandelt. Mit der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase reagiert das Glucose-6-phosphat wiederum mit $NADP^+$ zu 6-Phosphogluconolacton und $NADPH+H^+$. Die gebildete Menge an NADPH kann mit einem optischen Nachweis bei 340nm Wellenlänge errechnet werden. Da die Menge NADPH proportional zum Anteil der Kreatinkinase ist, konnte so die im Serum enthaltene CK quantitativ ermittelt werden (Dörner 2009).

Die Muskelkontraktion und somit auch die Funktion der Muskulatur hängen des Weiteren auch von den Serumelektrolyt-Werten ab. Gerade das Magnesium und das Calcium haben Einfluss auf diese und wurden folglich mit bestimmt, um eventuelle Veränderungen durch die Therapien zu erkennen (Schröder 1982). Das Calcium wurde mit Hilfe des Farbstoffes Arsenazo III angefärbt und ermittelt.

Um die Magnesiumkonzentration ermitteln zu können wurde erneut der Farbstoff Arsenazo III ins Serum gegeben. Zusammen mit einem Chelatbildner, der das im Serum befindliche Calcium komplexieren konnte. Dies wurde gemacht um eine Störung des Calciums bei der Messung zu verhindern. Bei einer Wellenlänge von 572nm konnte mittels optischen Nachweises die Magnesiumkonzentration bestimmt werden.

Sowohl die Calcium- als auch die Magnesiumkonzentration wurde mit Hilfe des Architect c16000 Analysiergeräts der Firma Abbott, Wiesbaden, in der Klinischen Chemie, eruiert (Kling 2016).

Tabelle 5 : Reaktionsschritte der Kreatinkinase (Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie 1972)

- (1) Kratinphosphat + ADP → Kreatin + ATP**
- (2) ATP + Glucose → Glucose-6-phosphat + ADP**
- (3) Glucose-6-phosphat + NADP → Gluconat-6-Phosphat NADPH+H**

2.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, USA), übertragen, um dort weiter bearbeitet zu werden. Für die statistische Analyse wurde das Statistikprogramm Prism 5.0 der Firma Graph Pad Software Inc., San Diego, USA verwendet.

In dieser Studie wurde die one way analysis of variance (one-way ANOVA) und der Tukey-Kramer post hoc Test angewendet. Mit letzterem lassen sich Signifikanzen unter den Gruppen exakter bestimmen.

Die Daten wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. In der Teststatistik wurde ein p-Wert = Signifikanzwert/Überschreitungswahrscheinlichkeitswert von $p < 0,05$ verwendet. Die signifikanten Unterschiede wurden mit einem p-Wert: $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,01$ hochsignifikant und $p < 0,001$ höchstsignifikant definiert.

Es wurden die folgenden Bezeichnungen benutzt:

* → $p < 0,05$; ** → $p < 0,01$; *** → $p < 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewichte, Futter- und Dosisaufnahme und Muskelgewichte

3.1.1 Körpergewichte

Direkt von Versuchsbeginn an wurden die Ratten wöchentlich gewogen. Ihr Gewicht unterschied sich zu Beginn des Versuches nicht signifikant (Abb.23). Am Ende war ein höchstsignifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit und denen ohne Ovariectomie festzustellen (Abb.22). Im Durchschnitt hatten die OVX, Baicalein, Zileuton und Baic.+Zileu.-Gruppe einen Gewichtsunterschied von zusätzlichen 92,635 g zur Non-OVX-Gruppe. Zwischen den unbehandelten und den behandelten ovariectomierten Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 22: Körpergewichte zu Versuchsende; *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)

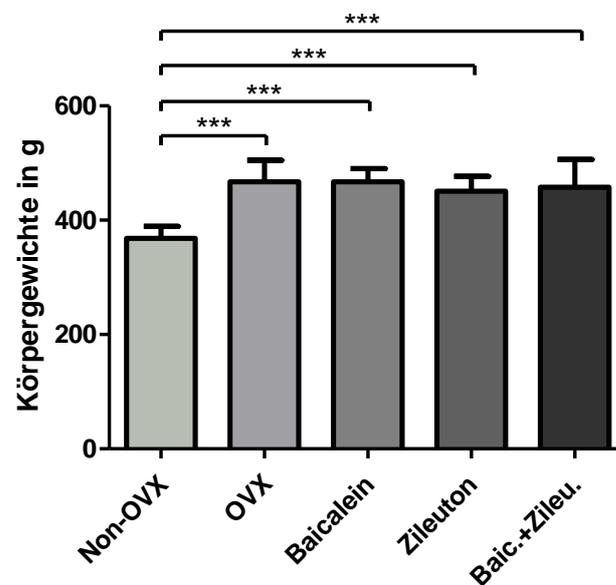
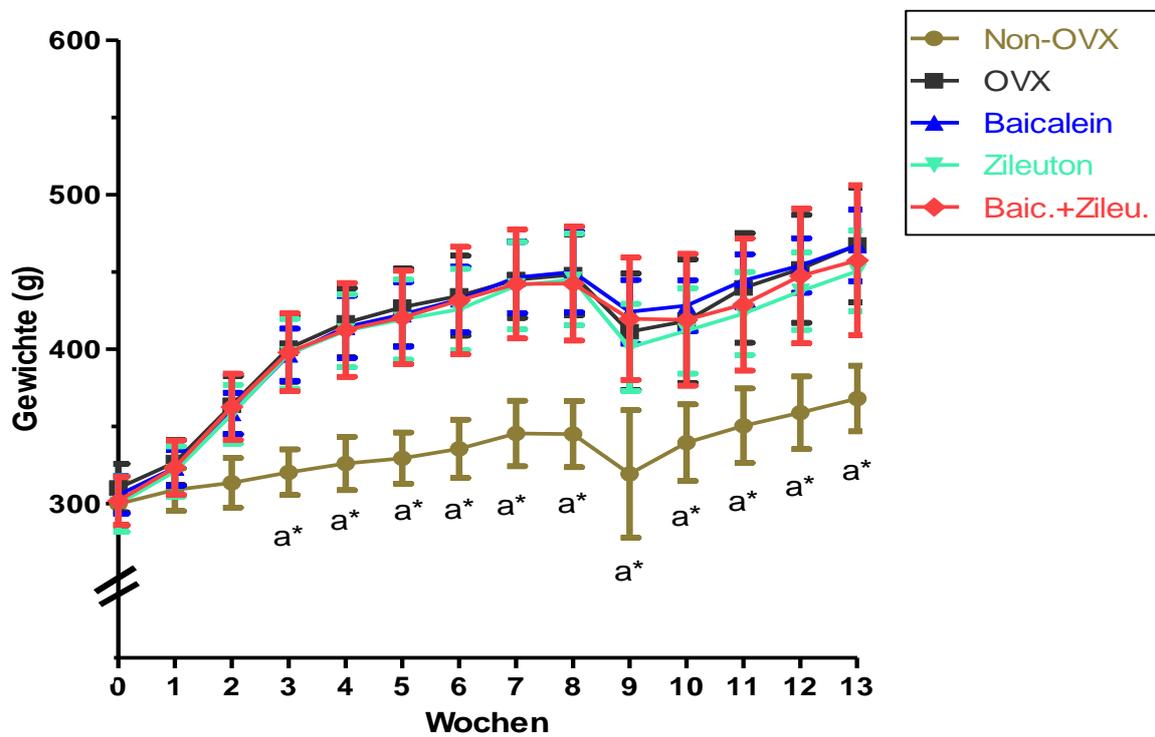


Abbildung 23: Körpergewichte im Verlauf

*a = Non-OVX vs. alle übrigen Gruppen, * $p < 0,05$*



3.1.2 Analyse der Futteraufnahme

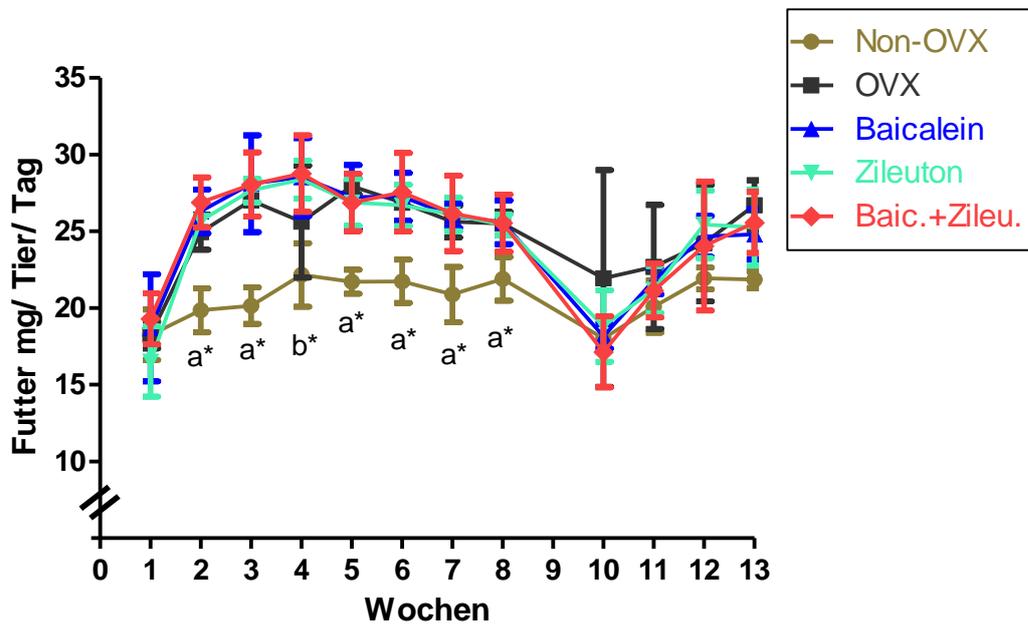
Durch die Analyse der aufgenommenen Futtermenge pro Käfig konnte die wöchentliche Aufnahme pro Tier bestimmt werden. Dafür wurde jeweils das Restfutter nach 7 Tagen gemessen und neues Futter à 1500 g gegeben.

Die aufgenommene Futtermenge unterschied sich in der zweiten bis achten Woche signifikant zwischen den behandelten Gruppen und der Non-OVX. Im Schnitt nahmen die Tiere deutlich mehr Futter zu sich als die ohne Ovariectomie. Zur OVX Gruppe und den behandelten Ratten ließen sich keine Divergenzen bezüglich der Futteraufnahme eruieren. Die Futteraufnahme der OVX lag in der zweiten und dritten Woche, sowie der fünften bis achten Woche signifikant über der Futteraufnahme der Non-OVX (Abb.24).

Nach der Osteotomie, die in der 9. Woche durchgeführt wurde, kam es zu einem starken kurzzeitigen Abfall der gefressenen Menge. Bis zum Versuchsende normalisierte sich die Aufnahme in allen Gruppen wieder (Abb.24).

Abbildung 24: Aufgenommene Futtermenge pro Tier in mg pro Tag im Verlauf

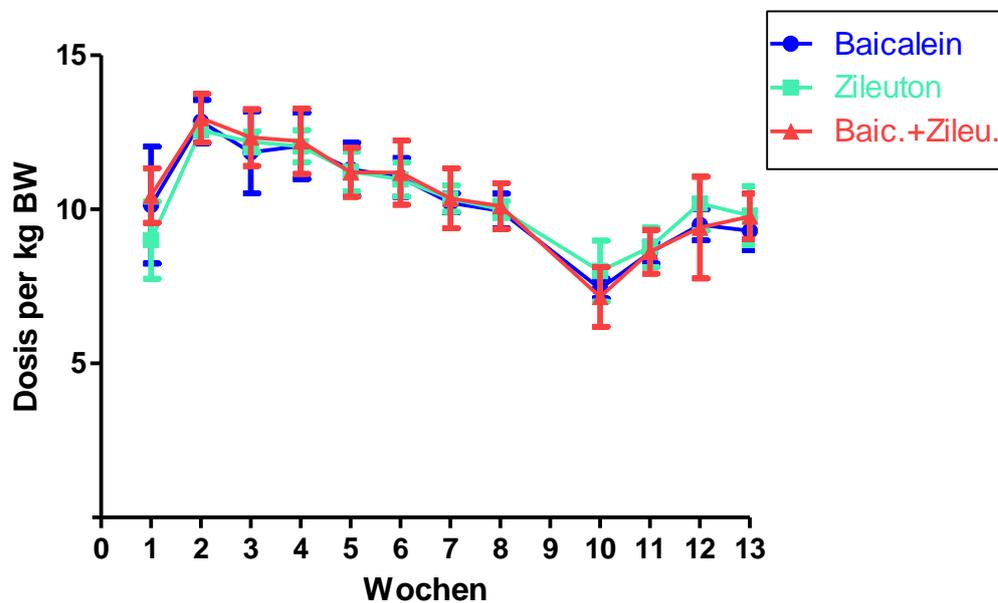
*a = Non-OVX vs. alle übrigen Gruppen; b = Non-OVX vs. Baicalein, Zileuton und Baic.+Zileu., *p < 0,05*



3.1.3 Analyse der Dosisaufnahmen

Die Versuchsgruppen Baicalein, Zileuton und Baic.+Zileu. nahmen nach der Ovariectomie die jeweiligen Medikamente mit dem Futter auf. Die errechnete Menge unterschied sich nicht signifikant voneinander unter den Gruppen. Im Schnitt erhielten so die Ratten der Baicalein-Gruppe 10,35 mg/kg KG Baicalein. Die Dosis der Zileuton-Gruppe lag bei 10,43 mg/kg KG und die Baicalein plus Zileuton nahmen etwa 10,48 mg/kg KG von beiden Substanzen auf. Nach der Osteotomie sank die aufgenommenen Dosis kurzzeitig zusammen mit der Futteraufnahme. Zum Versuchsende normalisierte sich die aufgenommene Dosis wieder (Abb.25).

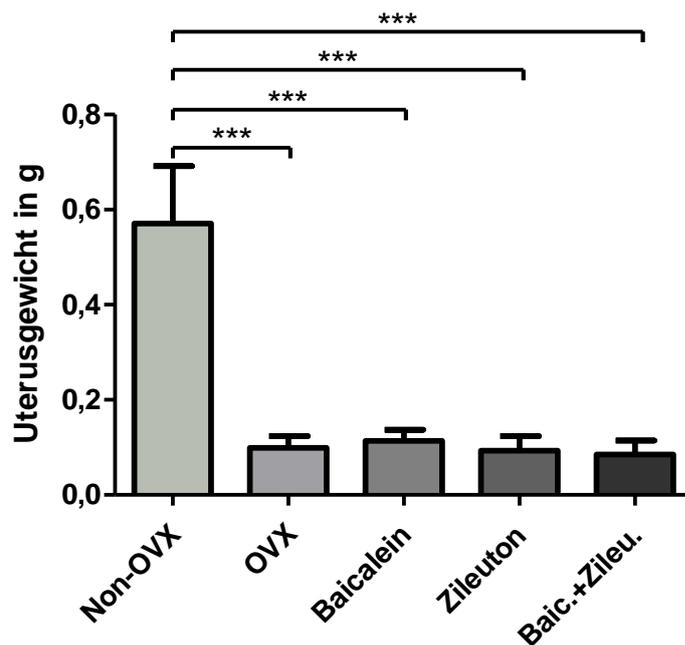
Abbildung 25: Aufgenommene Dosismenge pro Tier in mg pro Tag im Verlauf; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.1.4 Uterusgewichte

Das Wiegen der Uteri wurde auch direkt nach der Tötung durchgeführt. Hier sollte gezeigt werden, dass die Ovarien der Ratten der OVX, Baicalein Zileuton und Baic.+Zileu. während der Ovariectomie vollständig entfernt worden sind und die Uteri sich daraufhin zurückbildeten. Die Darstellung der Gewichte bestätigte dies (Abb.26). Somit war die Ovariectomie erfolgreich.

Abbildung 26: Uterusgewichte nach Tötung; *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)



Nur die Uteri der Non-OVX-Gruppe wiesen noch ein normales Gewicht von durchschnittlich 4,57 g auf, was dafür spricht, dass bei ihnen wie vorgesehen, keine Ovariectomie stattgefunden hatte. Die Non-OVX-Gruppe unterschied sich hinsichtlich der Uterusgewichte höchstsignifikant von den anderen Gruppen. Zwischen den Gewichten der anderen Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

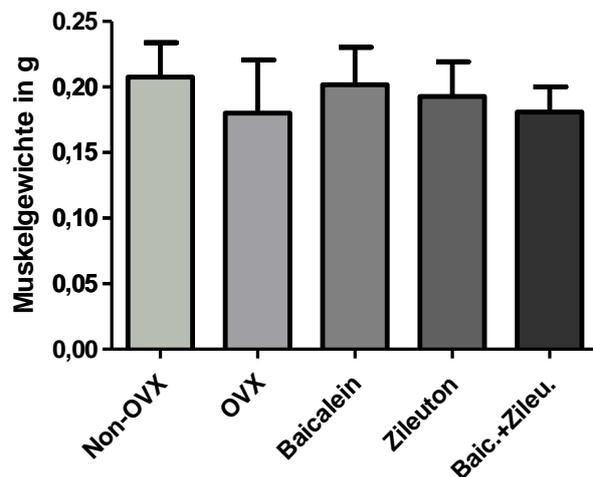
3.1.5 Muskelgewichte

Die Muskelgewichte vom M. soleus und M. gastrocnemius wurden unmittelbar nach der Dekapitation erfasst und notiert. Beide Muskeln konnten in toto entfernt werden. Die genaue, vollständige Entfernung war bei dem M. longissimus nicht möglich, sodass die Gewichtsmessung unterblieb. Dargestellt ist hier das Muskelgewicht der beiden Muskeln und den dazugehörigen Gruppen in Gramm.

3.1.5.1 Muskelgewichte M. soleus

Zwischen den Gewichten des Soleus der einzelnen Gruppen wurde keine signifikante Differenz festgestellt (Abb.27).

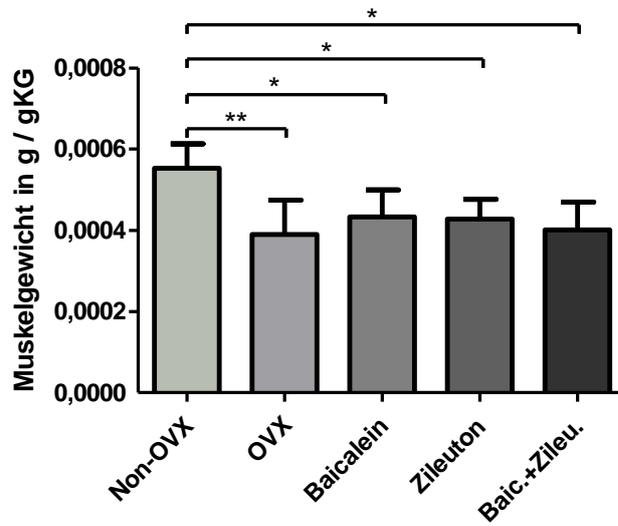
Abbildung 27: Muskelgewichte des M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.1.5.2 Muskelgewichte M. soleus in Relation zum Körpergewicht

In der statistischen Analyse des Muskelgewichts pro Gramm Körpergewicht zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der unbehandelten OVX-Gruppe zur Non-OVX. Die mit Zileuton, Baicalein und die Baic.+Zileu. Gruppe wiesen einen signifikanten Unterschied zur Non-OVX auf (Abb.28).

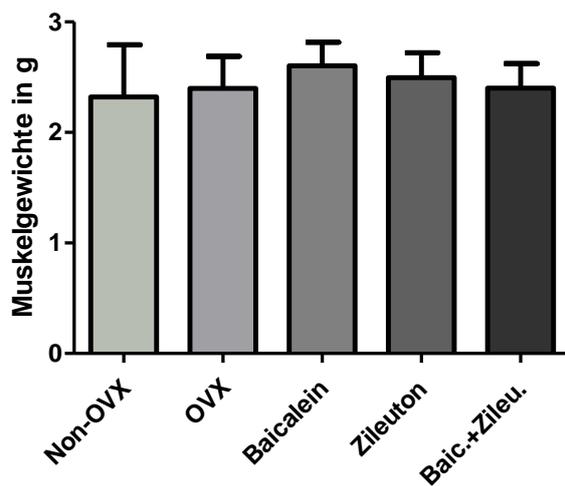
Abbildung 28: Muskelgewichte des *M. soleus* in Relation zum Körpergewicht; * signifikant ($p < 0,05$), ** hochsignifikant ($p < 0,01$)



3.1.5.3 Muskelgewichte *M. gastrocnemius*

Die statistische Analyse erbrachte keine signifikanten Variationen unter den Gewichten der fünf Gruppen des Gastrocnemius (Abb.29).

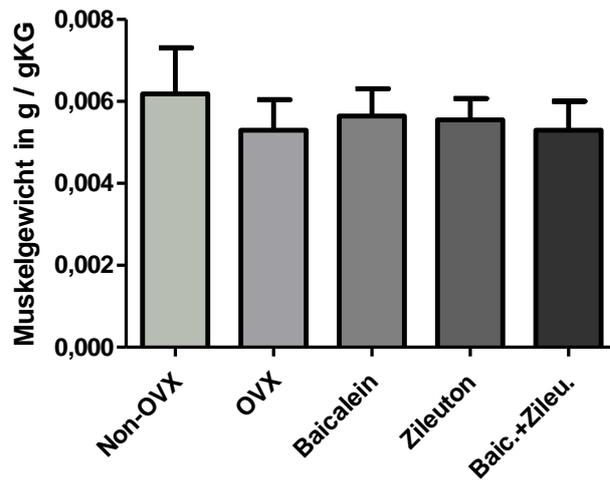
Abbildung 29: Muskelgewichte des *M. gastrocnemius*; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.1.5.4 Muskelgewichte *M. gastrocnemius* in Relation zum Körpergewicht

In der statistischen Analyse konnten keine Signifikanzen zwischen den Muskelgewichten/Körpergewicht der Gruppen festgestellt werden (Abb.30).

Abbildung 30: Muskelgewichte des *M. gastrocnemius* in Relation zum Körpergewicht, nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



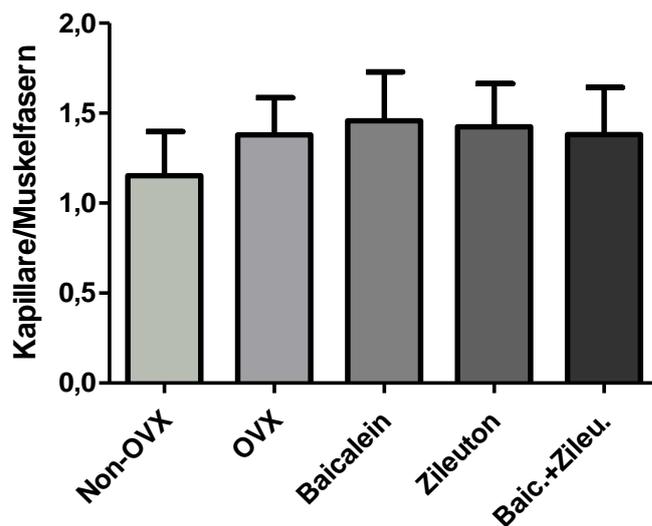
3.2 Verhältnis der Kapillaren zu Muskelfaseranzahl

Mit Hilfe der Amylase-Kapillarfärbung konnten die Kapillaren gut dargestellt werden. Die Auszählung der Kapillaren und Muskelfasern wurde in allen drei Muskeln durchgeführt und jeweils die Verhältnisse unter den Gruppen verglichen.

3.2.1 *M. longissimus*

Im *M. longissimus* lag die Kapillarisation pro Muskelfaser im Schnitt in der mit Baicalein behandelten Gruppe, bei 1,458/ μm . Nur wenig davon divergierte mit durchschnittlich 1,424/ μm die Zileuton Gruppe 3. Jedoch differierten alle Gruppen im 1-way Anova nicht signifikant (Abb.31).

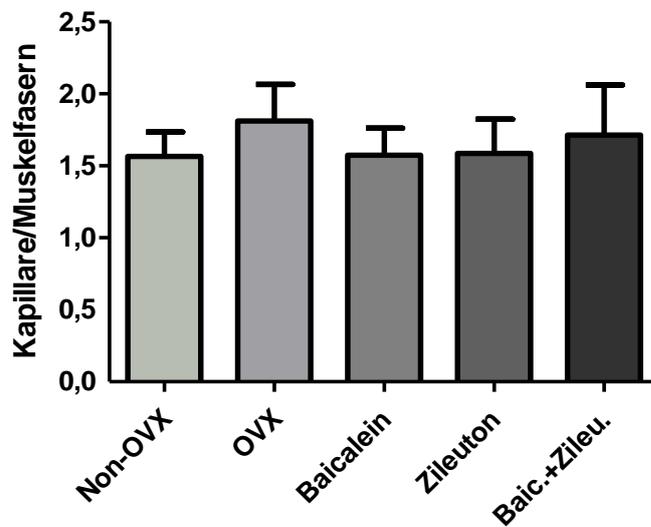
Abbildung 31: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim *M. longissimus*; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.2.2 M. soleus

Zwischen den Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 32). Mit einem Mittelwert von 1,566 hat die Gruppe 2 der ovariektomierten Tiere die höchste Kapillarisation. Insgesamt konnte aber festgestellt werden, dass sich auch beim M. soleus keine bedeutsame Veränderung in der Kapillarisation fand.

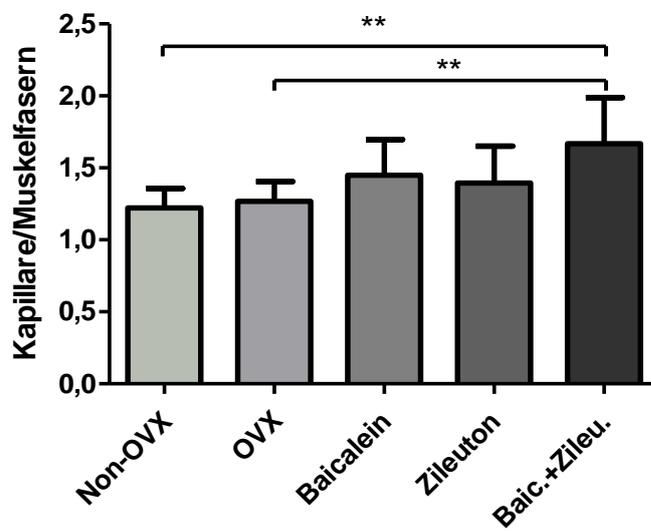
Abbildung 32: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.2.3 *M. gastrocnemius*

Im Durchschnitt war die Kapillarisation pro Muskelfaser in den behandelten Gruppen 3 - 4 höher als die der unbehandelten Gruppen. Die 1-way ANOVA war signifikant. Im Tukey's Multiple Comparison Test zeigte sich in der mit Baic.+Zileu. behandelten Gruppe ein hochsignifikant höheres Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern zu der Non-OVX und der OVX-Gruppe (Abb. 33).

Abbildung 33: Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern beim *M. gastrocnemius*; ** hochsignifikant ($p < 0,01$)



3.3 Auswertung der ATPase-Färbung

Mit Zuhilfenahme der ATPase-Färbung nach Horák (Horák 1983) und dem NIS-Elements AR-Programm wurden zum einen der durchschnittliche Muskelfaserdurchmesser und zum anderen die durchschnittliche Muskelfaserfläche der Fasertypen für die einzelnen Gruppen bestimmt. Diese Ergebnisse wurden dann jeweils auf das Körpergewicht und bei den Wadenmuskeln auch auf das Muskelgewicht bezogen, um einen besseren Vergleich darzustellen. Von den einzelnen Muskeln: M. longissimus, M. soleus und M. gastrocemiis wurden jeweils drei Schnittbilder verwendet.

3.3.1 M. longissimus

Beim M. longissimus fanden sich die Fasertypen I und II. Pro Schnittbild wurden 30 Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern auf einer Fläche von 0,5 mm² ausgewertet.

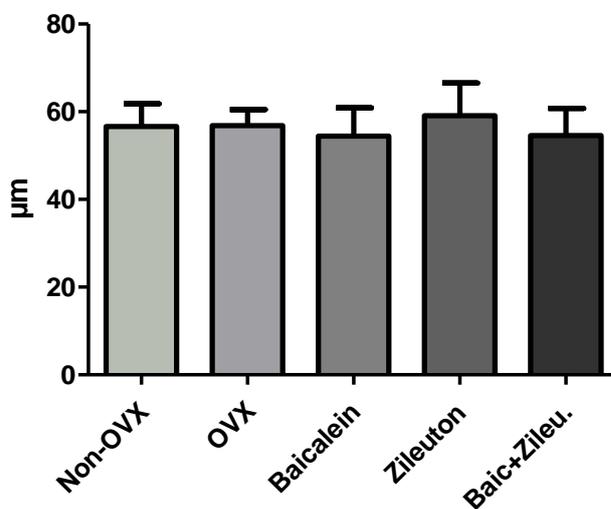
3.3.1.1 Muskelfaserdurchmesser

Der durchschnittliche Durchmesser der Muskelfasern des M. longissimus wurde aus den 3 Schnitten eines Muskels jeweils 60 Typ-I- und Typ-II-Muskelfasern eines Tieres bestimmt. Das bedeutet, dass pro Tier somit 180 Zellen ausgewertet wurden.

3.3.1.1.1 Typ-I-Muskelfasern

Nach Auswertung der statistischen Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Durchmesser der Typ-I-Muskelfasertypen unter den Gruppen (Abb.34).

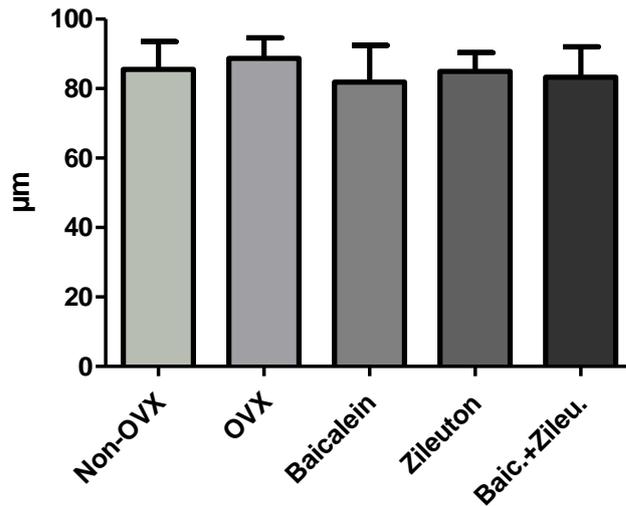
Abbildung 34: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des M. longissimus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.1.1.2 Typ-II-Muskelfasern

Zwischen den verschiedenen Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Durchmessers der Typ-II-Fasern feststellen (Abb.35).

Abbildung 35: Durchmesser der Typ-II-Muskelfasern des M. longissimus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



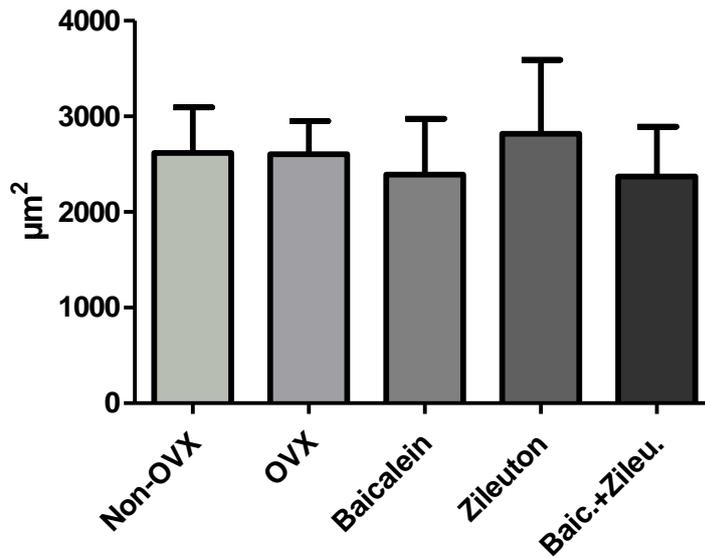
3.3.1.2 Muskelfaserfläche

Um die durchschnittlichen Flächen der Muskelfasertypen bestimmen zu können, wurden in den drei Schnitten eines Muskels jeweils 30 Typ-I- und 30 Typ-II-Muskelfasern umrandet, da sich die zwei verschiedenen Muskelfasertypen gut voneinander differenzieren ließen. Die Mittelwerte der Flächen wurden getrennt voneinander ausgewertet.

3.3.1.2.1 Typ-I-Muskelfasern

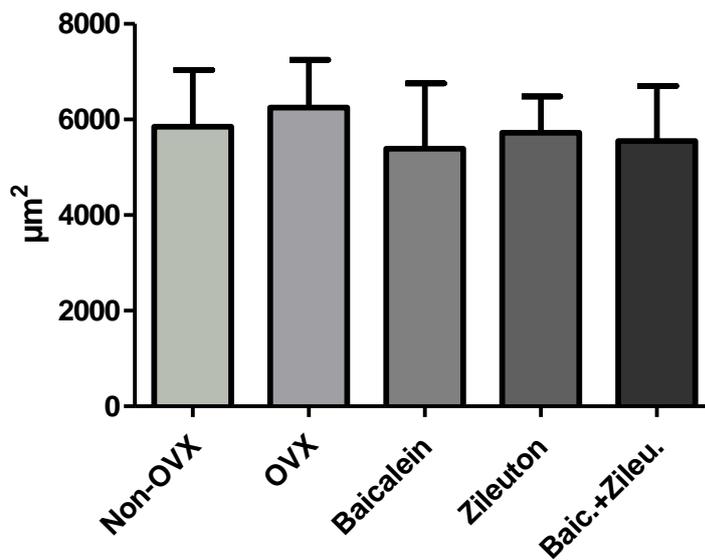
Zwischen den Flächen des Muskelfasertyps I ließen sich keine Signifikanzen in der statistischen Analyse erfassen. Mit $2818 \mu\text{m}^2$ zeigte sich bei der mit Zileuton behandelten Gruppe die durchschnittlich größte Fläche (Abb.36).

Abbildung 36: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des M. longissimus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.1.2.2 Typ-II-Muskelfasern

Nach der statistischen Auswertung der Flächen der Typ-II-Muskelfasertypen konnten keine signifikanten Abweichungen unter den Gruppen erkannt werden. Die ovariektomierte Gruppe 2 besitzt mit $6248 \mu\text{m}^2$ die durchschnittlich größte Fläche (Abb.37).

Abbildung 37: Fläche der Typ-II-Muskelfasern des M. longissimus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test

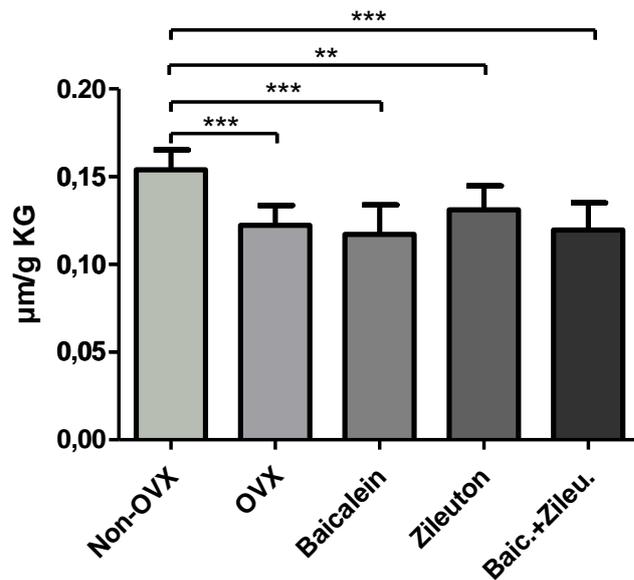
3.3.1.3 Muskelfaserdurchmesser / -fläche bezogen auf das Körpergewicht

Der M. longissimus wurde postoperativ nicht gewogen. Somit wurde die Auswertung der gemessenen Muskelfaserdurchmesser bzw. -fläche nur in Relation zum Körpergewicht der Ratten gesetzt.

3.3.1.3.1 Typ-I-Muskelfasern

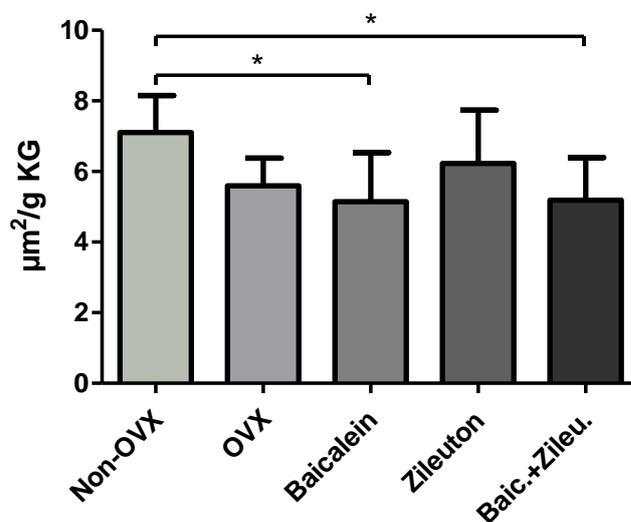
Die Relation der Durchmesser/g Körpergewicht der Typ-I-Fasern der Gruppen erbrachte signifikant höhere Ergebnisse der Non-OVX Gruppe zu allen anderen. Sie war höchstsignifikant verschieden von der OVX, der Baicalein sowie der Baic.+Zileu.-Gruppe, sowie hochsignifikant zur Zileuton-Gruppe. Zwischen den anderen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb.38).

Abbildung 38: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des M. longissimus zum Körpergewicht; ** hochsignifikant ($p < 0,01$); *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)



Bei Betrachtung der Fläche/g Körpergewicht fiel auf, dass die Non-OVX die durchschnittlich größte Fläche besaß. Sie betrug $7,101 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$ und wich somit signifikant von der Baicalein und Baic.+Zileu.-Gruppe ab. Zwischen den anderen bestanden keine signifikanten Unterschiede (Abb.39).

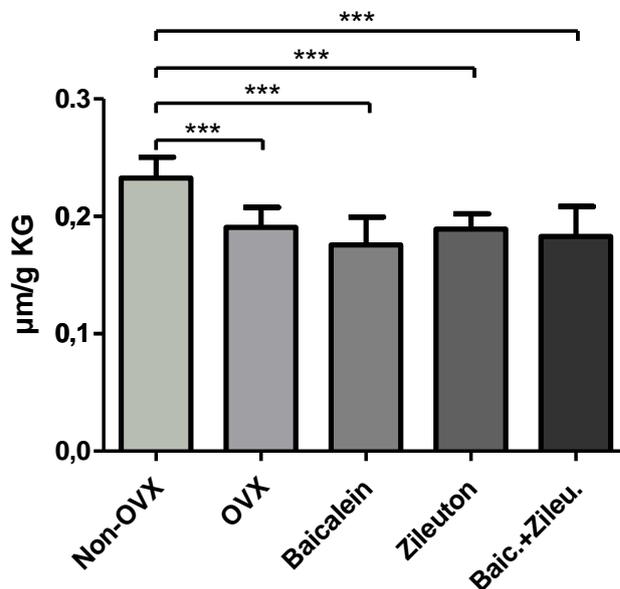
Abbildung 39: Verhältnis von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des M. longissimus zum Körpergewicht; * signifikant ($p < 0,05$)



3.3.1.3.2 Typ-II-Muskelfasern

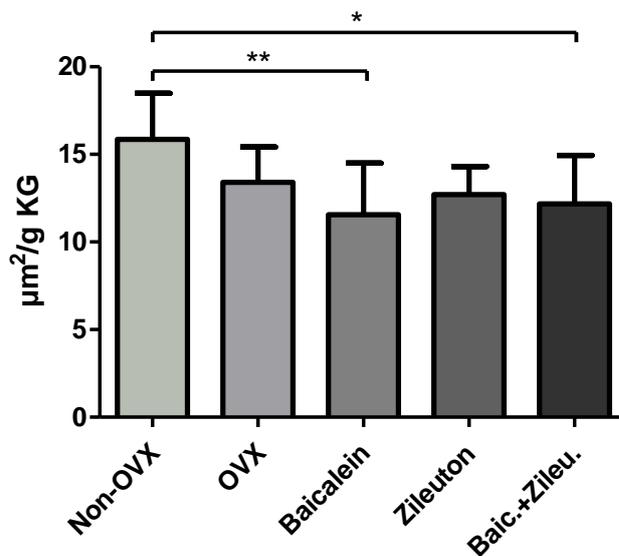
Bei den Typ-II-Fasern des Longissimus ergaben sich signifikante Abweichungen zwischen den Durchmessern/g Körpergewicht in den Gruppen. Die Non-OVX-Gruppe wies einen höchstsignifikant höheren Durchmesser/g Körpergewicht auf als alle anderen Gruppen. Die größte Abweichung der mittleren Durchmesser/g Körpergewicht bestand zur Baicalein-behandelten Gruppe 3 und lag bei $8,808 \mu\text{m/g KG}$. Gefolgt von der Baicalein plus Zileuton behandelten Gruppe 5 mit $7,145 \mu\text{m/g KG}$ (Abb.40).

Abbildung 40: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser des M. longissimus zum Körpergewicht; *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)



Die statistische Analyse ergab eine signifikant größere Fläche /g Körpergewicht der Non-OVX-Gruppe in Bezug zu den mit Baicalein und Baic.+Zileu. behandelten Gruppen. Mit einer mittleren Fläche von $15,86 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$ wich sie um $4,303 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$ von der mittleren Fläche/KG der Baicalein-Gruppe und $3,689 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$ von der mittleren Fläche/KG der Baic.+Zileu.-Gruppe ab (Abb.41).

Abbildung 41: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche des M. longissimus zum Körpergewicht; * signifikant ($p < 0,05$); ** hochsignifikant ($p < 0,01$)

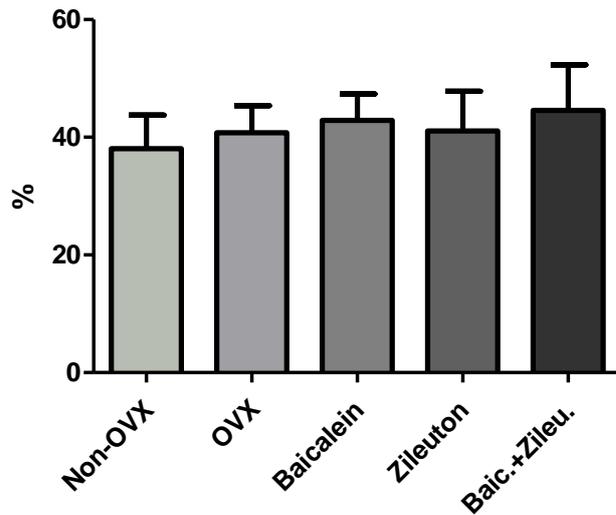


3.3.1.4 Verhältnis der Muskelfasertypen im Longissimus

In dem M. longissimus lagen die verschiedenen Muskelfasertypen in einer relativ regelmäßigen Verteilung vor. Es war daher methodisch wertvoll, das Verhältnis der Typen untereinander zu bestimmen. Letztendlich wurde daraus das Verhältnis zwischen der Anzahl beider Fasertypen zur Gesamtfaserzahl berechnet (Kling 2016).

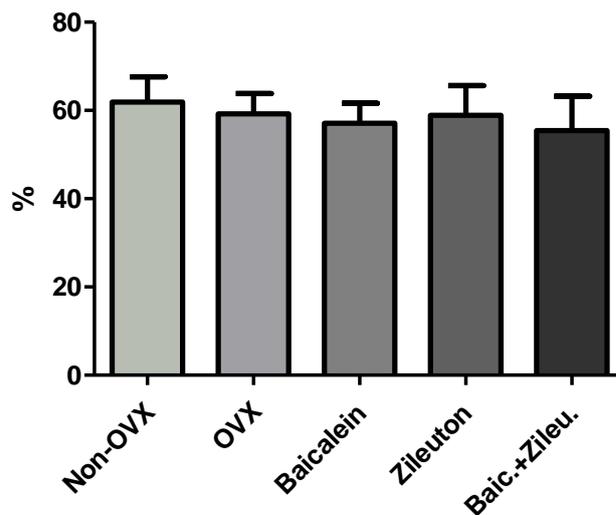
Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede an dem Anteil der Typ-I-Muskelfasern zu der Gesamtfaserzahl festgestellt werden (Abb.42). Mit 44,56 % wies die mit Baic.+Zileu. behandelte Gruppe den größten Anteil an Typ-I-Fasern auf.

Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Muskelfasern-Typ-I zur Summe aller Fasern des M. longissimus (in Prozent zur Gesamtfaserzahl auf 1 mm²); nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



Genau wie die Typ-I-Fasern lagen die Typ-II-Fasern in einem sich nicht-signifikant voneinander unterscheidendem Anteil vor. In allen Gruppen war der Anteil an Typ-II-Fasern insgesamt aber höher als der Typ-I-Fasern (Abb.43).

Abbildung 43: Prozentualer Anteil der Muskelfasern-Typ-II zur Summe aller Fasern des M. longissimus (in Prozent zur Gesamtfaserzahl auf 1 mm²); nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.2 M. soleus

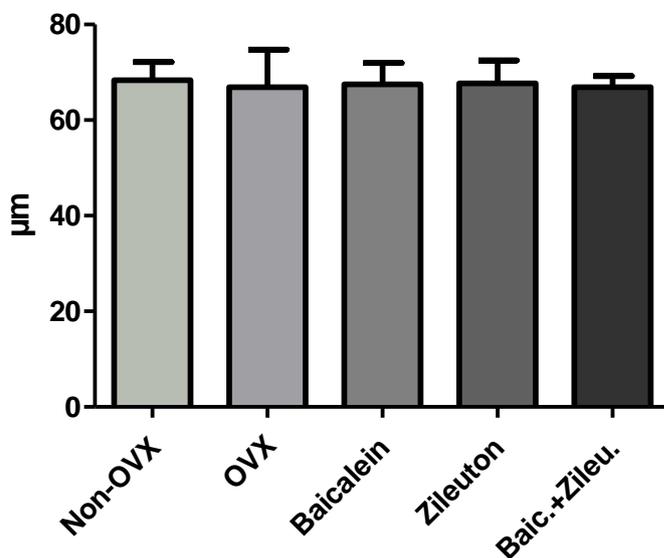
3.3.2.1 Muskelfaserdurchmesser

In die Auswertung des M. soleus zur Berechnung der Durchmesser kamen pro Tier jeweils 90 Typ-I-Muskelfasern, aus denen schließlich der Mittelwert gebildet wurde.

3.3.2.1.1 Typ-I-Muskelfasern

Die statistische Analyse der Muskelfaserdurchmesser ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.44).

Abbildung 44: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test

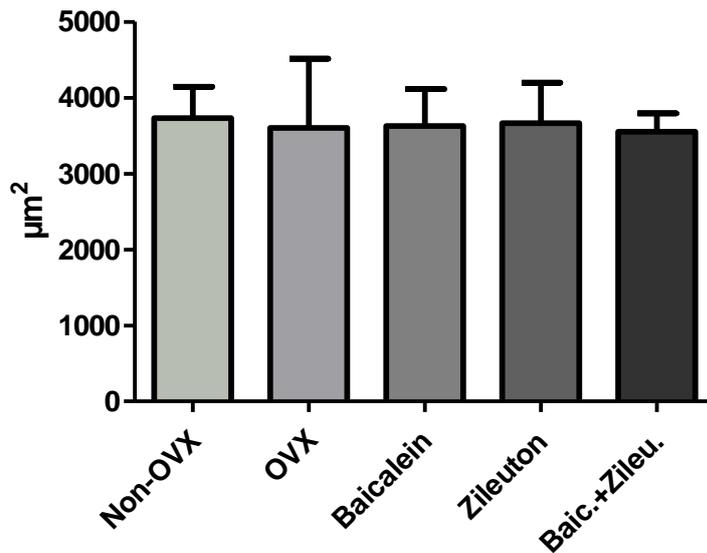


3.3.2.2 Muskelfaserfläche

Die Auswertung der Flächen des M. soleus erfolgte wie beim Durchmesser nur an Typ-I-Muskelfasertypen und 90 Fasern pro Muskel.

3.3.2.2.1 Typ-I-Muskelfasern

Der statistische Vergleich der Gruppen ergab, dass sich die Flächen des Muskelfasertyps I nicht-signifikant voneinander unterscheiden (Abb.45).

Abbildung 45: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test

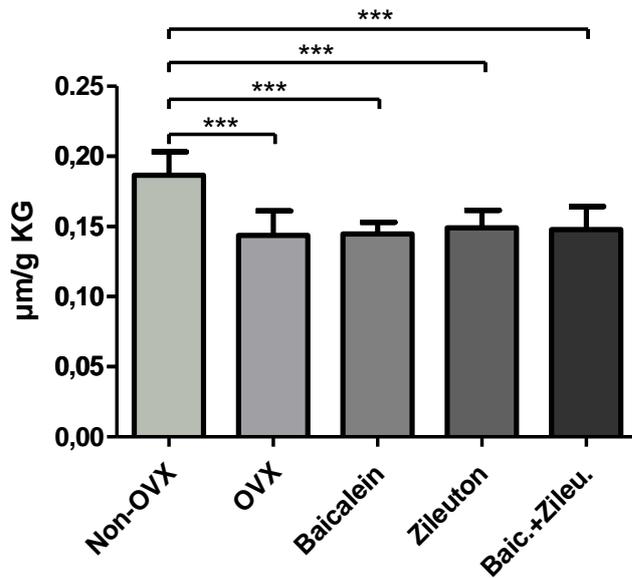
3.3.2.3 Muskelfaserdurchmesser /-fläche bezogen auf das Körpergewicht

Im nächsten Schritt wurden die Muskelfaserdurchmesser bzw. -flächen auf das Körpergewicht der einzelnen Tiere bezogen. Im Anschluss wurden dann zusätzlich die Muskelfaserdurchmesser bzw. -flächen pro Muskelgewicht errechnet.

3.3.2.3.1 Typ-I-Muskelfasern

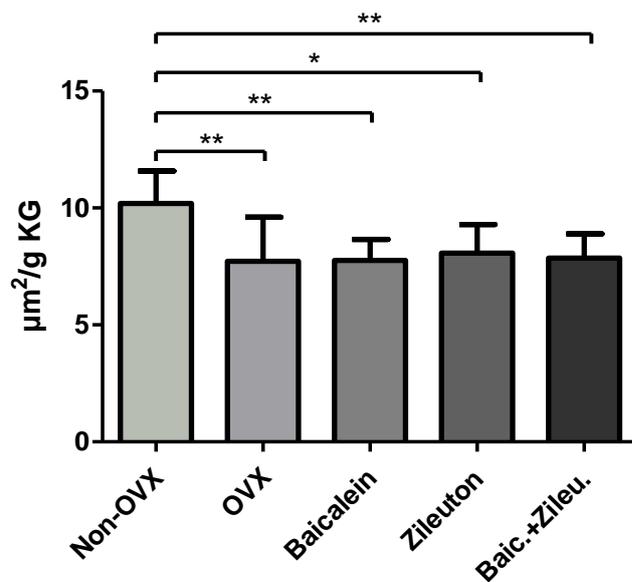
Die Auswertung der Durchmesser der Typ-I-Fasern pro Gramm Körpergewicht der Ratten ergab, dass dieser bei der Non-OVX Gruppe statistisch höchstsignifikant größer war, als bei den anderen Gruppen. Er lag im Mittel bei $0,1865 \mu\text{m/g KG}$ (Abb.46).

Abbildung 46: Relation von dem Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des M. soleus zum Körpergewicht; *** höchstsignifikant ($p < 0,001$)



Bezüglich der Flächen der Typ-I-Fasern pro Gramm Körpergewicht stellte sich heraus, dass die Non-OVX-Gruppe signifikant größere Flächen besaß als die anderen vier Gruppen (Abb.47).

Abbildung 47: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des M. soleus zum Körpergewicht; * signifikant ($p < 0,05$); ** hochsignifikant ($p < 0,01$)

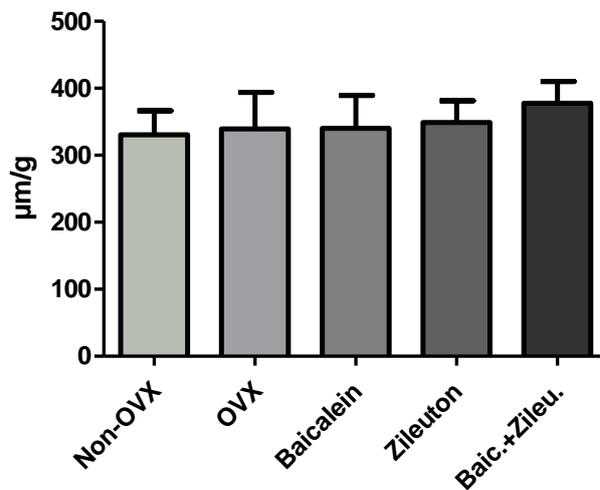


3.3.2.4 Muskelfaserdurchmesser /-fläche bezogen auf das Muskelgewicht

Bei den Wadenmuskeln M. soleus und M. gastrocnemius wurden zusätzlich die Gewichte erfasst. Im Weiteren wurden die Durchmesser und Flächen der Muskelfasern auf das jeweilige Muskelgewicht des M. soleus bezogen.

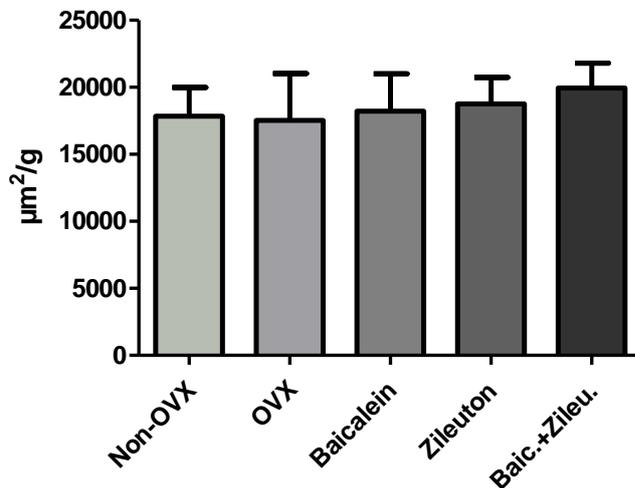
Die Relation des Durchmessers pro g Muskelgewicht konnte keine statistischen Signifikanzen erkennen lassen (Abb.48).

Abbildung 48: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser zum Muskelgewicht des M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



Die statistische Analyse der Flächen in Bezug auf die Muskelgewichte des M. soleus zeigte auch keine statistisch signifikant voneinander abweichenden Ergebnisse (Abb.49).

Abbildung 49: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche zum Muskelgewicht des M. soleus; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.3 M. gastrocnemius

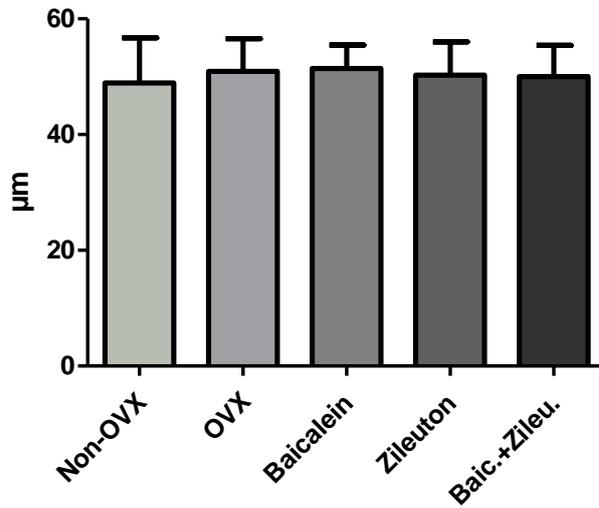
3.3.3.1 Muskelfaserdurchmesser

Beim M. gastrocnemius wurden die zwei verschiedenen Muskelfasertypen Typ-I und Typ-II für die Auswertung betrachtet. Folglich wurden der Durchmesser und die Fläche jeweils aus 30 Typ-I- und 30 Typ-II-Muskelfasern pro Schnitt berechnet. Pro Muskel wurden 90 Durchmesser für jeden Fasertypen mit in die Auswertung genommen.

3.3.3.1.1 Typ-I-Muskelfasern

Beim Vergleich der Muskelfaserdurchmesser des Fasertyps I konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden (Abb.50).

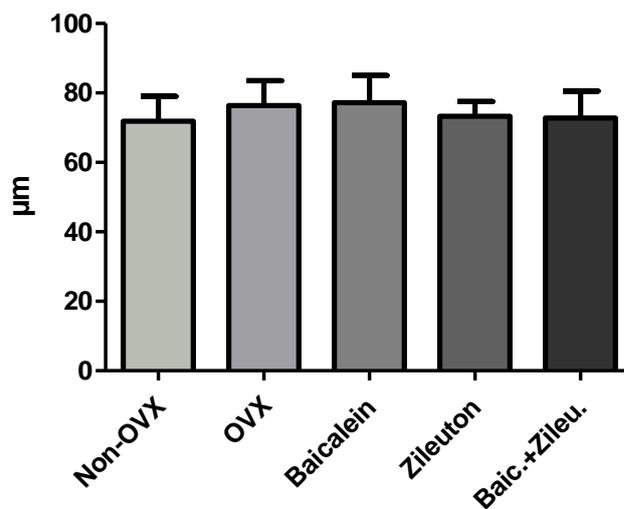
Abbildung 50: Durchmesser der Typ-I-Muskelfasern des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$
Tukey-test



3.3.3.1.2 Typ-II-Muskelfasern

Bei dem Muskelfasertyp II bestanden keine signifikanten Differenzen unter den Gruppen bezüglich der mittleren Durchmesser (Abb.51).

Abbildung 51: Durchmesser der Typ-II-Muskelfasern des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$
Tukey-test

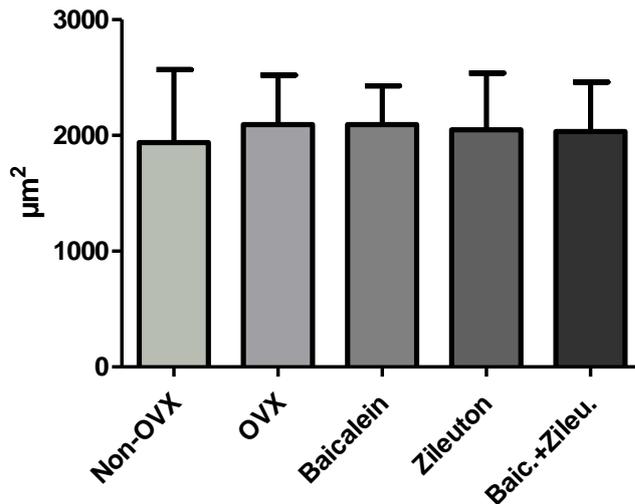


3.3.3.2 Muskelfaserfläche

3.3.3.2.1 Typ-I-Muskelfasern

Zwischen den Gruppen ließen sich auch im Vergleich der Flächen des Muskelfasertyps I keine signifikanten Divergenzen erfassen (Abb.52).

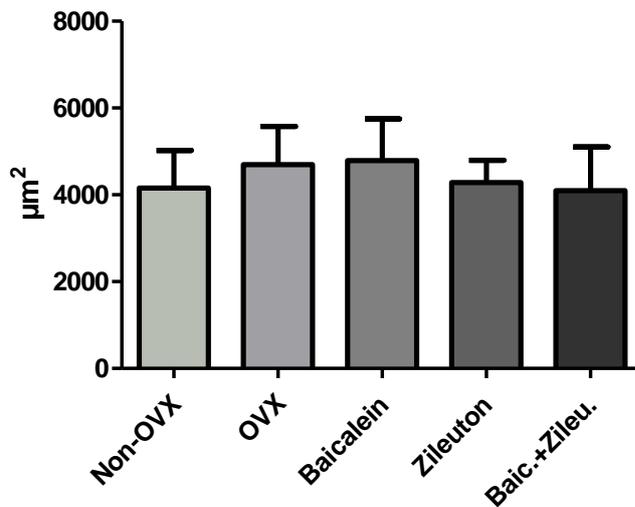
Abbildung 52: Fläche der Typ-I-Muskelfasern des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.3.2.2 Typ-II-Muskelfasern

Bei der statistischen Auswertung der Flächen der Typ-II-Fasern konnte keine signifikante Abweichung festgestellt werden. Mit 4790 µm² durchschnittlicher Muskelfaserfläche lag die Baicalein-Gruppe leicht über den anderen Gruppen (Abb.53).

Abbildung 53: Fläche der Typ-II-Muskelfasern des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



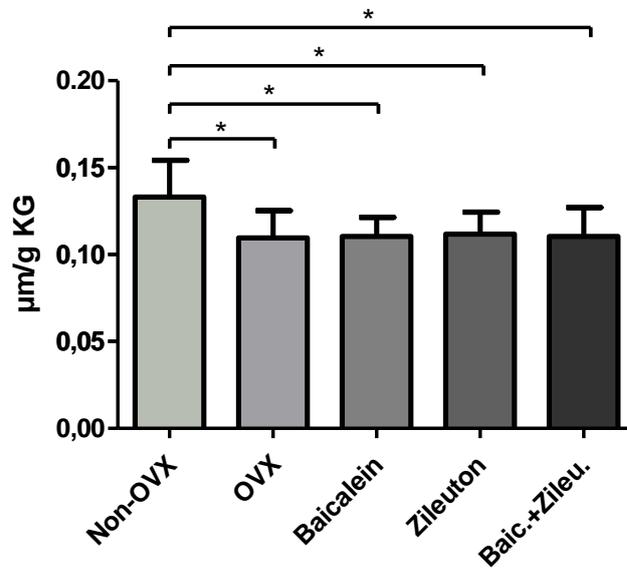
3.3.3.3 Muskelfaserdurchmesser / -fläche bezogen auf das Körpergewicht

Im nächsten Schritt wurden beim M. gastrocnemius die errechneten Muskelfaserdurchmesser bzw. -flächen jeweils mit dem Körper- bzw. Muskelgewicht in Relation gesetzt. Auch wurde hier wieder zwischen den zwei verschiedenen Muskelfasertypen differenziert.

3.3.3.3.1 Typ-I-Muskelfasern

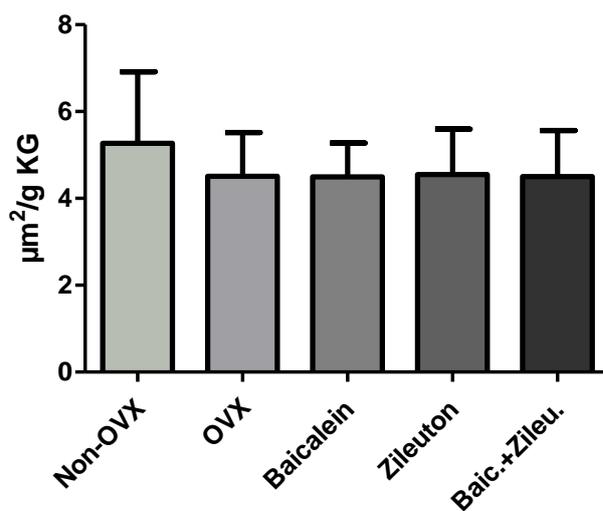
Statistisch signifikant lag bei der Analyse des Durchmessers bezogen auf das Körpergewicht die Non-OVX-Gruppe höher gegenüber allen anderen Gruppen. Der mittlere Durchmesser lag bei dieser Gruppe bei $0,1332 \mu\text{m/gKG}$. Am niedrigsten war dieser bei der OVX-Gruppe mit $0,1096 \mu\text{m/gKG}$ (Abb.54).

Abbildung 54: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser des M. gastrocnemius zum Körpergewicht;
* signifikant ($p < 0,05$)



Bei der Flächenanalyse pro g/Körpergewicht zeigte sich kein signifikant höherer Mittelwert zwischen den einzelnen Gruppen. Die Typ-I-Fasern von der Non-OVX besaßen mit $5,271 \mu\text{m}^2/\text{g KG}$ die größte Fläche (Abb.55).

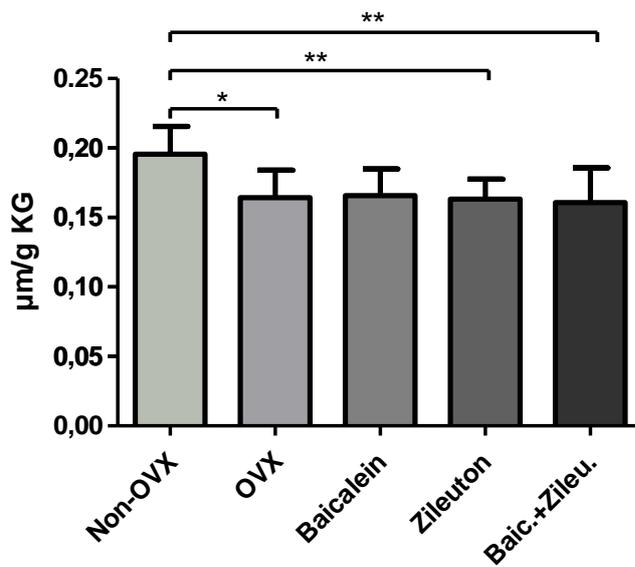
Abbildung 55: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche des M. gastrocnemius zum Körpergewicht;
nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.3.3.2 Typ-II-Muskelfasern

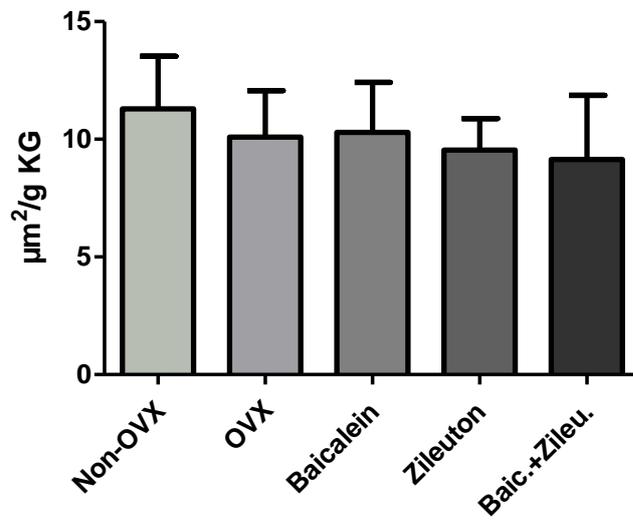
Bei dem Vergleich des Durchmessers bezogen auf das Körpergewicht zeigte sich ein signifikant höherer Durchmesser der Non-OVX Gruppe gegenüber der OVX-Gruppe. Des Weiteren lag dieser hochsignifikant über den der mit Zileuton und Baic.+Zileu. behandelten Gruppen. Zwischen der Non-OVX und Baicalein-Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied (Abb.56).

Abbildung 56: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser des M. gastrocnemius zum Körpergewicht; * signifikant ($p < 0,05$); **hochsignifikant ($p < 0,01$)



Bei der Analyse der Fläche pro g Körpergewicht konnte keine statistisch signifikante Differenz festgestellt werden (Abb.57). Sowohl die Non-OVX gefolgt von der Baicalein-Gruppe besaßen wie schon beim Durchmesser/g Körpergewicht die höchsten Mittelwerte (Abb.56) (Abb.57).

Abbildung 57: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche des M. gastrocnemius zum Körpergewicht; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



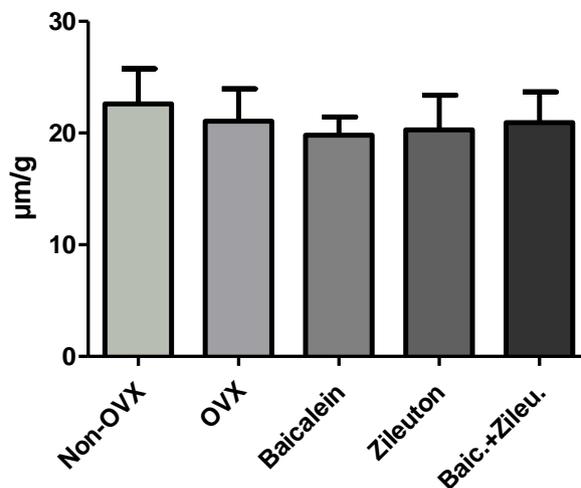
3.3.3.4 Muskelfaserdurchmesser /-fläche bezogen auf das Muskelgewicht

Die Mittelwerte der Durchmesser und der Flächen vom M. gastrocnemius wurden nun auf das jeweilige Muskelgewicht bezogen. Die zwei Muskelfasertypen, Typ-I und Typ-II, wurden getrennt voneinander betrachtet und ausgewertet.

3.3.3.4.1 Typ-I-Muskelfasern

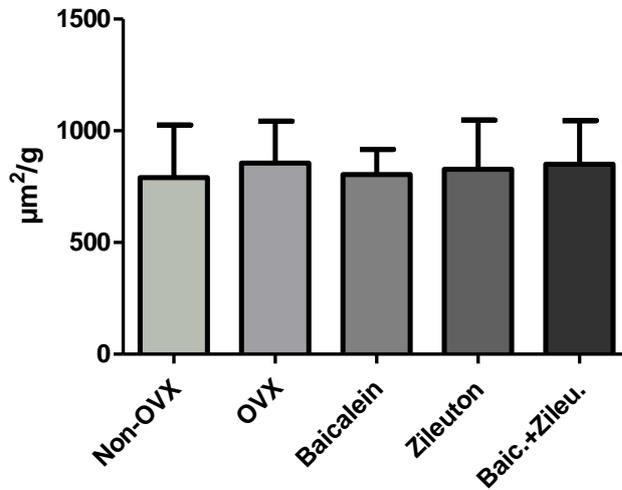
Zwischen den Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst werden (Abb.58).

Abbildung 58: Relation vom Muskelfaser-Typ-I-Durchmesser zum Muskelgewicht des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



Die statistische Analyse der Fläche bezogen auf das Muskelgewicht ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.59).

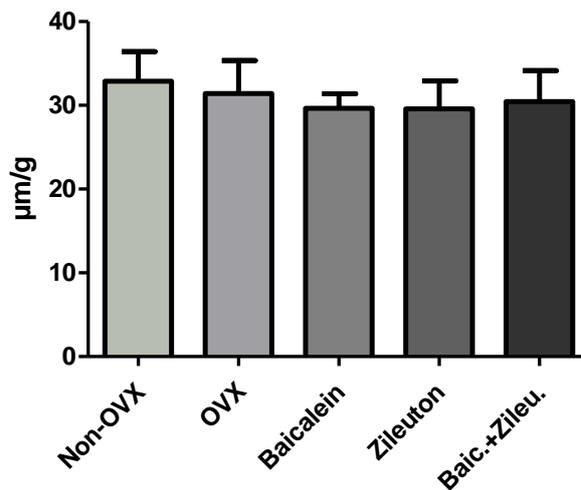
Abbildung 59: Relation von der Muskelfaser-Typ-I-Fläche zum Muskelgewicht des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.3.3.4.2 Typ-II-Muskelfasern

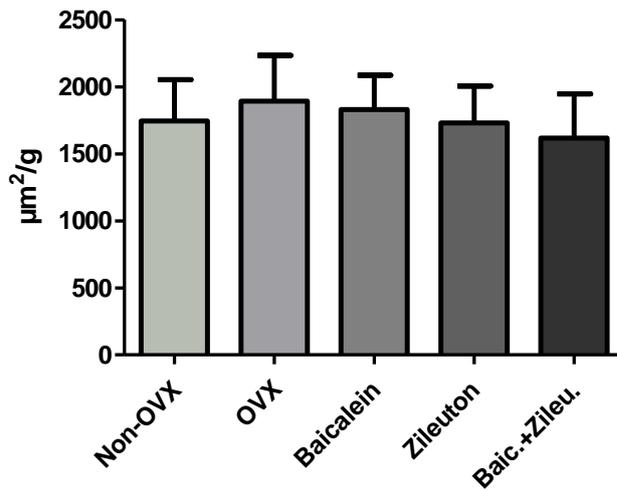
Die Durchmesser der Typ-II-Fasern bezogen auf das Muskelgewicht des M. gastrocnemius wichen statistisch nicht signifikant voneinander ab (Abb.60).

Abbildung 60: Relation vom Muskelfaser-Typ-II-Durchmesser zum Muskelgewicht des M. gastrocnemius; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



Analytisch betrachtet differierten die Flächen der Typ-II-Fasern pro g Muskelgewicht nicht signifikant voneinander. Die OVX-Gruppe lag mit einer mittleren Fläche von $1893 \mu\text{m}^2/\text{g}$ MG nur leicht über den anderen Flächengrößen der anderen Gruppen (Abb.61).

Abbildung 61: Relation von der Muskelfaser-Typ-II-Fläche zum Muskelgewicht des *M. gastrocnemius*; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



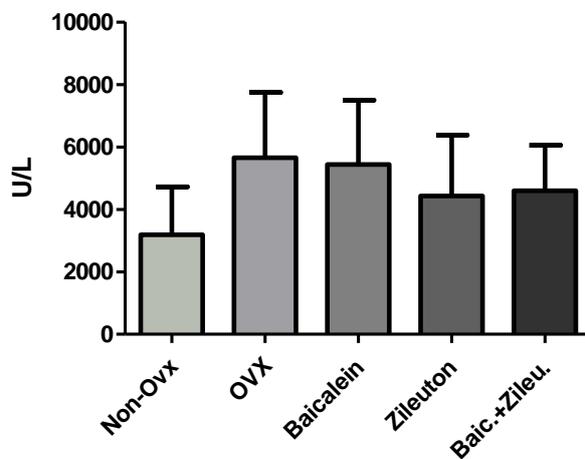
3.4 Die Analyse der Serumparameter

3.4.1.1 Die Kreatinkinase im Serum

Die Aktivität des für den Muskel wichtigen Enzyms Kreatinkinase wurde bestimmt.

Die statistische Analyse der Kreatinkinaseaktivität im Serum der einzelnen Gruppen ergab keine signifikanten Differenzen. Mit 5653 U/L lag die OVX-Gruppe leicht höher als die der anderen Gruppen (Abb. 62).

Abbildung 62: Kreatinkinase im Serum; nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test



3.5 Tabelle zur Veranschaulichung der Ergebnisse

Zur besseren Darstellung der statistisch signifikanten Ergebnisse der Untersuchungen wurden diese in den folgenden Tabellen zusammengefasst (Tab. 6,7,8). Dabei wurden die verschiedenen ermittelten Parameter der Untersuchungen zu ihren jeweiligen Versuchsgruppen dargestellt.

< kennzeichnet, dass diese Gruppe signifikant zu (Nummer-Gruppe) erniedrigt ist

> kennzeichnet, dass diese Gruppe signifikant zu (Nummer-Gruppe) erhöht ist

die Zahl hinter < oder > stellt die jeweilige Gruppe dar, zu der die Gruppe signifikant kleiner oder größer

↔ kennzeichnet, dass kein signifikanter Unterschied zu anderen Gruppen besteht

↑ kennzeichnet den signifikant größten Wert von allen Gruppen

↓ kennzeichnet den signifikant niedrigsten Wert von allen Gruppen

Tabelle 6: Übersicht zu den Ergebnissen für die Kapillarisation im M. gastrocnemius

Parameter	Non-OVX (1)	OVX (2)	Baicalein (3)	Zileuton (4)	Baic.+ Zileu. (5)
M. gastrocnemius	↔	↔	↔	↔	>1,2

Tabelle 7: Übersicht zu den Ergebnissen der relativen Muskelfaserdurchmesser von den verschiedenen Muskeln

Parameter	Non-OVX (1)	OVX (2)	Baicalein (3)	Zileuton (4)	Baic.+ Zileu. (5)
Durchmesser Typ-I M. longissimus /g KG	↑	↔	↔	↔	↔
Durchmesser Typ-II M. longissimus /g KG	↑	↔	↔	↔	↔
Durchmesser Typ-I M. soleus /g KG	↑	↔	↔	↔	↔
Durchmesser Typ-I M. gastrocnemius /g KG	↑	↔	↔	↔	↔
Durchmesser Typ-II M. gastrocnemius /g KG	>2,4,5	↔	↔	↔	↔

Tabelle 8: Übersicht zu den Ergebnissen der relativen Muskelfaserfläche der verschiedenen Muskeln

Parameter	Non-OVX (1)	OVX (2)	Baicalein (3)	Zileuton (4)	Baic.+ Zileu. (5)
Fläche Typ-I M. longissimus /g KG	>3,5	↔	↔	↔	↔
Fläche Typ-II M. longissimus /g KG	>3,5	↔	↔	↔	↔
Fläche Typ-I M. soleus /g KG	↑	↔	↔	↔	↔

4 Diskussion

In dieser Studie sollte untersucht werden, wie sich die postmenopausale Skelettmuskelstruktur durch eine kombinierte und einzelne Behandlung mit den selektiven Lipoxygenasehemmern Baicalein und Zileuton verändert. Die Zielsetzung lag in der Eruiierung neuer Therapieoptionen, um einen postmenopausalen Rückgang der Muskulatur bei gleichzeitiger Osteoporose zu verhindern.

Lipoxygenaseinhibitoren unterbinden durch die Hemmung der Enzyme Lipoxygenasen, die Bildung von Leukotrienen. Bei Entzündungs- und Allergievorgängen sind Leukotriene wichtige Mediatoren (Heinrich und Müller 2014). In verschiedenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Leukotriene und der Sarkopenie sowie der Osteoporose festgestellt werden (Pergola und Werz 2010). Daher bewertet man die Lipoxygenaseinhibitoren als einen möglichen Angriffspunkt zur Therapie dieser beiden altersbedingten Erkrankungen.

4.1 Die Sprague-Dawley-Ratte als Tiermodell für die Muskuloskelettaleforschung

Der Effekt der Lipoxygenaseinhibitoren Baicalein und Zileuton wurde an dem etablierten Modell der ovariektomierten Ratte evaluiert. Es handelte sich um weibliche Sprague Dawley Ratten, die im Alter von 12 Wochen ovariektomiert (OVX) wurden. Auf Grund verschiedener Aspekte ist es für die Osteoporoseforschung sinnvoll die Ratte als Tiermodell zu nutzen. Sie hat sich hier deutlich gegenüber anderen Tieren, wie Hunden, Affen oder anderen Nagetieren durchgesetzt. Was vor allem an der gründlichen Erforschung des Rattenskeletts und der guten Kenntnis über den Organismus der Ratte liegt (Lelovas et al. 2008).

Durch die Entfernung der Ovarien erzeugt man in der Ratte eine ähnliche Veränderung des Hormonhaushalts, wie er bei einer Frau vorzufinden ist, die sich in der Postmenopause befindet. Bei beiden kommt es durch die hormonellen Änderungen zu einem Knochenverlust, der besonders durch einen erhöhten Knochenumsatz gekennzeichnet ist. Die Knochenresorption übersteigt die Knochenformation zunächst stark. Mit der Zeit wird dies dann wieder zunehmend weniger. Insgesamt findet dabei der größere Verlust in der Spongiosa als in der Kortikalis statt (Kalu 1991; Maltais et al. 2009). Des Weiteren weisen beide, sowohl Frauen als auch ovariektomierte Ratten, eine verminderte intestinale Calciumaufnahme auf. Es konnte auch eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der Wirkung von Osteoporosetherapien mit verschiedenen Mitteln festgestellt werden. Zu diesen Mitteln zählen Tamoxifen, Östrogene, Bisphosphonate oder Calcitonin. Zudem erbrachte auch muskuläres Training ähnliche positive Resultate. Aus diesen genannten Gründen wurde die ovariektomierte Ratte zu einem etablierten Modell in der Osteoporoseforschung (Kalu 1991).

Auch für die Forschung an der Muskulatur hat sich die Ratte als ein geeignetes Tiermodell herauskristallisiert. Der Metabolismus der Rattenmuskulatur, sowie das Reagieren auf Training und das Wirken von Hormonen auf Muskelzellen sind vergleichbar mit denen menschlicher Muskeln (Barlet et al. 1994). Ebenfalls ist die Muskulatur der Ratte als Modell nach Muskelverletzungen geeignet. Wie beim Menschen, so kommt es in ähnlicher Weise bei Ratten, beispielsweise nach einer Spinalnervenverletzung, zur Atrophie der zugehörigen Muskulatur (Gregory et al. 2003).

Führt man nun durch die Ovariectomie eine künstliche Modulation des hormonellen Haushalts der Ratten herbei, löst dies wiederum in der Ratte gleichartige Veränderungen aus, die bei einer postmenopausalen Frau zu finden sind. Bei Frauen mit einer beidseitigen Ovariectomie beobachtet man ähnliche Effekte auf die Muskel- und Knochenmasse. Besonders der Östrogenverlust führt dann innerhalb kurzer Zeit zu einem signifikanten Knochenmassenverlust (Birkhäuser 1995). Das Körper- und Muskelgewicht der Ratten steigt, die Kraft hingegen nimmt ab. Folglich lässt sich zeigen, dass dieser künstlich geschaffene Zustand der Ratten vergleichbar ist mit dem Metabolismus einer Frau in der Postmenopause (Tagliaferri et al. 2015).

Da die Ratte aus den aufgeführten Gründen ein geeignetes Modell für die muskuloskelettale Forschung darstellt, wurde sie auch in dieser Studie als Versuchstier gewählt. Durch das Ovariectomiemodell der Ratte können Rückschlüsse auf die Veränderung, sowohl im Knochen, als auch im Muskel, durch die Behandlung mit Baicalein, Zileuton oder einer Kombinationstherapie aus beiden, gezogen werden.

Der Erfolg der Ovariectomie konnte mit Hilfe der Uterusgewichte am Ende der Untersuchung festgestellt werden. Die Entnahme der Ovarien führte zu einer signifikanten Gewichtsabnahme der Uteri, was den Erfolg widerspiegelt. Die Therapien mit den Inhibitoren Baicalein und Zileuton, die direkt nach der Ovariectomie begonnen wurde, beeinflussten die Uterusgewichte nicht.

4.2 Analyse der Körper- und Muskelgewichte

Zu Beginn des Versuches besaßen die gleichaltrigen jungen Ratten alle in etwa das gleiche Körpergewicht. Zwischen ihnen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Das Gewicht stieg bei allen Ratten mit der Zeit durch Wachstum stetig an. Die Geschwindigkeit der Zunahme variierte jedoch zwischen den Gruppen.

Die weiblichen Sprague Dawley Ratten, die im Alter von 12 Wochen ovariectomiert worden sind, nahmen danach deutlich schneller an Gewicht zu als die Tiere ohne Ovariectomie. Bereits eine Woche nach der Ovariectomie wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit und

denen ohne Ovariectomie ermittelt. Bis zum Ende der Studie blieb diese Differenz bestehen. Der Effekt der Gewichtszunahme nach einer Ovariectomie stimmt mit vorherigen Studien überein (Komrakova et al. 2009; Kling 2016; Reeholtz 2017).

Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Ovariectomie bei den Ratten zu hormonellen Modulationen. Besonders deutlich ist der Rückgang von Östrogenen. Auch in früheren Studien wurde eine deutlich erhöhte Gewichtszunahme bei den Ratten registriert, bedingt durch die verminderten Östrogenspiegel (Reeholtz 2017).

Anfangs zeigte sich bei den ovariectomierten Tieren eine gesteigerte Futteraufnahme, die sich dann in der Gewichtszunahme widerspiegelte. Am Ende der Studie glichen sich die Futtermengen der Gruppe wieder der Non-OVX-Gruppe an. Die Gewichtszunahme ist zusätzlich durch eine verstärkte Fetteinlagerung erklärbar. Der starke Anstieg der Fettmasse kommt unter anderem durch den niedrigen Östrogenspiegel zustande (Campbell und Febbraio 2001). Der Wegfall der Ovarialhormone führt zu einem veränderten Fett- und Proteinstoffwechsel, sowohl bei der Ratte als auch bei Menschen. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung an fett- und fettfreiem Gewebe (Toth et al. 2001). Genau wie bei einer postmenopausalen Frau führt diese Östrogenverminderung letztendlich zu einem starken Anstieg des Fettanteils in Relation zur gesamten Körpermaße (Jung et al. 2014).

Im Schnitt wogen die Tiere der ovariectomierten Gruppen 90 g mehr als die Tiere der Non-OVX Gruppe. Weder das Baicalein noch das Zileuton oder beide in Kombination induzierten eine Veränderung des Körpergewichts der Ratten. Die mit Baicalein behandelte Gruppe lag im mittleren Körpergewicht nur knapp unter dem der unbehandelten ovariectomierten Ratten. Hingegen konnten Guo et al in ihrer Studie eine hemmende Wirkung des Baicaleins auf die Gewichtszunahme erkennen. Sie führten dies aber auf die durch das Baicalein verursachte Abnahme des Cholesterin-, freie Fettsäuren- und Insulinspiegels zurück. Die Ratten in ihrem Versuch waren jedoch nicht ovariectomiert, sondern wurden mit einer „High Fat Diet“ behandelt und bekamen eine deutlich höhere Dosis Baicalein intraperitoneal verabreicht (80 mg/kg) (Guo et al. 2009). Demnach lässt sich konstatieren, dass das Baicalein zwar einen positiven Effekt gegen die Entwicklung einer Fettleber und Fettmassenzunahme bei hochkalorischem Essen hat, dennoch scheint es die Gewichtszunahme bei Östrogenmangel nicht weiter beeinflussen zu können.

Durch die Behandlung mit Zileuton kam es im Vergleich zu allen OVX Gruppen ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung im Körpergewicht der ovariectomierten Tiere. In der Tat konnten auch vorherige Studien keine signifikante Ab- oder Zunahme des Gewichtes unter

Zileuton feststellen (Chen et al. 2004; Saul et al. 2017b). Einen direkten Einfluss auf das Körpergewicht unter Östrogenmangel hat das Zileuton nicht.

Das Körpergewicht der Tiere, die die Kombinationstherapie aus Baicalein plus Zileuton erhielten, lag genau zwischen den Gewichten beider Einzeltherapien. Somit konnte auch die Kombinationstherapie eine Gewichtszunahme nach Ovariectomie nicht verhindern.

Es ist zu klären, in wie weit die beiden Mittel das endokrine System der ovariectomierten Ratten beeinflussen. Bekannt ist bereits, dass Baicalein in das System der Östrogenspiegelregulierung eingreift. Eine östrogenhemmende Wirkung durch das Baicalein ist möglich (Po et al. 2002). So bezeichnete Schwartz Baicalein auch als ein Anti-Östrogen, da es am Rezeptor von Östrogen antagonistisch wirken würde und diese somit blockiere. Für diese Wirkung muss jedoch Östrogen vorhanden sein (Schwartz 2008).

Hinsichtlich der am Ende der Studie erfassten Muskelgewichte zeigten sich zwischen den absoluten Werten der Muskelgewichte der verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Differenzen, weder bei *M. soleus* noch beim *M. gastrocnemius*.

In Relation zum Körpergewicht hat die Muskelmasse des Gastrocnemius bei den ovariectomierten Ratten im Vergleich zur Non-OVX in sehr geringem, aber nicht signifikantem Maße, abgenommen. Beim Soleus wurde eine signifikante Abnahme des Muskelgewichtes in Relation zum Körpergewicht in allen ovariectomierten Gruppen zur Non-OVX festgestellt. Zum Ausgleich der Muskelmasse scheint nach der Ovariectomie dafür der Fettanteil gestiegen zu sein. Diese Ergebnisse konnten auch schon in anderen Studien mit ovariectomierten Ratten festgestellt werden (Fisher et al. 2000; Kling 2016).

Vergleicht man die ovariectomierten Gruppen untereinander ist zu erkennen, dass die Baicalein, Zileuton oder Baic.+Zileu. Behandlungen keinen Effekt auf das Gewicht der beiden Muskeln haben.

Die drei Faktoren: eine zwischenzeitlich reduzierte Futteraufnahme, weniger Bewegung und der nach der Osteotomie folgende Heilungsprozess wirkten sich mit einer großen Wahrscheinlichkeit neben dem Knochenwachstum auch auf strukturellen Veränderungen der Rattenmuskulatur aus. Die beiden Lipoxygenasehemmer Baicalein und Zileuton könnten dies gegebenenfalls durch ihren entzündungshemmenden Effekt positiv beeinflusst haben (Ivanova et al. 2011).

4.2.1 Analyse der Futtermenge

Im Jahr 2007 fanden Gao et al. bereits heraus, dass das Östrogen ähnlich wie das Hormon Leptin, hypothalamische Zellen beeinflusst, um den Appetit zu hemmen. Leptin ist heutzutage auch

bekannt als Schlankheitsmittel und Appetitzügler. Beide Hormone nutzen den gleichen Signalweg um die Nervenzellen im Hypothalamus zu stimulieren. Die bereits erwähnte postmenopausale Gewichtszunahme kann mit dem gesteigerten Appetit durch den Östrogenmangel zusammenhängen (Gao et al. 2007).

In dieser Studie zeigte sich, dass die ovariectomierten Ratten deutlich mehr Futter zu sich nahmen als die Non-OVX. Potentiell verantwortlich war die fehlende Appetithemmung des Östrogens. Dieser Spiegel fällt nach einer Ovariectomie deutlich ab. In der zweiten bis zur achten Woche der Studie divergierten die Futteraufnahmen zwischen den ovariectomierten Gruppen und der Non-OVX signifikant voneinander. Nur in der vierten Woche unterschieden sich die Futtermengen nicht signifikant.

Nach der Osteotomie, von der 8. bis 10. Woche nahm die Futteraufnahme zunächst deutlich ab. Besonders in der Non-OVX und den behandelten Gruppen verringerte sich die Futteraufnahme um bis zu 8 mg/Tier/Tag. Dies trat vermutlich durch postoperative Schmerzen auf, die zwar durch regelmäßige Verabreichung von Analgetika vermindert werden konnten, aber trotzdem nicht ganz reduziert wurden. Andere vorherige Arbeiten beschreiben dasselbe Phänomen (Sturmer et al. 2010; Komrakova et al. 2016; Rechholtz 2017).

Zusätzlich kam es in dieser Studie auf Grund zu hoher Dosierung und zu häufigen Verabreichung an Analgetika zu gravierenden Nebenwirkungen. Nach Obduktion der daran verstorbenen Tiere konnten die Nebenwirkungen auf das NSAID Carprofen zurückgeführt werden. So kam es bei den Tieren zu schweren gastrointestinalen Blutungen. 18 Tiere verstarben bzw. mussten deswegen innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Osteotomie getötet werden. Es wurde bereits 1990 erwähnt, dass eine Überdosis an Carprofen bei Ratten zu Gastrointestinal- und Nierenschäden sowie zu ZNS-Störungen, wie Anfälle und Koma führen könnte (Smolinske et al. 1990).

Nach dem Absetzen der Schmerztherapie und bis zum Ende des Versuches konnte sich die Futteraufnahme aber wieder normalisieren und blieb in etwa konstant.

Es ist wichtig, in Zukunft solche schwerwiegenden Nebenwirkungen zu vermeiden, um das Ziel, den Tieren durch Analgesie zu helfen, nicht zu konterkarieren.

4.2.2 Analyse der Uterusgewichte

Die Analyse der Uterusgewichte war unbedingt erforderlich um festzustellen, ob die Entnahme der Ovarien am Anfang des Versuches erfolgreich war. Nur wenn eine Uterusatrophie bei den OVX-Ratten nachgewiesen werden kann war davon auszugehen, dass durch den dann entstehenden Östrogenmangel eine Osteoporose in den weiblichen Ratten induziert werden konnte. Hin-

zukommend wurde durch das registrierte Gewicht überprüfbar, in wie weit das Baicalein, Zileuton oder beide in Kombi eine direkte Auswirkung auf die Uteri zeigen (Kling 2016).

Zunächst konnte bestätigt werden, dass die Gewichte der Uteri der ovariectomierten Ratten höchstsignifikant vermindert zur Non-OVX waren. Demzufolge war die Entnahme bei allen Tieren erfolgreich und es wurde ein adäquater Hormonentzug an Östrogen eingeleitet. Des Weiteren zeigten die Baicalein, Zileuton oder Baicalein plus Zileuton keine signifikante Differenz zum Uterusgewicht der OVX-Gruppe ohne Behandlung. Auch in der Studie von Kling et al. (2016) konnte evaluiert werden, dass Baicalein keine weiteren Effekte auf das Uterusgewicht hat. (Kling 2016) Vergleichbar mit dem Baicalein ist die alleinige Wirkung des Zileuton. Weder in dieser noch in einer vorherigen Studie konnte eine Wirkung auf die Uteri erfasst werden. (Saul D. et al. 2017b) Auch die Kombination beider Lipoxygenasehemmern inhibierte keine Atrophie der Uteri nach erfolgter OVX.

4.2.3 Analyse der Muskeldurchblutung hinsichtlich der Kapillarisation nach der Ovariectomie

Mit dem Alter nimmt die Kapillarisation der Skelettmuskulatur um bis zu 25% ab. Daraus resultiert unweigerlich eine Abnahme der Muskelmasse und Muskelkraft. Gleichzeitig ist dabei ein Verlust der Ausdauer bei älteren Personen zu erkennen (Coggan et al. 1992). Die Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser in einem Muskel ist daher eine wichtige Kennzahl. Je höher die Kapillarisation, desto besser trainiert und ausgebaut ist der Muskel. Mit zunehmendem Alter und bei vorliegender Sarkopenie sinkt die Kapillarisation pro Muskelfaser deutlich. Folglich kann das Verhältnis in einem Muskel eine Aussage darüber treffen, wie leistungsstark dieser selbst noch ist (Diehl 2009).

Ein wichtiger Signalstoff für das Wachstum von Kapillaren im Körper ist VEGF, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor. VEGF ist nicht nur für das Wachstum neuer Kapillaren unabdingbar, sondern auch um die Skelettmuskelkapillarisation aufrecht zu erhalten. Fehlt VEGF kommt es mit der Zeit zu einer Degeneration an Kapillaren (Croley et al. 2005).

In Ruhe ist die Konzentration an VEGF im Muskel älterer Frauen bis zu 35% niedriger als bei jungen. Dies hängt vor allem mit dem Östrogenspiegel zusammen, welcher bei postmenopausalen Frauen deutlich niedriger ist. Östrogene modulieren die VEGF-Expression in den glatten Muskelzellen von Gefäßen. Folglich sind die Östrogene indirekt auch für den Erhalt der Kapillarisation im Muskel und für angioproliferative Signale verantwortlich. Fällt der Stimulus des Östrogens postmenopausal oder altersbedingt bei Menschen ab, so sinkt gleichzeitig auch der Anteil an VEGF. Zur Folge hat dies, dass die Kapillarisation im Muskel zurückgeht und schwerer wieder aufzubauen ist (Croley et al. 2005).

In gleicher Weise nimmt die Genexpression, der für die Bildung des VEGF wichtigen mRNA, in ovariectomierten Ratten durch den Östrogenmangel deutlich ab. Die Abnahme von VEGF bedeutet ebenso eine mangelnde Rekapillarisation der Muskulatur. Nur durch Therapien, wie mit Strontiumranelat, konnte die Bildung von VEGF erneut gesteigert werden (Saul et al. 2017a).

Eine niedrige Kapillarisation führt zu einer verstärkten Schwäche der Muskulatur und geringerer Ausdauer- und Leistungsfähigkeit. Durch den Rückgang der Blut- und somit auch Sauerstoffversorgung kommt es zu weiteren Muskelzellverlusten. Ein nicht endender Kreislauf entsteht, der schließlich auch zu einem erhöhtem Sturzrisiko mit Folge von osteoporotischen Frakturen führt (Moulias et al. 1999).

Im gesunden Gewebe ist die Angiogenese sehr stark, aber gut reguliert. Die Kapillaren transportieren den wichtigen Sauerstoff zur Zelle und entfernen schädliche Metaboliten aus dem Gewebe. Allerdings verschlechtert sich diese Regulierung im kranken Gewebe. Zum einen kann dies zu einem übermäßigem Kapillarwachstum führen, wie man es im Tumorgewebe vorfindet. Zum anderen kann es zu einem Kapillarverlust kommen, zum Beispiel bei der Sarkopenie. Beide Richtungen schaden der Skelettmuskulatur. Es ist daher wichtig, diese Prozesse zu unterbinden. Hilfreich ist dabei die Eigenschaft der Skelettmuskulatur, sehr adaptiv zu sein (Olfert et al. 2016).

In dieser Studie sollte nun festgestellt werden ob die Lipoxigenasehemmer Baicalein und Zileuton die Angiogenese der Skelettmuskulatur beeinflussen könnten.

Vergleicht man zunächst die Kapillarisation der OVX Gruppe zur Non-OVX, so lässt sich keine Änderung der Kapillarisation erkennen. In den ovariectomierten Tieren nahm jedoch die Muskelmasse leicht zu, was dazu führte, dass eine erhöhte Blutversorgung benötigt wurde. Eine Erhöhung der Kapillarisation bei Ovariectomie konnte auch in anderen Studien jedoch eruiert werden (Komrakova et al. 2009). Folglich konnten dort die Lipoxigenasehemmer über verschiedene Schritte die Bildung des VEGF angeregt werden, was zur Steigerung der Angiogenese im Muskel führte (Bausero et al. 2000).

4.2.4 Analyse der Wirkung von den Lipoxigenasehemmern auf die Kapillarisation

Die beiden Lipoxigenasehemmer Baicalein und Zileuton wurden den Tieren einzeln und als Kombination oral verabreicht um zu analysieren, wie sie die Kapillarisation in einem postmenopausalen Muskel beeinflussen kann.

Bei der alleinigen Gabe von Baicalein nach erfolgter Ovariectomie änderte sich die Kapillarisation in allen drei untersuchten Muskeln nicht signifikant. Dadurch bestätigte sich in diesem Ver-

sich nicht die Hypothese der vorherigen Studie von Kling, wonach Baicalein in der Lage ist die Angiogenese in der Skelettmuskulatur der ovariectomierten Ratte zu verbessern (Kling 2016).

Wie sich oral verabreichtes Zileuton, ein chemischer Lipoxygenase-5-inhibitor, auf die Kapillarisierung der Skelettmuskulatur auswirken würde, sollte erstmalig in dieser Studie eruiert werden. Schließlich konnte in keinem der Muskeln ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erhoben werden.

In Kombination wurden die beiden selektiven Lipoxygenasehemmer Baicalein und Zileuton untersucht. Die positive Wirkung des Baicaleins in bestimmten Dosen auf die Angiogenese ovariectomierter Ratten konnte in der Studie von Kling et al. gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass Zileuton auf Grund ähnlicher Eigenschaften zum Baicalein, dieselbe Wirkung auf das muskuloskelettale System haben könnte. Es stellte sich die Frage, ob beide Inhibitoren in Kombination einen stärkeren Effekt auf die Angiogenese haben würden.

Letztendlich wies die Kombibehandlung im M. gastrocnemius einen signifikant höheren Anteil an Kapillaren pro Muskelfaser im Verhältnis zu der Non-OVX und der OVX-Gruppe auf. Auch zu den anderen Gruppen war die Kapillarisierung tendenziell verstärkt. Daraus ließ sich schließen, dass besonders die Kombinationsbehandlung die Angiogenese in ovariectomierten Ratten steigern konnte und die Durchblutung der Muskulatur verbesserte. Dieses Ergebnis könnte damit zusammenhängen, dass beide Wirkstoffe synergistisch auf die Lipoxygenasen wirken und sich gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken.

Da die Kapillarisierung eines Skelettmuskels mit dessen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zusammenhängt ist verständlich, dass die Steigerung der Kapillarisierung positive Konsequenzen für den gesamten Organismus haben (Diehl 2009).

Zusammenfassend bewirkte in diesem Versuch die Kombinationsbehandlung aus Baicalein und Zileuton eine signifikante Steigerung der Angiogenese in der Skelettmuskulatur nach erfolgter Ovariectomie.

4.2.5 Analyse der Muskelfaserdurchmesser und Muskelfaserfläche nach der Ovariectomie

Durch die Ovariectomie wurde bei den Ratten ein künstlicher postmenopausaler Zustand hervorgerufen. Die starken Veränderungen des Hormonhaushalts in dem Organismus der Ratten sind entsprechend der Postmenopause einer Frau.

Nicht nur der Muskelfaserdurchmesser verändert sich durch die hormonellen Veränderungen und das Altern. Nach einer Ovariectomie vergrößert sich im Allgemeinen zunächst der Durchmesser in alle Muskelfasertypen der Ratten (Kobori und Yamamuro 1989). Zusammen mit der

Muskelfaserfläche setzt sich der Muskelquerschnitt neu zusammen (Maltais et al. 2009). In Untersuchungen fand man heraus, dass die Muskelfaseratrophie mit einer vermehrten Einlagerung von Fetten und Kollagenen in den Muskel, insbesondere bei Frauen, korreliert. Diese Einlagerung kommt zum einen durch die hormonelle, zum anderen durch enzymatische Veränderungen zu Stande. Letztendlich werden vermehrt Triglyceride zur Energiegewinnung im Muskel gespeichert (Forsberg et al. 1991).

Ziel war es herauszufinden, ob durch die Behandlungen mit den Lipoxygenaseinhibitoren Baicalein und Zileuton eine Veränderung hinsichtlich des Muskelfaserdurchmessers und der Muskelfaserfläche erfasst werden würde. Weiter sollten diese Parameter in Relation zum Körper- und Muskelgewicht gesetzt werden. Die Ergebnisse sollten Kenntnisse hinsichtlich der Wirkung des Baicaleins, Zileutons und beide in Kombi auf die Muskulatur liefern und klären, ob durch ihre Therapie eventuell die muskulären Veränderungen durch den Östrogenmangel verhindert werden kann.

Eine Zunahme des Muskelfaserquerschnitts und ein gesteigertes Volumen der postmenopausalen Muskulatur konnte bereits durch die Gabe von Östrogenen verhindert werden. Teilweise wurde belegt, dass die Muskelfaserfläche nach einer OVX mit der Therapie von Östrogenen sogar abnimmt (Kobori und Yamamuro 1989).

In dieser Studie konnte jedoch, wie bereits in vorherigen, die Zunahme des Durchmessers der Muskelfaserfläche nach Ovariectomie nicht bestätigt werden. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zur Non-OVX hinsichtlich der Durchmesser der verschiedenen Muskeln- und Muskelfasertypen (McCormick et al. 2004; Kling 2016). Dennoch ist eine leichte Tendenz einer Vergrößerung des Faserdurchmessers nach Entfernung der Ovarien zu erkennen.

In Bezug auf das Körpergewicht war hingegen eine höchstsignifikante Querschnittabnahme im Typ-I Fasern des *M. longissimus* im Vergleich zur Non-OVX Gruppe festzustellen. Auch in den Typ-II-Fasern des *M. longissimus* und den Muskelfasern vom *M. gastrocnemius* und *soleus* konstituierte sich ein signifikant geringerer Durchmesser pro Gramm Körpergewicht in Relation zur Non-OVX. Durch einen veränderten Muskel- und Proteinstoffwechsel in ovariectomierten Ratten ergibt sich insgesamt eine erhöhte Körpermasse. Daraus folgt die verringerte Relation von Faserdurchmesser zum Körpergewicht (Toth et al. 2001; Kadi et al. 2002).

Insgesamt fiel auf, dass in allen fünf Gruppen die Typ-II-Fasern im Schnitt die größeren Flächen aufwiesen als die Typ-I-Fasern. Diese Eigenschaft der beiden Muskelfasertypen findet man ebenso beim Menschen. Dabei haben die langsamen Typ-I-Fasern einen Durchmesser von ca. 50 μm , die schnellen Typ-II-Fasern hingegen einen von 80-100 μm (Riener 1997).

4.2.6 Analyse der Wirkung von Baicalein auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche

Bei den Ergebnissen dieser Studie fiel bei der reinen Betrachtung der absoluten Werte des Muskelfaserdurchmessers in der Baicalein-Gruppe auf, dass es tendenziell zu einer verringerten Durchmesserzunahme als bei den anderen Gruppen kam. Die Ergebnisse ergaben jedoch keine signifikanten Größenunterschiede zueinander.

Betrachtet man die drei Muskeln, *M. longissimus*, *M. soleus* als auch den *M. gastrocnemius*, so zeigten sich keine signifikanten Resultate nach Behandlung mit Baicalein. Im *M. longissimus* konnte in den Typ-I- als auch in den Typ-II-Fasern tendenziell der geringste mittlere Durchmesser und die geringsten Flächen innerhalb aller fünf Gruppen ermittelt werden. Sowohl im *M. soleus* als auch im *M. gastrocnemius* lagen die Faserdurchmesser und -flächen der einzelnen Gruppen sehr nahe beieinander.

In Relation zum Körpergewicht zeigten sich im *M. longissimus*, im *M. soleus* und in den Typ-I-Fasern des *M. gastrocnemius* signifikant kleinere Muskelfaserdurchmesser und -flächen zu der Non-OVX Gruppe. Im Vergleich mit der OVX-Gruppe ließen sich dennoch keine Signifikanzen feststellen. In der Fläche-Körpergewicht-Relation konnten ansonsten keine weiteren signifikanten Divergenzen ermittelt werden.

In Bezug des Muskelgewichts auf die Durchmesser bzw. den Flächen lagen weder beim *M. soleus* noch beim *M. gastrocnemius* Signifikanzen zwischen den Gruppe vor.

Insgesamt unterstützen die vorliegenden Daten aus dieser Arbeit jedoch tendenziell die Hypothese, nach der Baicalein in den drei untersuchten Muskeln eine reduzierende Wirkung auf die Muskelfaserparameter induziert und damit in Maßen eine Flächenzunahme der Muskelfasern verhindert werden könnte. Eine pathologische Vergrößerung der Muskulatur durch Fett oder andere Einlagerungen könnte somit verhindert werden (Xi et al. 2016). Es ist daher anzunehmen, dass Baicalein nach einer Ovariectomie positive Auswirkungen auf das muskuloskeletale System hinsichtlich der Durchmesser- und Flächenzunahme der Muskelfasern hat.

Eine Zunahme der Muskelfaserdurchmesser oder -flächen nach Behandlung mit Baicalein, wie in den vorherigen Studien, konnte nicht gezeigt werden (Kling 2016; Saul et al. 2016).

4.2.7 Analyse der Wirkung von Zileuton auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche

Zur Wirkung des Zileuton auf den Muskelfaserdurchmesser und der Muskelfaserfläche bei ovariectomierten Ratten liegen noch keine veröffentlichten Studien oder Versuche vor. Als ein Lipo-

xygenasehemmer mit seiner entzündungshemmenden Wirkungsweise geht man dennoch davon aus, dass Zileuton wie Baicalein einen Einfluss auf die Struktur der Muskulatur hat (Rossi et al. 2010).

Versuche an glatten Muskelzellen der Lunge konnten bereits evaluieren, dass Lipoxygenasehemmer wie das Zileuton auf diese Zellen durch Entzündungshemmung eine Zellproliferation reduzieren können. Eine durch Leukotriene ausgelöste Hypertrophie, Hyperplasie und vergrößerte extrazelluläre Matrix wird über eine Hemmung des Phosphatidylinositol-3-kinase-Signalwegs (PI3K/Akt), durch das Zileuton verhindert. Dadurch wird in der Lunge die Cyclin D1 Expression deutlich reduziert (Chen et al. 2013).

Ähnliche entzündungshemmende Effekte wie in der Lunge sollten in dieser Studie auch bei oraler Gabe des Zileuton in der Skelettmuskulatur herausgearbeitet werden.

Betrachtet man zunächst die einzelnen Durchmesser und Flächen des *M. longissimus*, *M. soleus* und *M. gastrocnemius* so zeigten sich hier durch die Behandlung mit Zileuton keine signifikanten Veränderungen.

Indessen zeigten sich erst in der Relation zum Körpergewicht Signifikanzen in der Zileutongruppe. Im Longissimus fanden sich signifikant kleinere Durchmesser der Typ-I- und Typ-II-Fasern in Relation zum Körpergewicht zur Non-OVX-Gruppe. In Relation des Körpergewichtes auf die Muskelfaserfläche zeigten sich keine Signifikanzen.

Im Vergleich zur Non-OVX ergaben sich beim *M. soleus* und beim *M. gastrocnemius* signifikant verringerte Durchmesser und Flächen pro Gramm Körpergewicht. Die Durchmesser-zum-Muskelgewicht-Relation und die Flächen-Muskelgewicht-Relation lieferten weder beim *M. soleus* noch beim *M. gastrocnemius* statistische Signifikanzen.

Schlussendlich kann zusammengefasst werden, dass Zileuton keine wesentlichen Veränderungen auf die Muskelfaserdurchmesser bzw. -flächen der ovariektomierten Ratten hat. Erst in Bezug auf das Körpergewicht konnten überhaupt Signifikanzen aufgewiesen werden, was aber durch die erhöhten Körpergewichte nach der OVX erklärt werden kann.

Die fehlende signifikante Wirkung auf die Fläche und den Durchmesser liegt möglicherweise an der Dosis oder an der Dauer der Behandlung mit dem Zileuton. Es hat sich bereits gezeigt, dass die freie Radikalfänger-eigenschaft des Zileutons stark mit dessen Konzentration im Körper der Ratte zusammenhängt. Durch Veränderung der Konzentration durch die Dosis oder der Behandlungsdauer, könnte ggf. auch der Effekt auf die Muskulatur verstärkt werden (Abueid et al. 2017).

4.2.8 Analyse der Wirkung von Baicalein und Zileuton auf den Muskelfaserdurchmesser und die Muskelfaserfläche

Es gibt bis dato keine Studien, die den Einfluss von Baicalein in Kombination mit Zileuton auf den Durchmesser und die Fläche der Muskelfasern beschreiben. Insgesamt fiel in der Einzelbehandlung der Wirkstoffe auf, dass es zu keinen Veränderungen gekommen ist. Man stellte sich nun die Frage, wie beide zusammen auf die jeweiligen Muskeln wirken.

Die Effekte auf den Faserdurchmesser und die -fläche durch die Kombinationsbehandlung im M. longissimus, M. soleus und im M. gastrocnemius waren alle nicht signifikant verschieden zu den anderen Gruppen.

Tendenziell verringerten sich der Faserdurchmesser und die Faserfläche beim M. longissimus und M. gastrocnemius im Vergleich zur OVX ohne eine Therapie. Dem entgegen konnte die Kombination im M. soleus zu keiner Veränderung der Fasergröße, in Relation zur ovariectomierten Gruppe führen.

Bezogen auf den Durchmesser bzw. die Fläche auf das Körpergewicht, eruierte sich bei dem M. longissimus eine signifikante Differenz der Kombinationstherapie-Gruppe zu der Non-OVX. Die Kombination verringerte jeweils den Faserdurchmesser und -fläche im M. longissimus stärker als eine alleinige Therapie des Lipoxygenasehemmer Zileuton oder nur OVX.

In Relation zum Körpergewicht lagen die Durchmesser und die Flächen der Muskelfasern des M. soleus und des M. gastrocnemius in der Baic.+Zileu. signifikant unter der Non-OVX. In Bezug auf das Muskelgewicht konnten weder beim M. soleus noch beim M. gastrocnemius Signifikanzen erhoben werden.

Diese beiden Ergebnisse lassen darauf deuten, dass die ovariectomierten Ratten unabhängig von der Baic.+Zileu. Behandlung stark an Körpergewicht zunahm, das Muskelgewicht sich dabei aber nicht gleichermaßen vergrößerte.

Unter Östrogenmangel kommt es intramuskulär vermehrt zu Einlagerung von Wasser, Bindegewebe und Fettgewebe. Folglich bedeutet die Zunahme der Fläche nicht mehr Kraft und Energie. Insgesamt treten dadurch zumeist Symptome einer Sarkopenie auf (Forsberg et al. 1991). somit positiv, dass eine Zunahme des Muskelgewichts und der relativen Durchmesser bzw. Flächen pro Gramm Körpergewicht durch die Kombinationsbehandlung verhindert werden konnte.

Zusätzlich könnte man nun überprüfen, ob die beiden Lipoxygenasehemmer Auswirkung auf die Muskelfunktion haben. Wie effizient die Muskulatur ist, kann beispielsweise mittels der ³¹P-Magnetic Resonanz Spektroskopie (³¹P-MRS) gemessen werden (Layec et al. 2015).

Zusammenfassend betrachtet lassen die vorliegenden Versuchsergebnisse eine reduzierende Wirkung bei Kombination beider Wirkstoffe auf die Muskelfaserdurchmesser und -flächen der östrogendeprivierten Skelettmuskulatur annehmen. Diese Ergebnisse müssen jedoch mit Vorsicht bewertet werden, da sich jeweils erst in Bezug zum Körpergewicht signifikante Ergebnisse feststellen ließen und die absoluten Werte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gezeigt haben.

4.3 Analyse der Verteilung der Muskelfasertypen im *M. longissimus*

Hinsichtlich der Verteilung der Muskelfasertypen innerhalb eines Muskels kommt es postmenopausal zu einer Verschiebung. Zunächst kommt es zu einer Denervation von Typ-II-Fasern, an die sich eine Atrophie anschließt, gefolgt von einer Reinnervation und Umstellung auf Typ-I-Fasern. Festzustellen ist dieser Prozess ebenfalls bei älteren Menschen, deren Muskulatur durch die Typverschiebung schwächer und langsamer wird. Ausschlaggebend ist der Faserverlust an den schnell zuckenden Typ-II-Muskelfasern und den daraufhin ansteigenden und schließlich größeren Anteil der langsameren, oxidativen Typ-I-Fasern. Diese Veränderung wird auch als fast-to-slow-fiber type shift bezeichnet (Maltais et al. 2009).

Wie in der Literatur beschrieben, weist der *M. longissimus* der Non-OVX Ratte insgesamt einen prozentual höheren Anteil an den Typ-II Fasern zur Gesamtfaserzahl auf als an den langsameren Typ-I Fasern (Schwartz-Giblin et al. 1983). Der Anteil der Typ-I-Fasern lag in diesem Versuch bei den Non-OVX bei etwa 40-45%, der Anteil an Typ-II-Fasern bei 55-60%.

Die Ovariectomie führte zu keinem signifikanten Shift der Fasertypen im *M. longissimus*. Kobori und Yamamuro kamen zu einem gleichen Ergebnis. Auch in ihrer Studie hatte die Östrogendeprivation keinen Einfluss auf die Verteilung der Fasertypen in der Rattenmuskulatur (Kobori und Yamamuro 1989). Durch die Ovariectomie bei den Ratten und dem damit resultierenden Östrogenmangel scheint es folglich nicht zu einer sofortigen Veränderung der Muskelfaserisoformen zu kommen.

Auch durch die Behandlung mit Baicalein, Zileuton oder beide in Kombination ergaben sich in der Muskelfaserverteilung keine signifikanten Änderungen.

Man geht davon aus, dass auch andere Sexualhormone des Ovars, wie das Testosteron, zusammen mit dem Östrogen die Muskulatur hinsichtlich der Faserzusammensetzung beeinflussen. Der Testosteronspiegel bleibt nach einer Ovariectomie bei weiblichen Ratten relativ konstant und verändert sich auch nicht besonders im Verlauf ihres Lebens. Letztendlich liegt es vermutlich

auch daran, dass die Faserzusammensetzung ovariektomierter Ratten annähernd gleich bleibt (Piccone et al. 2005).

4.4 Analyse der Serumparameter

Allgemein lassen sich Veränderungen an der Muskulatur im Blutserum erkennen. Das liegt daran, dass die quergestreifte Muskulatur viele wichtige Enzyme für ihre komplexe Funktion besitzt. Zu diesen Enzymen gehören beispielsweise die Kreatinkinase (CK), die Lactatdehydrogenase oder die Aspartat-Aminotransferase. Kommt es durch Erkrankungen zu Veränderung der Muskelzellmembran werden diese Enzyme vermehrt aus den Muskelzellen freigesetzt und können dann im Blutserum gemessen werden. Bei einer Rhabdomyolyse, einem Infarkt oder größeren Muskelschäden würde es beispielsweise zu einem sehr hohen Anstieg der CK im Blut kommen (Schröder 1982; Dörner 2009).

Das Enzym Kreatinkinase ist in den Muskelzellen wichtig, um ihren intrazellulären ATP-Spiegel konstant hoch zu halten. Mit Hilfe der CK wird das für den Energiestoffwechsel der Zelle wichtige ATP regeneriert, indem das CK die Reaktion zwischen Phosphokreatin mit ADP katalysiert und letztendlich ATP entsteht. Andersherum kann CK aber auch ATP mit Kreatin zu Phosphokreatin reagieren lassen (Schröder 1982).

Ein niedriger Serum-CK-Spiegel bedeutet aber nicht direkt, dass ihr Gehalt in der Zelle niedrig ist. Denn der Spiegel hängt auch stark mit der physischen Aktivität und der Muskelmasse zusammen. Ist der Muskelaktivitätslevel niedrig, wird weniger CK aus den Muskelfaserzellen freigesetzt und der CK-Spiegel im Serum bleibt infolgedessen niedrig (Rosalki 1998).

Die Serumkonzentrationen der Kreatinkinase der Versuchstiere unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Auch in vorherigen Studien zeigten sich bei Gabe von Zileuton oder Baicalein keine negativen Effekte auf die Muskulatur (Kling 2016; Saul et al. 2017b).

Bisher konnte noch kein Zusammenhang zwischen einer Sarkopenie oder Osteoporose mit einem gestiegenen Kreatinkinase-Wert gestellt werden (Huo et al. 2015).

4.5 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Studie bestand darin, den Effekt der selektiven Lipoxygenasehemmer Baicalein und Zileuton auf die Skelettmuskulatur von ovariectomierten Ratten zu eruieren. Es wurde untersucht, wie die beiden Substanzen, Baicalein und Zileuton, alleine und in Kombination auf das muskuloskeletale System wirken können. Der Zustand der Postmenopause konnte mit Hilfe der Ovariectomie erzeugt werden.

Insgesamt zeigte sich, dass Baicalein und Zileuton in kombinierter Gabe die Kapillarisation im Muskel erhöhen und somit zu einer verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Muskels führen. Auf die Muskelfasergröße haben beide Lipoxygenasehemmer weniger Effekte gezeigt.

Die einzelne Behandlung mit Baicalein ergab keinen signifikanten Effekt auf die Kapillarisation. Jedoch konnte die Zunahme der Muskelfaserfläche und -durchmesser pro g KG und pro g MG leicht durch die Behandlung mit Baicalein vermindert werden. Baicalein hat einen positiven Einfluss auf den kortikalen Knochen der osteoporotischen Ratten (Saul et al. 2017b). Auch konnte eine Zunahme der Dichte und Breite des Kallus während der Knochenheilung exploriert werden (Zimmermann 2018; Saul et al. 2019; Weber 2019).

Betrachtet man die Therapie mit Zileuton, so zeigte sich die Beeinflussung auf das muskuloskeletale System besonders in einer leichten Steigerung der Kapillarisation und der allgemeinen Stabilisierung der Durchmesser- und Flächenzunahme der Muskulatur. Beides war jedoch erst in Bezug zum Körpergewicht signifikant.

Es wurde bereits festgestellt, dass Zileuton den Knochen hinsichtlich seines trabekulären und kortikalen Volumen verbessert. Zudem konnte eine gesamte Knochen volumenzunahme im Bereich der osteotomierten Tibia der ovariectomierten Ratten erfasst werden (Saul et al. 2017).

Dies sind wichtige Faktoren, da sich die Muskulatur und das Knochenskelett gegenseitig beeinflussen und sich komplementär stärken aber auch schwächen (Saul et al. 2016; Saul et al. 2017b). Deswegen ist es wichtig, die Sarkopenie und die Osteoporose zusammen zu therapieren. Die beiden Lipoxygenasehemmer scheinen für die zukünftige Behandlung dieser beiden Erkrankungen relevant zu sein, da sie beide Systeme gleichzeitig beeinflussen können. Sie haben unterstützende Effekte, die der Muskel- und Knochenstärkung, sowie deren Erhaltung dienen. Aus diesem Grund könnten beide Lipoxygenasehemmer postmenopausalen Patienten mit Sarkopenie und Osteoporose helfen.

Folglich wären, für die weitere Forschung an beiden Substanzen, Tiermodelle speziell für die Sarkopenie hilfreich. So könnten Effekte auf die Muskulatur besser evaluiert werden. Beispiele wären das Sarkopeniemodell mithilfe einer fettreichen Diät, der Gabe von dem katabolen Tumornekrosefaktor- α , einer Denervation der Skelettmuskulatur oder Hypokinesie in den Hinterbeinen von Ratten (Musacchia et al. 1980; Beehler et al. 2006; Bollheimer et al. 2012; Maetzler et al. 2015).

Die genauen Wirkungsmechanismen beider Lipoxigenasehemmer auf die Kapillarisation und Faserdicke der Muskulatur sollten in weiteren Studien untersucht werden. Zudem wird es wichtig sein, in zukünftigen Studien zusätzlich die Muskelkraft zu messen, um eine Aussage über die funktionelle Bedeutung der Effekte treffen zu können. Auch sind weitere Analysen über ihre Effekte auf molekularer Ebene der Muskulatur zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Der Anteil der älteren Bevölkerung steigt in Deutschland stark an. Konsequentermaßen wird dies auch zu einem deutlichen Anstieg der altersbedingten und postmenopausalen Krankheiten, wie der Osteoporose oder Sarkopenie, führen. Es ist daher wichtig für solche, häufig unterschätzten Krankheiten, präventive Maßnahmen oder Therapieformen zu finden. Zum einen aus wirtschaftlichen Gründen, um eine Kostenexplosion für das Gesundheitssystem zu verhindern. Zum anderen aber auch, um die Lebensqualität und -freude der immer älter werdenden Bevölkerung zu bewahren.

Mit Hilfe dieser Studie sollten Therapieoptionen für die postmenopausale Sarkopenie eruiert werden. Dabei sollte geklärt werden, in wie weit sich die postmenopausale Skelettmuskelstruktur durch eine Behandlung mit den selektiven Lipoxygenasehemmern Baicalein und Zileuton, verändert und sie gegebenenfalls verbessert.

Baicalein und Zileuton hemmen die Lipoxygenase und verhindern so die Bildung von Leukotriene, die Entzündungsfaktoren im Körper. Lipoxygenasehemmer könnten eine positive Wirkung auf entzündliche Vorgänge im Körper haben, wie der Sarkopenie und/oder Osteoporose, die bedeutende Folgen bei älteren Menschen sowie als auch bei postmenopausalen Frauen haben. Unsere vorherigen Studien mit Baicalein zeigten bereits positive Effekte auf die Kapillarisation der Muskulatur der Ratte. Des Weiteren konnte in diesen eruiert werden, dass sowohl Baicalein als auch Zileuton den Knochen der osteoporotischen Ratten verbessert.

Der Effekt der Lipoxygenaseinhibitoren Baicalein und Zileuton wird hierzu an dem etablierten Ovariectomie-Modell der Ratte evaluiert. Es handelt sich um weibliche Sprague-Dawley Ratten, die im Alter von zwölf Wochen ovariectomiert (OVX) wurden. Die Ratten wurden in fünf Versuchsgruppen untergliedert, einer Kontrollgruppe ohne Ovariectomie (Non-OVX), eine Gruppe mit Ovariectomie ohne weitere Therapie (OVX) und drei weitere ovariectomierte Gruppen, die jeweils sojafreies Futter angereichert mit Baicalein (10 mg/kg Körpergewicht (KG)), Zileuton (10 mg/kg KG) oder Baicalein (10 mg/kg KG) plus Zileuton (10 mg/kg KG) erhielten. Die Behandlungen wurden über 13 Wochen durchgeführt. Daraufhin wurde der rechte oder linke Musculus (M.) gastrocnemius, M. soleus und M. longissimus entnommen.

Im Weiteren folgten die histologischen Auswertungen mit Hilfe einer Amylase-Enzymfärbung und einer ATPase-Färbung. Von den Muskelfasertypen I und II wurden schließlich der Durchmesser, die Fläche und dies in Bezug auf das Körper- bzw. Muskelgewicht bestimmt. Zudem wurde die Kapillaranzahl pro Faser ermittelt und die Typ-I- zu Typ-II-Faserverteilung im M. longissimus. Ferner wurde eine Serumanalyse der Kreatinkinase durchgeführt, sowie das Körper-,

Muskel- und Uterusgewicht und die Futteraufnahme der Ratten analysiert. Die statistische Analyse wurde mittels on-way ANOVA und Tukey-test, $p < 0,05$ durchgeführt.

Die kombinierte Therapie beider Inhibitoren, Baicalein und Zileuton konnte die Kapillarisation signifikant im Vergleich zur Non-OVX und OVX-Gruppe steigern. Die alleinige Therapie mit Baicalein bzw. Zileuton erbrachte auch eine gesteigerte Kapillarisation, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß.

Auf die Muskelfasergröße haben beide Lipoxigenasehemmer weniger Effekte gezeigt. Die Auswertung der Muskelfaserdurchmesser und der Fläche ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Dies zeigte sich erst in Relation zum Körpergewicht.

Die Ovariectomie führte zu einer signifikanten Gewichtsabnahme der Uteri und zu einer leichten, aber nicht signifikanten Muskelgewichtsabnahme im Vergleich zu den Non-OVX. Durch die Ovariectomie kam es zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Ratten und einer insgesamt gesteigerten Futteraufnahme verglichen mit den Non-OVX. Die Therapien mit den Inhibitoren beeinflussten diese Divergenzen nicht weiter. Der Kreatinkinasespiegel unterschied sich zwischen den Gruppen nicht.

Beide Substanzen wirken sich insgesamt positiv auf die beide Systeme Muskulatur als auch auf die Knochen aus.

Dies sind wichtige Faktoren für die Therapie, da sich die Muskulatur und das Knochenskelett gegenseitig beeinflussen und sich komplementär stärken aber ebenfalls schwächen (Saul et al. 2016; Saul D. et al. 2017b). Deswegen ist es wichtig, die Sarkopenie und die Osteoporose zusammen zu therapieren. Die beiden Lipoxigenasehemmer können unterstützende Effekte bewirken, die der Muskel- und Knochenstärkung, sowie deren Erhaltung dienen. Aus diesem Grund könnten sie älteren Patienten mit einer postmenopausalen Sarkopenie und Osteoporose eventuell helfen.

Die genauen Wirkungsmechanismen beider Lipoxigenasehemmer auf die Kapillarisation und Faserdicke der Muskulatur sollten in weiteren Studien untersucht werden. Auch sind weitere Analysen über ihre Effekte auf molekularer Ebene der Muskulatur zu empfehlen, sowie ihrer eigentlichen Auswirkung auf die Muskelkraft.

6 Anhang

Tabelle A1: Gewichte der Tiere zu Versuchsbeginn, nach Osteotomie und zum Versuchsende

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
Versuchsbeginn M (g)	308,9	326,6 *	323,1	320,7	323,3
SD	13,83	14,68	11,59	16,19	17,54
Osteotomie M (g)	336,3	427 ***	434,8 ***	434,1 ***	417,7 ***
SD	22,31	24,7	21,85	24,84	51,93
Versuchsende M (g)	368	467,4 ***	467,1 ***	450,5 ***	457,5 ***
SD	21,26	37,21	23,07	26,14	48,51

* signifikant zu Non-OVX ($p < 0,05$); ***höchstsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,001$)

Tabelle A2: M. soleus-Gewicht zu Versuchsende

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (g)	0,21	0,18	0,2	0,19	0,18
SD	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A3: M. gastrocnemius-Gewicht zu Versuchsende

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (g)	2,32	2,43	2,63	2,5	2,4
SD	0,47	0,34	0,25	0,22	0,22

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A4: Uterus-Gewicht zu Versuchsende

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (g)	0,57	0,099 ***	0,11 ***	0,09 ***	0,085 ***
SD	0,12	0,025	0,023	0,03	0,03

***höchstsignifikant zu NON-OVX ($p < 0,001$)

Tabelle A5:9 Futteraufnahme der Ratten in Futter mg/Tier/Tag

Versuchs- wochen	Kenn- zahl	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
1	M SD Tukey	18,25 1,64	18,24 0,87	18,71 3,5	16,52 2,29	19,3 1,65
2	M SD Tukey	19,85 1,43	24,95 1,15 *	26,3 1,44 *	25,7 0,38 *	26,88 1,64 *
3	M SD Tukey	20,15 1,18	27,01 0,47 *	28,1 3,15 *	27,66 0,78 *	28,05 2,09 *
4	M SD Tukey	22,16 2,07	25,63 3,65	28,53 2,55 *	28,37 1,23 *	28,76 2,5 *
5	M SD Tukey	21,71 0,78	27,94 0,51 *	27,24 2,08 *	26,89 1,53 *	26,87 1,87 *
6	M SD Tukey	21,74 1,41	26,87 0,3 *	27,25 1,56 *	26,7 1,35 *	27,55 2,56 *
7	M SD Tukey	20,88 1,81	25,63 1,04 *	26,02 0,78 *	26,1 1,09 *	26,17 2,45 *
8	M SD Tukey	21,89 1,42	25,51 0,77 *	25,59 1,43 *	25,43 0,68 *	25,54 1,87 *
10	M SD Tukey	18,02 0,33	21,93 7,06	18,16 0,79	18,82 2,33	17,14 2,32
11	M SD Tukey	20,09 1,7	22,68 4,05	21,79 0,9	21,2 1,54	21,13 1,75
12	M SD Tukey	21,93 0,71	24,23 3,8	24,66 1,33	25,45 2,2	24,04 4,21
13	M SD Tukey	21,86 0,56	26,71 1,62	24,8 1,65	25,45 2,2	25,57 1,99

* *signifikant zu Non-Ovx (p < 0,05)*

Tabelle A6: Dosis der Lipoxygenasehemmer per kg BW

Versuchs- wochen	Kenn- zahl	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
1	M	10,14	9,0	10,45
	SD	1,9	1,25	0,89
	Tukey			
2	M	12,85	12,56	12,96
	SD	0,7	0,19	0,79
	Tukey			
3	M	11,85	12,19	12,33
	SD	1,33	0,34	0,92
	Tukey			
4	M	12,06	12,05	12,21
	SD	1,08	0,52	1,06
	Tukey			
5	M	11,3	11,23	11,2
	SD	0,86	0,64	0,79
	Tukey			
6	M	11,04	10,97	11,19
	SD	0,63	0,55	1,04
	Tukey			
7	M	10,21	10,35	10,36
	SD	0,31	0,43	0,97
	Tukey			
8	M	9,95	10,0	10,11
	SD	0,56	0,27	0,74
	Tukey			
10	M	7,43	7,99	7,16
	SD	0,32	0,99	0,97
	Tukey			
11	M	8,59	8,77	8,62
	SD	0,35	0,64	0,71
	Tukey			
12	M	9,5	10,19	9,41
	SD	0,51	0,88	1,65
	Tukey			
13	M	9,3	9,8	9,77
	SD	0,62	0,96	0,74
	Tukey			

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A7: Dosis per kg BW/Woche im Gesamtverlauf

Gruppe	Baicalein	Zileuton	Baic. +Zileu.
Gesamt M	10.35	10.43	10,48
Gesamt SD	1.69	1,52	1,81

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A8: Kapillare/mm² M. longissimus

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
Kapillaren/MF auf 0,5 mm² M	1,12	1,38	1,46	1,42	1,38
SD	0,25	0,21	0,27	0,24	0,26

nicht signifikant; p > 0.05 Tukey-test

Tabelle A9: Kapillare/mm² M. soleus

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
Kapillaren/MF auf 0,5 mm² M	1,57	1,81	1,57	1,59	1,71
SD	0,17	0,25	0,19	0,24	0,35

nicht signifikant; p > 0.05 Tukey-test

Tabelle A10: Kapillare/mm² M. gastrocnemius

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
Kapillaren/MF auf 0,5 mm² M	1,22 **	1,267 **	1,45	1,39	1,67
SD	0,13	0,14	0,25	0,26	0,32

*** hochsignifikant zu Baic.+Zileu. (p < 0,01)*

Tabelle A1110: M. longissimus: Muskelfaserdurchmesser in µm

	Fasertyp	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (µm)	Typ-I	56,64	56,84	54,46	59,1	54,55
SD		5,17	3,66	6,44	7,47	6,25
M (µm)	Typ-II	85,54	88,71	81,9	84,99	83,32
SD		7,98	5,89	10,53	5,37	8,74

nicht signifikant; p > 0.05 Tukey-test

Tabelle A1211: M. longissimus: Muskelfaserfläche in μm^2

	Fasertyp	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (μm^2)	Typ-I	2619	2606	2390	2818	2372
SD		475,3	346,1	585	774,2	518,5
M (μm^2)	Typ-II	5849	6248	5387	5725	5551
SD		1185	1001	1367	761	1151

Keine Signifikanzen; $p > 0,05$ Tukey-test

Tabelle A13: M. longissimus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g KG

	Fasertyp	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M ($\mu\text{m/g}$)	Typ-I	0,15	0,122 ***	0,12 ***	0,13 **	0,12 ***
SD		0,011	0,011	0,017	0,014	0,016
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-I	7,1	5,6	5,15 *	6,23	5,19 *
SD		1,05	0,785	1,385	1,51	1,21
M ($\mu\text{m/g}$)	Typ-II	0,23	0,19 ***	0,18 ***	0,19 ***	0,18 ***
SD		0,018	0,017	0,034	0,189	0,183
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-II	15,86	13,4	11,55 **	12,71	12,17 *
SD		2,64	2,03	2,95	1,6	2,77

** signifikant zu Non-OVX ($p < 0,05$); ** hochsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,01$); ***höchstsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,001$)*

Tabelle A14: Verhältnisse der Fasertypen im M. longissimus in % am Gesamtfaseranteil pro 1 mm^2

	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
Anteil Typ1 (%)	38,08	40,77	42,87	41,09	44,56
SD	5,68	4,62	4,5	6,73	7,78
Anteil Typ2 (%)	61,92	62,53	60,14	63,43	61,94
SD	5,68	4,62	4,49	6,73	7,78

nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test

Tabelle A1512: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser in μm

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (μm)	Typ-I	68,39	66,93	67,5	67,73	66,9
SD		3,75	7,85	4,45	4,74	2,32

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A16: M. soleus: Muskelfaserfläche in μm^2

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (μm^2)	Typ-I	3733	3604	3628	3665	3554
SD		412,8	909,1	487	532,9	240,9

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A1713: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche / g KG

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M ($\mu\text{m}/\text{g}$)	Typ-I	0,19	0,14 ***	0,145 ***	0,15 ***	0,15 ***
SD		0,017	0,018	0,008	0,012	0,017
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-I	10,19	7,72 **	7,76 **	8,07 *	7,85 **
SD		1,4	1,9	0,9	1,22	1,05

** signifikant zu Non-OVX ($p < 0,05$); **hochsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,01$); ***höchstsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,001$)*

Tabelle A1814: M. soleus: Muskelfaserdurchmesser und -fläche / g MG

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M ($\mu\text{m}/\text{g}$)	Typ-I	337,6	361,3	340,1	348,8	378,2
SD		26,36	61,13	49,15	32,82	30,81
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-I	18375	19291	18209	18766	20067
SD		1668	4417	2800	1981	1778

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

Tabelle A19: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser in μm

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (μm)	Typ-I	48,91	50,91	51,42	50,25	50,01
SD		7,82	5,67	4,04	5,79	5,43
M (μm)	Typ-II	71,84	76,42	77,17	73,29	72,78
SD		7,18	7,12	7,89	4,26	7,726

Keine Signifikanzen; $p > 0,05$ Tukey-test

Tabelle A20: M. gastrocnemius: Muskelfaserfläche in μm^2

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M (μm^2)	Typ-I	4153	4699	4790	4285	4098
SD		872,6	876,7	959,9	510,2	1009
M (μm^2)	Typ-II	1939	2094	2135	2017	2034
SD		628,9	426,9	320,6	479,3	427,4

nicht signifikant; $p > 0,05$ Tukey-test

Tabelle A21: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g KG

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M ($\mu\text{m}/\text{g}$)	Typ-I	0,13	0,12 *	0,11 *	0,112 *	0,111 *
SD		0,021	0,016	0,011	0,013	0,017
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-I	5,27	4,51	4,5	4,55	4,5
SD		1,65	1,0	0,78	1,05	1,06
M ($\mu\text{m}/\text{g}$)	Typ-II	0,196	0,164 *	0,17	0,16 **	0,161 **
SD		0,02	0,02	0,015	0,017	0,025
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-II	11,29	10,1	10,29	9,55	9,14
SD		2,25	1,97	2,14	1,33	2,73

** signifikant zu Non-OVX ($p < 0,05$); ** hochsignifikant zu Non-OVX ($p < 0,01$)*

Tabelle A22: M. gastrocnemius: Muskelfaserdurchmesser und -fläche /g MG

	Faser- typ	NON-OVX	OVX	Baicalein	Zileuton	Baic.+Zileu.
M ($\mu\text{m/g}$)	Typ-I	32,23	31,31	29,42	29,59	30,46
SD		3,25	4,59	1,79	3,313	3,705
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-I	850,7	854,1	799,2	827,8	850,5
SD		181,6	193	118,2	220,9	195,7
M	Typ-II	21,81	20,85	19,69	20,29	20,94
SD		2,33	3,35	1,84	3,095	2,76
M ($\mu\text{m}^2/\text{g}$)	Typ-II	32,23	31,31	29,42	29,59	30,46
SD		3,25	4,59	1,79	3,31	3,705

nicht signifikant; $p > 0.05$ Tukey-test

7 Literaturverzeichnis

Abueid L, Uslu Ü, Cumbul A, Ögünç AV, Ercan F, Alican İ (2017): Inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in a rat model of myocardial infarction. *Anatol J Cardiol* 17, 269–275

Ali S, Garcia JM (2014): Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options. *Gerontology* 60, 294–305

Andersen P (1975): Capillary density in skeletal muscle of Man. *Acta Physiol Scand* 95, 203–205

Ariano MA, Edgerton VR, Armstrong RB (1973): Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem* 21, 51–55

Aumüller G, Wolff W: *Anatomie: 208 Tabellen (Duale Reihe)*. 2., überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010

Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N (1994): Modèles animaux d'ostéoporose post-ménopausique. *Reprod Nutr Dev* 34, 221–236

Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD (1998): Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 147, 755–763

Bausero P, Ben-Mahdi M - H, Mazucattelli J - P, Bloy C, Perrot-Applanat M (2000): Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 279, H2033–H2042

Beaudart C, Rizzoli R, Bruyère O, Reginster J-Y, Biver E (2014): Sarcopenia: burden and challenges for public health. *Arch Public Health* 72, 45

Beehler BC, Sleph PG, Benmassaoud L, Grover GJ (2006): Reduction of Skeletal Muscle Atrophy by a Proteasome Inhibitor in a Rat Model of Denervation. *Exp Biol Med* 231, 335–341

Berger W, de Chandt MTM, Cairns CB (2007): Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract* 61, 663–676

Birkhäuser MH (1995): Osteoporose-Prophylaxe mit Östrogenen. *Osteoporose: Moderne Diagnostik - therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis* 47–52

Bohndorf K, Jorden N, Altenburger A (Hrsg.): *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Thieme, Stuttgart 2014

- Bollheimer LC, Buettner R, Pongratz G, Brunner-Ploss R, Hechtel C, Banas M, Singler K, Hamer OW, Stroszczyński C, Sieber CC, Fellner C (2012): Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology* 13, 609–620
- Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R: *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie: 47 Tabellen*. 2., aktualisierte und erw. Aufl.; Thieme, Stuttgart 2006
- Cadefau J, Casademont J, Grau JM, Fernández J, Balaguer A, Vernet M, Cussó R, Urbano-Márquez A (1990): Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. *Acta Physiol Scand* 140, 341–351
- Campbell SE, Febbraio MA (2001): Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E803-808
- Chalhoub D, Cawthon PM, Ensrud KE, Stefanick ML, Kado DM, Boudreau R, Greenspan S, Newman AB, Zmuda J, Orwoll ES et al. (2015): Risk of Nonspine Fractures in Older Adults with Sarcopenia, Low Bone Mass, or Both. *J Am Geriatr Soc* 63, 1733–1740
- Chen W-J, Liaw S-F, Lin C-C, Lin M-W, Chang F-T (2013): Effects of Zileuton on Airway Smooth Muscle Remodeling after Repeated Allergen Challenge in Brown Norway Rats. *Respiration* 86, 421–429
- Chen X, Wang S, Wu N, Sood S, Wang P, Jin Z, Beer DG, Giordano TJ, Lin Y, Shih WJ, et al. (2004): Overexpression of 5-Lipoxygenase in Rat and Human Esophageal Adenocarcinoma and Inhibitory Effects of Zileuton and Celecoxib on Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10, 6703–6709
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO (1992): Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. *J Gerontol* 47, B71-76
- Cornachione AS, Benedini-Elias PCO, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC (2011): Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats. *Acta Histochem Cytochem* 44, 43–50
- Croley AN, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Pendergast AM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP (2005): Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. *J Appl Physiol* 99, 1872–1879
- 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 diag-

nosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412–423

Daugaard JR, Richter EA (2001): Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand* 171, 267–276

Dickhuth H-H, Mayer F, Röcker K, Berg A: Sportmedizin für Ärzte: Lehrbuch auf der Grundlage des Weiterbildungssystems der Deutschen Gesellschaft für Sportmedizin und Prävention (DGSP); mit 109 Tabellen. Deutscher Ärzteverlag 2010

Diehl J: Sportmedizin: Grundlagen für körperliche Aktivität, Training und Präventivmedizin. 5., völlig neu bearb. und erw. Auflage.; Schattauer, Stuttgart 2009

Dörner K: Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen (Taschenlehrbuch). 7. vollst. überarb. Auflage 1704; Thieme, Stuttgart 2009

Edwards MH, Gregson CL, Patel HP, Jameson KA, Harvey NC, Sayer AA, Dennison EM, Cooper C (2013): Muscle size, strength, and physical performance and their associations with bone structure in the Hertfordshire Cohort Study. *J Bone Miner Res* 28, 2295–2304

Fels AO, Pawlowski NA, Cramer EB, King TK, Cohn ZA, Scott WA (1982): Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7866–7870

Fisher J. S., Kohrt WM, Brown M (2000): Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 88, 265–271

Folco G, Samuelsson B, Murphy RC: Novel inhibitors of leukotrienes (Progress in inflammation research). Birkhäuser, Basel 1999

Forsberg AM, Nilsson E, Werneman J, Bergström J, Hultman E (1991): Muscle composition in relation to age and sex. *Clin Sci* 81, 249–256

Frost HM (2003): Bone's mechanostat: A 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275A, 1081–1101

Gaire BP, Moon S-K, Kim H (2014): *Scutellaria baicalensis* in stroke management: nature's blessing in traditional Eastern medicine. *Chin J Integr Med* 20, 712–720

Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, et al. (2007): Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13, 89–94

- Gradinger R, Gollwitzer H (Hrsg.): *Ossäre Integration*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006
- Gregory CM, Vandenborne K, Castro MJ, Dudley GA (2003): Human and rat skeletal muscle adaptations to spinal cord injury. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appl* 28, 491–500
- Guo H, Liu D, Ma Y, Liu J, Wang Y, Du Z, Wang X, Shen J, Peng H (2009): Long-term baicalin administration ameliorates metabolic disorders and hepatic steatosis in rats given a high-fat diet. *Acta Pharmacol Sin* 30, 1505
- Guth L, Samaha FJ (1969): Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 25, 138–152
- Haizlip KM, Harrison BC, Leinwand LA (2015): Sex-Based Differences in Skeletal Muscle Kinetics and Fiber-Type Composition. *Physiology* 30, 30–39
- Hazard-County-Engineer OC-A& P Connexions Website; Deutsche Beschreibung durch: Schematische Darstellung des Aufbaus der menschlichen Skelettmuskulatur mit deutschsprachiger Beschriftung. 2015
- Heinrich PC, Müller M: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer-Lehrbuch). 9., vollständig überarbeitete Auflage; Springer, Berlin 2014
- Horák V (1983): A successive histochemical staining for succinate dehydrogenase and “reversed”-ATPase in a single section for the skeletal muscle fibre typing. *Histochemistry* 78, 545–553
- Huo YR, Suriyaarachchi P, Gomez F, Curcio CL, Boersma D, Gunawardene P, Demontiero O, Duque G (2015): Comprehensive nutritional status in sarco-osteoporotic older fallers. *J Nutr Health Aging* 19, 474–480
- Huovinen V, Ivaska KK, Kiviranta R, Bucci M, Lipponen H, Sandboge S, Raiko J, Eriksson JG, Parkkola R, Iozzo P, Nuutila P (2016): Bone mineral density is increased after a 16-week resistance training intervention in elderly women with decreased muscle strength. *Eur J Endocrinol* 175, 571–582
- Huppelsberg J, Walter K: *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4., aktualisierte Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2013
- Ivanova N, Aibast H, Gapeyeva H, Kums T, Märtson A, Pääsuke M (2011): Changes in hip muscle strength after proximal femoral fracture in elderly women. *Acta Kinesiol Univ Tartu* 17, 80–88

- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004): The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52, 80–85
- Jensen TE, Leutert R, Rasmussen ST, Mouatt JR, Christiansen MLB, Jensen BR, Richter EA (2012): EMG-normalised kinase activation during exercise is higher in human gastrocnemius compared to soleus muscle. *PloS One* 7, e31054
- Jung SR, Kim SH, Ahn NY, Kim KJ (2014): Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. *J Exerc Nutr Biochem* 18, 111–117
- Junqueira LC: *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie. Zweite, korrigierte Auflage*; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 1986
- 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* 23, 335
- Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15, 175–191
- Kieb M, Lorbach O, Engelhardt M (2010): Muskelverletzungen: Diagnostik und Behandlungen. *Orthop* 39, 1098–1107
- Kim JM, Lee S-U, Kim YS, Min YK, Kim SH (2008): Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. *J Cell Biochem* 104, 1906–1917
- Kim MH, Ryu SY, Bae MA, Choi J-S, Min YK, Kim SH (2008): Baicalein inhibits osteoclast differentiation and induces mature osteoclast apoptosis. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 46, 3375–3382
- Kling JH (2016): Einfluss des Lipoxygenaseinhibitors Baicalein in unterschiedlicher Dosierung auf den Skelettmuskel der ovariectomierten Ratte. *Med. Diss. Göttingen* 2016
- Kobori M, Yamamuro T (1989): Effects of Gonadectomy and Estrogen Administration on Rat Skeletal Muscle. *Clinical Orthopaedics* 243, 306–311

- 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* 201, 253–262
- Komrakova M, Hoffmann DB, Nuehnen V, Stueber H, Wassmann M, Wicke M, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2016): The Effect of Vibration Treatments Combined with Teriparatide or Strontium Ranelate on Bone Healing and Muscle in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 99, 408–422
- Korotkova M, Lundberg IE (2014): The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol* 10, 295–303
- Kwon Y-J, Lim H-J, Lee Y-J, Lee H-S, Linton JA, Lee JW, Kang H-T (2017): Associations between high-risk alcohol consumption and sarcopenia among postmenopausal women. *Menopause N Y N* 24, 1022–1027
- Lai M-Y, Hsiu S-L, Tsai S-Y, Hou Y-C, Chao P-DL (2003): Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats. *J Pharm Pharmacol* 55, 205–209
- Lapchak PA, Maher P, Schubert D, Zivin JA (2007): Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes. *Neuroscience* 150, 585–591
- Layec G, Hart CR, Trinity JD, Le Fur Y, Jeong E-K, Richardson RS (2015): Skeletal muscle work efficiency with age: the role of non-contractile processes. *Clin Sci Lond Engl 1979* 128, 213–223
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008): The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med* 58, 424–430
- Letzing H: Vibrationstraining und Osteoporose. *Diplom.de* 2014
- Li S, Tang J, Chen J, Zhang P, Wang T, Chen T, Yan B, Huang B, Wang L, Huang M, et al. (2015): Regulation of bone formation by baicalein via the mTORC1 pathway. *Drug Des Devel Ther* 9, 5169–5183
- Lightfoot AP, McCormick R, Nye GA, McArdle A (2014): Mechanisms of skeletal muscle ageing; avenues for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol* 16, 116–121
- Likar R, Bernatzky G, Pipam W, Janig H, Sadjak A: Lebensqualität im Alter: Therapie und Prophylaxe von Altersleiden. Springer-Verlag 2005

- Lindsey C, Brownbill RA, Bohannon RA, Ilich JZ (2005): Association of physical performance measures with bone mineral density in postmenopausal women. *Arch Phys Med Rehabil* 86, 1102–1107
- Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2015
- Maetzler W, Drey M, Jacobs AH (2015): Sarkopenie und Frailty in der Neurologie. *Nervenarzt* 86, 420–430
- Maltais M, Desroches J, Dionne I (2009): Changes in muscle mass and strength after menopause. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 9, 186–97
- McArdle A, Dillmann WH, Mestril R, Faulkner JA, Jackson MJ (2004): Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 18, 355–357
- 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* 25, 21–27
- Moline SW, Glenner, G.G. (1964): Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *J Histochem Cytochem* 12, 777–783
- Morley JE (2016): Pharmacologic Options for the Treatment of Sarcopenia. *Calcif Tissue Int* 98, 319–333
- Moulias R, Meaume S, Raynaud-Simon A (1999): Sarcopenia, hypermetabolism, and aging. *Z Für Gerontol Geriatr* 32, 425–432
- Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA, Davis TP (1980): A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *J Appl Physiol* 48, 479–486
- Olfert IM, Baum O, Hellsten Y, Egginton S (2016): Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 310, H326–H336
- Pergola C, Werz O (2010): 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent developments and patents. *Expert Opin Ther Pat* 20, 355–375
- Piccone CM, Brazeau GA, McCormick KM (2005): Effect of oestrogen on myofibre size and myosin expression in growing rats. *Exp Physiol* 90, 87–93
- Po LS, Chen Z, Tsang DSC, Leung LK (2002): Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells. *Cancer Lett* 187, 33–40

- Prior JC, Langsetmo L, Lentle BC, Berger C, Goltzman D, Kovacs CS, Kaiser SM, Adachi JD, Papaioannou A, Anastassiades T, et al. (2015): Ten-year incident osteoporosis-related fractures in the population-based Canadian Multicentre Osteoporosis Study — Comparing site and age-specific risks in women and men. *Bone* 71, 237–243
- Prior SJ, Goldberg AP, Ortmeier HK, Chin ER, Chen D, Blumenthal JB, Ryan AS (2015): Increased Skeletal Muscle Capillarization Independently Enhances Insulin Sensitivity in Older Adults After Exercise Training and Detraining. *Diabetes* 64, 3386–3395
- Qu Z, Andersen JL, Zhou S (1997): Visualisation of capillaries in human skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 107, 169–174
- Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2015): 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1851, 331–339
- Rechholtz CHM (2017): Der Einfluss von vertikaler Ganzkörpervibration, Alendronat und 8-Prenylningenin auf die Muskulatur der ovariectomierten Ratte. Med. Diss. Göttingen 2017
- Riener R: Neurophysiologische und biomechanische Modellierung zur Entwicklung geregelter Neuroprothesen. Herbert Utz Verlag 1997
- Rietbrock N, Staib AH, Loew D: Klinische Pharmakologie: Arzneitherapie. Springer-Verlag 2013
- Rosalki SB (1998): Low Serum Creatine Kinase Activity. *Clin Chem* 44, 905–905
- Ross A, Leveritt M (2001): Long-Term Metabolic and Skeletal Muscle Adaptations to Short-Sprint Training. *Sports Med* 31, 1063–1082
- Rossi A, Pergola C, Koeberle A, Hoffmann M, Dehm F, Bramanti P, Cuzzocrea S, Werz O, Sautebin L (2010): The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. *Br J Pharmacol* 161, 555–570
- Saul D, Kling JH, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Komrakova M, Wicke M, Menger B, Sehmisch S (2016): Effect of the Lipoxygenase Inhibitor Baicalein on Muscles in Ovariectomized Rats. *J Nutr Metab* 2016
- Saul D, Harlas B, Ahrabi A, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Wassmann M, Wigger R, Böker KO, Sehmisch S, Komrakova M (2017a): Effect of Strontium Ranelate on the Muscle and Vertebrae of Ovariectomized Rats. *Calcified Tissue International* 102, 705–719

- Saul D, Gleitz S, Nguyen HH, Kosinsky RL, Schmisch S, Hoffmann DB, Wassmann M, Menger B, Komrakova M (2017b): Effect of the lipoxygenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. *Bone* 101, 134–144
- Saul D, Ninkovic M, Komrakova M, Wolff L, Simka P, Gasimov T, Menger B, Hoffmann DB, Rohde V, Schmisch S (2017): Effect of zileuton on osteoporotic bone and its healing, expression of bone, and brain genes in rats. *Journal of Applied Physiology* 124, 118–130
- Saul D, Weber M, Zimmermann MH, Kosinsky RL, Hoffmann DB, Menger B, Taudien S, Lehmann W, Komrakova M, Schmisch S (2019): Effect of the lipoxygenase inhibitor baicalein on bone tissue and bone healing in ovariectomized rats. *Nutr Metab* 16, 4
- Schmidt RF, Lang F: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*; (Springer-Lehrbuch). 30., neu bearb. und aktualisierte Aufl.; Springer Medizin, Heidelberg 2007
- Schröder JM: *Pathologie der Muskulatur: mit 18 Tabellen*. Springer, Berlin 1982
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U: *Prometheus - LernAtlas der Anatomie: allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*; 182 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl.; Thieme, Stuttgart 2007
- Schwartz S: *Psychoactive Herbs in Veterinary Behavior Medicine*. John Wiley & Sons 2008
- Schwartz-Giblin S, Rosello L, Pfaff DW (1983): A histochemical study of lateral longissimus muscle in rat. *Exp Neurol* 79, 497–518
- Senf SM (2013): Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. *Front Physiol* 4, 330
- Silbernagl S, Despopoulos A: *Taschenatlas Physiologie*. 7., vollst. überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart 2007
- Sjöblom S, Suuronen J, Rikkonen T, Honkanen R, Kröger H, Sirola J (2013a): Relationship between postmenopausal osteoporosis and the components of clinical sarcopenia. *Maturitas* 75, 175–180
- Smolinske SC, Hall AH, Vandenberg SA, Spoerke DG, McBride PV (1990): Toxic Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Overdose: An Overview of Recent Evidence on Clinical Effects and Dose-Response Relationships. *Drug Saf* 5, 252–274
- Sobotta J, Welsch U: *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie: mit 823 Abbildungen und 21 Tabellen*. 2., völlig überarbeitete Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2006

- Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Schmisch S, Tezval M, Utesch C, Mangal O, Zimmer S, et al. (2010): Musculoskeletal Response to Whole-Body Vibration During Fracture Healing in Intact and Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 87, 168–180
- Syddall HE, Aihie Sayer A, Dennison EM, Martin HJ, Barker DJP, Cooper C (2005): Cohort Profile: The Hertfordshire Cohort Study. *Int J Epidemiol* 34, 1234–1242
- Tagliaferri C, Salles J, Landrier J-F, Giraudet C, Patrac V, Lebecque P, Davicco M-J, Chanet A, Pouyet C, Dhaussy A, et al. (2015): Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *Eur J Nutr* 54, 1139–1149
- Tian S, He G, Song J, Wang S, Xin W, Zhang D, Du G (2012): Pharmacokinetic study of baicalin after oral administration in monkeys. *Fitoterapia* 83, 532–540
- Toigo M: Ein Bouquet an zellulärer Diversität. In: Toigo M (Hrsg.): *MuskelRevolution: Konzepte und Rezepte zum Muskel- und Kraftaufbau*. 1. Auflage; Springer, Berlin, Heidelberg 2015, 45–57
- 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* 280, E496–E501
- Trautmann LM (2014): Einfluss der vertikalen Ganzkörpervibration verschiedener Frequenzen auf die Frakturheilung der osteoporotischen Ratte. Med. Diss. Göttingen 2014
- Wade SW, Strader C, Fitzpatrick LA, Anthony MS, O'Malley CD (2014): Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos* 9, 182
- Weber M (2019): Der Einfluss von Baicalin auf die metaphysäre Frakturheilung im Osteoporosemodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2019
- Xi Y-L, Li H-X, Chen C, Liu Y-Q, Lv H-M, Dong S-Q, Luo E-F, Gu M-B, Liu H (2016): Baicalin attenuates high fat diet-induced insulin resistance and ectopic fat storage in skeletal muscle, through modulating the protein kinase B/Glycogen synthase kinase 3 beta pathway. *Chin J Nat Med* 14, 48–55
- Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie (1972): Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standardisation of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids. Experimental basis for the optimized standard conditions. *Z Klin Chem Klin Biochem* 10, 255–260

Zhang L, Li C, Lin G, Krajcsi P, Zuo Z (2011): Hepatic Metabolism and Disposition of Baicalein via the Coupling of Conjugation Enzymes and Transporters In Vitro and In Vivo Evidences. *AAPS J* 13

Zimmermann MH (2018): Einfluss der selektiven Inhibition proinflammatorischer Lipxygenase auf den osteoporotischen Knochen im Ovariectommodell der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2018

Murphy. <https://de.usembassy.gov/de/demografischer-wandel-in-den-vereinigten-staaten-der-weg-zu-einer-vollkommeneren-union/>; Zugriff am 15.05.2019

National Center for Health Statistics. <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/nh3rrm.htm>; Zugriff am 15.05.2019

Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281605>; Zugriff am 17.01.2018

Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60490>; Zugriff am 17.01.2018

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lehmann als Abteilungsleiter der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie für die Ermöglichung meiner Arbeit danken.

Einen großen Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Sehmisch. Zum einen für die Annahme als aber auch für die Unterstützung zu meiner Dissertation. Zum anderen danke ich ihm für sein zielgerichtetes Bemühen beim Korrigieren, den guten Anmerkungen und Verbesserungen.

Ebenso gilt mein Dank den gesamten Mitarbeiterinnen im Labor der Unfallchirurgie, die mich insgesamt alle hervorragend unterstützt haben. Im Besonderen danke ich Dr. rer. nat. Marina Komrakova für die wirklich enge und stets zügige Betreuung, sei es bei Hilfestellungen, Fragen oder dem Korrekturlesen. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen meine Doktorarbeit so beenden zu können.

Auch zu nennen ist hier die Hilfe der ehemaligen Mitarbeiterin Frau Anette Witt, die mit ihrer permanenten Ansprechbarkeit und Erfahrung mir zur Verfügung stand. Großer Dank gilt auch Frau Ramona Castro-Machguth. Sie half mir insbesondere beim Färben der Schnitte und ihrer Laborkenntnisse.

Ich danke weiterhin Frau Ruth Wigger, Mitarbeiterin im Institut für Nutztierwissenschaften, die mir freundlich beistand bei der Verwendung des Mikrotoms zur Herstellung der Muskelschnitte, sowie mich später in die Mikroskopiersoftware einwies.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Schilling, der mir sehr bei der Veröffentlichung des Abstrakts zu meiner Dissertation auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, geholfen hat.

Allen genannten Personen habe ich es zu verdanken, dass ich meine Arbeit erfolgreich abschließen konnte.

Lebenslauf

Am 03. Oktober 1993 wurde ich, Ilka Meyer, als Tochter von Swantje Höddels-Meyer und Jens Meyer in Wittingen geboren. Ich wuchs in Knesebeck (Niedersachsen, LK Gifhorn) auf, wo ich ab 2000 bis 2004 die Grundschule besuchte. Danach wechselte ich auf das Gymnasium Hankensbüttel, wo ich schließlich im Sommer 2012 mein Abitur machte.

Schon in der Schule interessierte ich mich sehr für die Medizin, sodass ich mich für ein Propädeutikum im Bereich der Humanmedizin an der Young Business School Heidelberg, entschied. Hier wurden mir bis zum Abitur 2012 die verschiedenen Themen der Humanmedizin näher vermittelt. Insgesamt verstärkte dies meinen Wunsch Medizin zu studieren.

Im Anschluss daran absolvierte ich ein zweimonatiges Pflegepraktikum in der Helios Klinik Wittingen. Um noch ein wenig andere Erfahrungen zu sammeln, ging ich für einige Monate nach Kapstadt (Südafrika). Dort arbeitete ich freiwillig in einem Kindergarten in einem Township in der Nähe von Kapstadt. Des Weiteren half ich bei Freunden auf ihrer Weintrauben-Farm.

Im Sommer 2013 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Durch mein großes Interesse an der Chirurgie, entschied ich mich, meine erste Famulatur in der Orthopädie im Klinikum Göttingen (März 2016) zu machen. Die nächste Famulatur absolvierte ich in der Abteilung der Plastischen, Ästhetischen und Rekonstruktiven Chirurgie im Agalepsion Krankenhaus Neu-Bethlehem Göttingen (August 2016). Danach folgte eine Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Frau Dr. Blake in Stellenbosch (Südafrika) und in der Praxis für Kinder- und Jugendmedizin Frau Dr. Brunnert (März 2018).

Ab September 2016 habe ich studienbegleitend mit der Anfertigung meiner Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stephan Sehmisch in der Abteilung Unfallchirurgie, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie begonnen.

Auch während meines praktischen Jahres legte ich einen großen Fokus auf die Chirurgie. Mein erstes Tertial war in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie, das chirurgische Tertial absolvierte ich in der Unfallchirurgie und Orthopädie im Klinikum Göttingen.

Das Studium der Humanmedizin habe ich im Juni 2020 erfolgreich abgeschlossen.

Seit August 2020 arbeite ich als Assistenzärztin in der Viszeral- Gefäß- und Tumorchirurgie am Krankenhaus Merheim, Köln.