

Aus der

Medizinischen Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**Komplex-I-Aktivität und mitochondriale Dysfunktion:
Zusammenhänge mit der Muskelfunktion bei Sarkopenie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Anna Baber

aus

Westerland auf Sylt

Jahr

2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Drey
Mitberichterstatter: PD Dr. Johann Schredelseker
Prof. Dr. Thomas Hellmuth Klopstock

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Peter Meinke

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2025

***Für meine Eltern Gregory und Ulrike,
in Liebe und tiefer Dankbarkeit.
Und für meinen Freund Philipp.***

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	5
Formelverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Muskelphysiologie und altersbedingte Veränderungen	8
1.1.1 Allgemeine Muskelphysiologie.....	8
1.1.2 Aufbau, Funktion und Metabolismus der Skelettmuskulatur.....	8
1.1.3 Energiegewinnung durch die Mitochondrien im Skelettmuskel.....	9
1.2 Sarkopenie.....	14
1.2.1 Definition der Sarkopenie.....	14
1.2.2 Diagnostik und Diagnosekriterien der Sarkopenie.....	15
1.3 Risikofaktoren und Pathophysiologie der Sarkopenie	15
1.3.1 Muskelveränderungen im Alter und Sarkopenie	15
1.3.2 Veränderung des Metabolismus im Alter und Sarkopenie.....	17
1.3.3 Proinflammatorische Prozesse und endokrinologische Veränderungen im Alter und bei Sarkopenie	18
1.3.4 Lebensstiländerung und Mangelzustände im Alter und Sarkopenie.....	19
1.3.5 Mitochondriale Veränderungen im Alter und Sarkopenie	20
2 Zielsetzung	23
3 Methoden	25
3.1 Patientenkollektiv	25
3.1.1 Rekrutierungsprozess	25
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	25
3.2 Sarkopeniediagnostik.....	26
3.2.1 Bestimmung der Handkraft	26
3.2.2 Messung der Muskelmasse mittels Bioimpedanzanalyse.....	26
3.2.3 Sarkopeniediagnose und Einteilung in Sarkopeniegrade	27
3.3 Gewinnung des Muskelgewebes	27
3.3.1 Entnahme und Präparation der Muskelbiopsie	27
3.4 Zellbiologische Methoden	28
3.4.1 Anlage der Primärzellkultur.....	28
3.4.2 Passagieren der Zellkultur	29
3.4.3 Kryokonservierung der Zellkultur	29

3.4.4	Auftauen der kryokonservierten Zellkultur	30
3.4.5	Bestimmung der Zellzahl und Aussaat der Zellen	30
3.5	Metabolische Untersuchungen	31
3.5.1	Metabolische Analysen mittels Seahorse XFp Analyzer.....	31
3.5.2	Messablauf der mitochondrialen Respiration.....	32
3.5.3	Messablauf der glykolytischen Aktivität	33
3.5.4	Vorbereitung der Zellen und des Sensoraufsatzes.....	35
3.5.5	Bestimmung der mitochondrialen Respiration der Zellen	35
3.5.6	Bestimmung der glykolytischen Aktivität der Zellen.....	36
3.5.7	Nachbereitung der Zellen und Auswertung der Seahorse-Messungen	37
3.6	Messung der mitochondrialen Enzymaktivität.....	37
3.6.1	Herstellung des Muskelhomogenats.....	37
3.6.2	Bestimmung von NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I).....	38
3.6.3	Bestimmung von Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex II/III) 38	
3.6.4	Bestimmung von Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV).....	39
3.6.5	Bestimmung der Citratsynthase.....	39
3.7	Serumanalysen	39
3.7.1	Bestimmung von Ferritin, Transferrinsättigung und sTfrR	40
3.7.2	Bestimmung der Citratzyklusmetabolite.....	40
3.7.3	Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin D, Calciferol	41
3.8	Statistische Analysen.....	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Patientenkollektiv	43
4.1.1	Patientencharakteristika und Einteilung in Sarkopeniegrade.....	43
4.2	Aktivität der Atmungskettenenzyme.....	45
4.3	Metabolische Analysen	47
4.3.1	Ergebnisse des Mito-Stresstests	48
4.3.2	Ergebnisse des Glyko-Stresstests	50
4.3.3	Serumanalysen	52
4.3.4	Ergebnisse der Vitamin D Analysen	52
4.3.5	Ergebnisse für Ferritin, Transferrinsättigung und sTfrR.....	53
4.3.6	Ergebnisse der Citratzyklusmetabolite.....	54
5	Diskussion	57
5.1	Z-Score und Sarkopeniegrade.....	57
5.2	Verminderte mitochondriale Atmungskettenenzymaktivität	58
5.3	Stoffwechseleränderungen in sarkopenen Myoblastenzellkulturen	63

5.4	Diskussion multisystemischer und externer Einflussfaktoren auf Sarkopenie	67
5.4.1	Diskussion der Citratzyklusmetabolite	67
5.4.2	Diskussion der Eisenwerte.....	70
5.4.3	Einfluss von Vitamin D auf Sarkopenie	74
5.5	Diskussion der Methodik und Limitationen	76
6	Schlussfolgerung und Ausblick	79
	Literaturverzeichnis:	81
	Anhang	93
	Danksagung	93
	Eidesstattliche Erklärung	94
	Publikationsliste	95

Zusammenfassung

Das Krankheitsbild Sarkopenie beschreibt den Verlust von Muskelmasse, einhergehend mit einer Reduktion der Muskelkraft und Muskelfunktion, wovon insbesondere die ältere Bevölkerungsgruppe betroffen ist. Durch den Rückgang der körperlichen Leistungsfähigkeit sind die betroffenen Personen stark in ihrer Lebensqualität eingeschränkt und weisen ein erhöhtes Sturzrisiko, mit höheren Frakturnraten und einer erhöhten Mortalität auf. Die Diagnose Sarkopenie erhöht das Risiko eines Krankenhausaufenthalts und geht mit höheren Pflegekosten einher. Dadurch stellt Sarkopenie eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Es ist daher nicht nur von medizinischem, sondern auch von ökonomischem Interesse, ein besseres Verständnis für die zugrundeliegende Pathologie zu entwickeln, um den Beginn und Krankheitsprozess durch bessere Prävention, Diagnostik und Therapie zu verzögern, oder bestenfalls aufzuhalten.

Dem geriatrischen Syndrom Sarkopenie liegen vielfältige und komplexe Pathomechanismen zugrunde, welche bisher nicht abschließend geklärt sind. Zu den Ursachen werden neben altersassoziierten Lebensstiländerungen wie Bewegungsmangel und Mangelernährung auch hormonelle Veränderungen, proinflammatorische Prozesse und die Degeneration neuromuskulärer Verbindungen gezählt. Mitochondrien spielen als „Kraftwerke“ der Zelle eine zentrale Rolle im Muskelstoffwechsel und sind essenziell für die Energieproduktion und die allgemeine Aufrechterhaltung von Zellfunktionen. Mitochondriale Dysfunktionen werden mit dem Alterungsprozess assoziiert und ebenfalls als Ursache der progressiven Degeneration des Muskelgewebes im Rahmen der Sarkopenie diskutiert. Die genauen Zusammenhänge mitochondrialer Veränderungen und Sarkopenie sind jedoch noch unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher im Rahmen einer Querschnittsstudie an geriatrischen, sarkopenen Patienten durch umfassende Analysen sowohl mitochondriale Dysfunktionen als auch mögliche Ursachen für eine Dysregulation der Mitochondrien zu identifizieren. Hierfür wurden Muskelbiopsien von insgesamt 31 Probanden im Alter über 70 Jahren entnommen, welche aufgrund einer proximalen Femurfraktur eine operative Versorgung mittels Osteosynthese oder Endoprothesenimplantation im Klinikum Großhadern der LMU erhielten. Die Probanden wurden gemäß den Kriterien der EWGSOP2 (European Working Group on Sarcopenia in Older People) in eine nicht-, prä- und sarkopene Gruppe unterteilt und jedem Patienten wurde ein Z-Score zur Einschätzung des Schweregrads der Sarkopenie zugeordnet. Aus den Muskelgewebeproben wurde Muskelhomogenat hergestellt, um die Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenenzyme zu untersuchen. Zusätzlich wurden aus denselben Muskelge-

webeproben primäre Myoblastenkulturen angelegt und Stoffwechselanalysen hinsichtlich der Glykolyse und mitochondrialen Respiration in Echtzeit durchgeführt. Außerdem wurden die Serumproben der Studienteilnehmer auf veränderte Serumkonzentrationen der Metabolite des Citratzyklus, Vitamin D und des Eisenstoffwechsels untersucht.

Es zeigte sich für Komplex I der mitochondrialen Atmungskettenenzyme eine deutliche Aktivitätsminderung bei den sarkopenen Probanden. Die Aktivität von Komplex II und III folgten diesem Trend, waren aber weniger ausgeprägt und blieb für die Aktivität von Komplex IV aus. Sowohl für die mitochondriale Respiration als auch für die Glykolyse zeigte sich eine abnehmende Tendenz mit zunehmendem Schweregrad der Sarkopenie, jedoch konnten keine signifikanten Zusammenhänge für Sarkopenie und die Stoffwechselanalysen der primären Myoblastenkulturen festgestellt werden. Die Serumanalysen zeigten für die sarkopenen Probanden einen signifikanten Anstieg für die Metabolite Citrat, Succinat, Malat und Fumarat des Citratzyklus. Zudem waren signifikant erniedrigte Vitamin-D-Serumspiegel mit einem zunehmendem Schweregrad der Sarkopenie assoziiert und anhand der Eisenparameter konnte auf einen gestörten Eisenstoffwechsel im Rahmen der Sarkopenie geschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise auf eine Reduktion der Komplex-I-Aktivität bei Sarkopenie. Aus der Aktivitätsminderung der NADH-Oxidoreduktase (Komplex I) resultiert vermutlich ein Missverhältnis von NADH und NAD⁺ in den Mitochondrien. NAD⁺ gilt als ein wichtiger Cofaktor zur Regulation einiger Stoffwechselwege, wie unter anderem des Citratzyklus. Eine Akkumulation von NADH infolge einer verminderten Aktivität von Komplex I bewirkt vermutlich eine Inhibition des Citratzyklus, worauf der signifikante Anstieg der Citratzyklusmetabolite Citrat, Succinat, Malat und Fumarat im Blutserum hinweisen könnte. Diese Konstellation führt im weiteren Verlauf zu einer eingeschränkten oxidativen Phosphorylierung und damit einhergehend zu einer reduzierten ATP-Synthese. Die unzureichende Energieproduktion trägt möglicherweise zu einem Verlust der Muskelfunktion bei Sarkopenie bei. Da sowohl Vitamin D als auch Eisen essenziell für eine adäquate mitochondriale Funktion sind und insbesondere einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität von Komplex I haben, wird vermutet, dass die signifikant erniedrigten Vitamin-D-Serumspiegel und der gestörte Eisenstoffwechsel zur Aktivitätsminderung von Komplex I beitragen könnten.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit also vermuten, dass externe Faktoren, wie ein Vitamin D Mangel und ein gestörter Eisenstoffwechsel die Ursache einer verminderten Komplex I Aktivität sind, welche zu einer Inhibition des Citratzyklus führt und infolgedessen zu einer mitochondrialen Dysfunktion, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Muskelfunktion im Rahmen der Sarkopenie kommt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische, vereinfachte Darstellung eines Mitochondriums mit Citratzyklus und Atmungskette	14
Abbildung 2 Risikofaktoren und Pathomechanismen der Sarkopenie, nachempfunden nach Picca et al. (139).....	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Seahorse XFp Analyzer Aufbaus und dessen Messprinzip, exemplarisch für zwei Zellkammern. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent.).....	32
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messablaufs der mitochondrialen Respiration. Gemessen wird die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) in pmol/min gegen die Zeit in min. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent).....	33
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Messablaufs der glykolytischen Aktivität. Gemessen wird die extrazelluläre Azidifikationsrate (ECAR) in mpH/min gegen die Zeit in min. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent)	35
Abbildung 6: Körpergewicht [kg] in Korrelation mit dem Z-Score	45
Abbildung 7: BMI [kg/m ²] in Korrelation mit dem Z-Score	45
Abbildung 8: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score	46
Abbildung 9: Komplex II/III (Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score.....	46
Abbildung 10: Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score	47
Abbildung 11: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit dem Z-Score	48
Abbildung 12: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit der Handkraft [kg]	49
Abbildung 13: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit SMI [kg/m ²]	49
Abbildung 14: Boxplot der basalen Respiration [pmol/min] aufgetragen gegen Geschlecht.....	50
Abbildung 15: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation mit dem Z-Score	50
Abbildung 16: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation zur Handkraft [kg]	51
Abbildung 17: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation mit SMI [kg/m ²]	51
Abbildung 18: Boxplot der Glykolyse [mpH/min] aufgetragen gegen Geschlecht	51
Abbildung 19: Vitamin D [ng/ml] in Korrelation mit dem Z-Score	53

Abbildung 20: Ferritin [$\mu\text{g/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score.....	53
Abbildung 21: Löslicher Transferrinrezeptor (sTfR) [mg/l] in Korrelation mit dem Z-Score	54
Abbildung 22: Transferrinsättigung [%] in Korrelation mit dem Z-Score.....	54
Abbildung 23: Fumarat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score.....	55
Abbildung 24: Succinat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score	55
Abbildung 25: Malat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score	55
Abbildung 26: Citrat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score.....	56
Abbildung 27: Alpha-Ketoglutarat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Sore	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika der Gesamtkohorte mit Mittelwert (\pm Standardabweichung) und geschlechtergetrennt; p-Werte berechnet mit t-Test für unabhängige Stichproben.....	43
Tabelle 2: Patientencharakteristika mit Mittelwert (\pm Standardabweichung) geschlechtergetrennt und unterteilt nach Sarkopeniegraden	44
Tabelle 3: Mittelwerte (\pm Standardabweichung) des Glyko-Stresstests [mpH/min] und Mito-Stresstest [pmol/min] unterteilt in Sarkopeniegrade	48
Tabelle 4: Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Serumanalysen unterteilt nach Sarkopeniegraden und Angabe der verfügbaren Probenanzahl (n).....	52

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Appendikulären Skelettmuskelmasse (ASM).....	26
Formel 2: Berechnung des Resistive Index.....	26
Formel 3: Berechnung des Skelettmuskelmassenindex (SMI).....	27
Formel 4: Berechnung des Z-Scores.....	27
Formel 5 Berechnung der Zellkonzentration	30
Formel 6 Berechnung des Testvolumens.....	30

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃
AcetylCoA	Acetyl Coenzym A
ASM	Appendikuläre Skelettmuskelmasse
ATP	Adenosintriphosphat
BIA	Bioimpedanzanalyse
BMI	Body-Mass-Index
CT	Computertomographie
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EWGSOP2	European Working Group on Sarcopenia in Older People
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FM	Fatt Mass
GH	Growth Hormone
GTP	Guanosintriphosphat
IGF-1	Insuline like Growth Faktor 1
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LBM	Lean Body Mass
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NEUSARC	Neurogene Sarkopenie
OCR	Oxygen Consumption Rate
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SGM	Skeletal Growth Medium
SMI	Skeletal Muscle Mass Index
sTfR	Löslicher Transferrinrezeptor
VDBP	Vitamin D bindendes Protein
VDR	Vitamin D Rezeptor
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Muskelphysiologie und altersbedingte Veränderungen

1.1.1 Allgemeine Muskelphysiologie

Die Muskulatur spielt durch die Fähigkeit zur Kontraktion und Krafterzeugung eine entscheidende Rolle beim Erhalt lebenswichtiger Funktionen. Das Muskelgewebe wird infolge unterschiedlicher Strukturen und verschiedener Anforderungen in zwei Hauptgruppen unterteilt, wobei das Grundprinzip der Krafterzeugung durch die Wechselwirkung von Aktin- und Myosinfilamenten für beide Gruppen gleich ist. Die Hauptgruppen unterteilen sich in glatte Muskulatur und quergestreifte Muskulatur, welche sich in Herzmuskulatur und Skelettmuskulatur unterteilt. Die Skelettmuskulatur macht dabei den Großteil mit ca. 40% des Körpergewichts (1) und über 600 individuellen Skelettmuskeln (2) im menschlichen Körper aus. Die Kontraktilität der Skelettmuskulatur ermöglicht in Interaktion mit dem Bandapparat und Körperskelett die Stütz- und Haltefunktion sowie die Durchführung willkürlicher Bewegungsabläufe, wodurch sie maßgeblich an der körperlichen Leistungsfähigkeit beteiligt ist. Zusätzlich ist die Skelettmuskulatur in verschiedene Stoffwechselprozesse involviert (3) und ist somit im Hinblick auf Erkrankungen, welche wie Sarkopenie die Muskulatur betreffen, von besonderem Interesse.

1.1.2 Aufbau, Funktion und Metabolismus der Skelettmuskulatur

Die komplexe Struktur des Skelettmuskels setzt sich zusammen aus den oben genannten Myofilamenten Aktin und Myosin, welche das Sarkomer, die kleinste funktionelle Einheit des Muskels bilden. Viele Sarkomere ergeben eine Myofibrille, welche wiederum in ihrer Summe, umgeben von einer Basalmembran und dem Endomyisium, eine Muskelzelle, respektive Muskelfaser bilden. Zwischen Basallamina und Sarkolemm einer Muskelfaser sind Satellitenzellen lokalisiert (4), aus welchen sich im Rahmen der Myogenese und bei Regenerationsprozessen Myoblasten entwickeln und sich im weiteren Verlauf zu Muskelzellen differenzieren (5). Die Gesamtheit der Muskelfasern, welche sich zu Primär- und weiterhin zu Sekundärbündeln zusammenschließen, umgeben von bindegewebigen Strukturen und letztlich der Muskelfaszie, ergeben schließlich den Skelettmuskel. Abhängig von der Belastungsart und anderen Faktoren, setzen sich die jeweiligen Skelettmuskeln aus unterschiedlichen Fasertypen zusammen, welche sich aufgrund verschiedener Myosin Schwereketten in drei Hauptfasertypen unterscheiden lassen (6, 7). Der Muskelfaser Typ I, auch langsame oder slow-oxidative Fasern genannt, dient vorwiegend der Ausdauerbelastung und demnach der Stütz und Haltefunktion. Die Energiegewinnung der Typ-I-Fasern erfolgt überwiegend über den

Einleitung

aeroben Stoffwechsel, weshalb die Typ-I-Fasern viele Mitochondrien enthalten (8). Die Muskelfasern vom Typ II, werden weiter unterteilt in Typ IIA, welche auch fast-oxidative-glycolytic Fasern genannt werden und Typ IIB, auch fast-glycolytic Fasern (8). Ihrem Namen entsprechend sind die Muskelfasern vom Typ II an schnellen Bewegungsabläufen beteiligt, enthalten weniger Mitochondrien und beziehen ihre Energie überwiegend über den anaeroben Stoffwechsel (8). Die Erzeugung von Bewegungsenergie und Kraft durch den Skelettmuskel entsteht durch synchrone Kontraktionsabläufe der Sarkomere, welche durch motorische Nervenfasern eines α -Motoneurons innerviert werden. Die Gesamtheit aller Muskelfasern, welche von einem α -Motoneuron versorgt werden, wird als motorische Einheit bezeichnet (9). Die Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten bewirkt die Kontraktion des Muskels und um diese wieder zu lösen, wird Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Zur Herstellung von ATP verwenden Muskeln hauptsächlich Glukose und Fettsäuren (10), wobei Glukose aerob und anaerob verstoffwechselt werden kann. Glukose wird hierfür aus den muskeleigenen Glykogen-Speichern in Form von Glykogen bereitgestellt (11) und über verschiedene Signalachsen aus dem Blut aufgenommen (12). Die postprandiale, insulin gesteuerte Aufnahme von Glukose erfolgt dabei bis zu 85% durch den Skelettmuskel (13), wodurch der Skelettmuskel wesentlich zu der Regulierung des Blutzuckers beiträgt (14). Je nach Energiebedarf und Verfügbarkeit werden außerdem Fettsäuren durch die Skelettmuskelzellen über verschiedene Transportmechanismen aufgenommen (15) und mitochondrial zu Acetyl-Coenzym A (AcetylCoA) metabolisiert, um im weiteren Verlauf ATP zu produzieren (15). Ebenso wie Glukose und Fettsäuren können als weiterer Makronährstoff Eiweiße, beziehungsweise Aminosäuren bei erhöhtem Energiebedarf als Energiequellen dienen, um ATP zu generieren (16). Der Skelettmuskel enthält 50-70% des Gesamteiweißes im Körper (1) und spielt damit als Energiereservoir bei kataboler Stoffwechsellage eine wichtige Rolle im Proteinmetabolismus (17). Die Skelettmuskulatur schüttet darüber hinaus Myokine aus, welche als muskeleigene Signalstoffe die Regulierung und Funktion der Skelettmuskulatur als auch anderer Organe steuern (18). Anhand der multiplen Funktionen und Eigenschaften des Skelettmuskels wird deutlich, welche besondere Bedeutung der Skelettmuskel nicht nur in Bezug auf die körperliche Leistungsfähigkeit, sondern ebenso als metabolisches Organ im menschlichen Körper spielt. Als Folge dessen ist Muskelatrophie mit dem Auftreten systemischer Krankheitsleiden und verschiedenen Erkrankungen anderer Organsysteme assoziiert (19).

1.1.3 Energiegewinnung durch die Mitochondrien im Skelettmuskel

Mitochondrien spielen durch ihre Hauptfunktion, die Synthese von ATP, eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes und sind somit insbesondere

Einleitung

für den stoffwechselaktiven Skelettmuskel von besonderer Bedeutung. Mitochondrien machen circa vier bis sieben Prozent der Skelettmuskelmasse aus (20), wobei je nach Beanspruchung des Muskels, beziehungsweise der durch Muskelkontraktion ausgelösten physiologischen und biochemischen Prozesse die mitochondriale Biogenese angeregt wird, wodurch unter anderem die Neubildung von Mitochondrien im Skelettmuskel stimuliert wird (21). Neben der ATP Synthese sind Mitochondrien an einer Vielzahl von Signalwegen (22, 23) und Signaltransduktionen (24) innerhalb der Zelle beteiligt und spielen eine Rolle in weiteren wichtigen Stoffwechselprozesse, unter anderem dem Fettstoffwechsel (25, 26), Aminosäure-Metabolismus (27), der Regulation des Eisenstoffwechsels (28) und der Apoptose, dem programmierten Zelltod (29). Zudem verfügen Mitochondrien über Qualitätskontrollmechanismen und sind über verschiedene Signalwege bei Störungen und Fehlfunktionen ihrer selbst fähig zur selektierten Autophagie, beziehungsweise zur sogenannten Mitophagie (30). Je nach Anforderung des Muskels decken die Mitochondrien somit den zellulären Energiebedarf, gewährleisten eine kontinuierliche Funktionalität durch Qualitätssicherung, oder initiieren apoptische Programme um defekte Zellen zu eliminieren.

Da die vielen Funktionen der Mitochondrien eng mit ihrer Morphologie im Zusammenhang stehen (31), wird im Folgenden kurz auf ihren Aufbau eingegangen (siehe Abbildung 1). Mitochondrien bestehen aus vier Kompartimenten, einer Außenmembran, dem Intermembranraum, einer Innenmembran und der Mitochondrien Matrix (32). Die Außenmembran steht in Kontakt mit dem Zytosol der Zelle, ist von Poren durchsetzt und dadurch für viele Stoffe permeabel, während die Innenmembran undurchlässig ist. Die innere Mitochondrienmembran enthält einige Transporter und Kanäle, sowie die Komplexe der Atmungskette (32) und zeichnet sich außerdem durch die sogenannten Cristae aus, bei denen es sich um Membraneinstülpungen in die Matrix handelt. Diese dynamischen Invaginationen der Intermembran haben großen Einfluss auf die vielfachen mitochondrialen Funktionen (33), sowie auf die Stabilität und Verteilung der Atmungskettenenzyme (34). Insbesondere Zellen mit hohem Energiebedarf, wie Skelettmuskelzellen, enthalten entsprechend Mitochondrien mit einem hohen Anteil an Cristae-Membranen (35). Nielsen et al. (36) konnten zeigen, dass die Cristae-Membran pro Muskelvolumen ein besserer Indikator der maximalen zellulären Sauerstoffaufnahme ist, als das Mitochondrienvolumen pro Muskelvolumen an sich (36). Dies verdeutlicht, welchen entscheidenden Einfluss die Morphologie der Mitochondrien auf ihre Funktion hat. Darüber hinaus ist die mitochondriale Dynamik, also die Fähigkeit mehrerer Mitochondrien zu fusionieren und sich zu trennen, für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen essenziell (37). In der

Einleitung

Mitochondrienmatrix findet der Hauptteil des Harnstoffzyklus, die β -Oxidation, die Hämbiosynthese, die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion und der Citratzyklus statt (38). Außerdem befindet sich hier die mitochondriale DNA (mtDNA), welche überwiegend Gene für die Proteinuntereinheiten der Atmungskette kodiert (39). Die mtDNA ist ein zirkuläres DNA Molekül mit 16.6 Basenpaaren und bildet in Verbindung mit einigen Proteinen ein kompaktes Nukleoid, welches nahe der inneren Mitochondrienmembran in der Matrix lokalisiert ist (40). Insgesamt enthält die mtDNA 37 Gene und kodiert für mitochondriale RNAs, mitochondriale tRNAs sowie 13 Polypeptide für die Untereinheiten der Atmungskettenenzyme (39, 40).

Die kontinuierliche Energieproduktion der Mitochondrien wird hauptsächlich durch die oxidative Phosphorylierung von Kohlenhydraten und Fetten gewährleistet (41). Die Verstoffwechselung von Glukose startet im Zytosol der Zelle durch die Glykolyse und liefert über mehrere Reaktionsschritte bis Pyruvat 2 ATP pro Molekül Glukose (42). Die anschließenden oxidativen Reaktionen finden im Mitochondrium statt und liefern hingegen circa 30 ATP pro Molekül Glukose (42), wozu der Citratzyklus durch die Bildung der Reduktionsäquivalente $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 beiträgt. Der Citratzyklus wird auch als die Drehscheibe des Stoffwechsels bezeichnet, da er eine zentrale Stellung in vielen Stoffwechselprozessen hat (43). Die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte des Citratzyklus wird nachfolgend wie durch Rassow et al. (44) und Akram (45) anhand der oxidativen Phosphorylierung von Glukose beschrieben. Zunächst wird das durch die Glykolyse entstandene Pyruvat vom Zytosol über den Pyruvat-Carrier in die Mitochondrienmatrix transportiert (46), dort durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA katalysiert und in den Citratzyklus eingespeist. Der Citratzyklus besteht aus insgesamt acht enzymatisch katalysierten Reaktionen, die im Verlauf des Zyklus Acetyl-CoA oxidieren (siehe Abbildung 1). Die erste Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat, katalysiert durch die Citratsynthase, ergibt Citrat, welches der Namensgeber des Citratzyklus ist. Die Aktivität der Citratsynthase gilt neben dem membranständigen Phospholipid Kardiolipin und der Aktivität von Komplex I der Atmungskette als ein guter Marker für den Mitochondriengehalt im Skelettmuskel und liefert wichtige Informationen bezüglich der zellulären Energieproduktion, da die Citratsynthase, Komplex I und Kardiolipin eng mit der Funktion und Effizienz der Mitochondrien verknüpft sind (47). Nach der Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat erfolgt durch die Isocitrat-Dehydrogenase die Oxidation von Isocitrat zu Oxalsuccinat, welches dann spontan zu alpha-Ketoglutarat decarboxyliert wird, wobei $\text{NADH}+\text{H}^+$ gebildet wird. Durch die alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase wird alpha-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA umgesetzt und es entsteht ein weiteres Molekül $\text{NADH}+\text{H}^+$. Durch die nächste Reaktion wird die energiereiche Thioesterbindung des Succinyl-CoA gespalten

Einleitung

wobei es zur Bildung von GTP (Guanosintriphosphat) kommt, katalysiert durch die Succinyl-CoA-Synthetase. Bei der Oxidation durch die Succinat-Dehydrogenase von Succinat zu Fumarat wird ein Molekül FADH_2 gebildet. Die Succinat-Dehydrogenase ist als einziges Enzym des Citratzyklus in der inneren Mitochondrienmembran verankert und kann dadurch die an FADH_2 gebundenen Elektronen direkt in die Atmungskette einbringen. In der nächsten Reaktion entsteht durch die Hydratisierung aus Fumarat nun Malat, welches schließlich durch die Malatdehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert wird, wobei ein weiteres Molekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht. Mit der Bildung von Oxalacetat schließt sich der Kreis und beginnt nach erneuter Zufuhr von Acetyl-CoA von vorne. Der Citratzyklus spielt nicht nur in der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle, sondern liefert für viele weitere Stoffwechselwege Synthesevorstufen, beispielsweise für die Gluconeogenese, Fettsäuresynthese und Aminosäuresynthese. Aufgrund der Beteiligung an sowohl katabolen als auch anabolen Stoffwechselwegen wird der Citratzyklus auch als amphibolisches Zentrum bezeichnet (45). Durch die ständige Bereitstellung von Metaboliten ist der Citratzyklus auf anaplerotische Reaktionen im Mitochondrium angewiesen, also auf das Zuführen neuer Metabolite in den Zyklus, sodass dieser nicht zum Erliegen kommt (48). Sowohl in anaplerotischen als auch kataplerotischen Reaktionen spielt der Citratzyklus im Mitochondrium eine Schlüsselrolle, was insbesondere in der Skelettmuskulatur ausschlaggebend ist, um das Gleichgewicht des Energiestoffwechsels aufrecht zu erhalten (49).

Der Citratzyklus steht im direkten Zusammenhang mit der Atmungskette, da die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 des Citratzyklus in der Atmungskette oxidiert werden und die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus gleichzeitig als Komplex II der Atmungskette fungiert. Die Atmungskette ist eine in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Elektronentransportkette, bestehend aus insgesamt vier Komplexen und wird im Folgenden wie durch Rassow et al. (44) und Osellame et al. (50) beschrieben. Die wichtigste Aufgabe der Atmungskette ist die Aufrechterhaltung eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran, welcher letztlich von der ATP-Synthase genutzt wird, um ATP zu synthetisieren.

Komplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, ist mit 45 Untereinheiten der größte Komplex der Atmungskette (51) und nimmt zwei Elektronen von NADH auf, welche vorläufig durch das im Komplex I enthaltene Flavinmononukleotid übernommen werden. Anschließend werden die Elektronen nacheinander von den in Komplex I enthaltenen acht Eisen-Schwefel-Zentren übernommen und schließlich an Ubichinon übertragen. Währenddessen werden über Komplex I vier Protonen von der Matrix in den Intermembranraum exportiert. Damit ist Komplex I essenziell für die Initiierung der Atmungskette (51). Komplex I ist ein besonderer Atmungskettenenzymkomplex und

Einleitung

spielt durch seine NADH-Dehydrogenase-Aktivität eine einzigartige Rolle bei der Entstehung, der Entwicklung und dem Verlauf von Krankheiten, welche mit mitochondrialen Funktionen assoziiert sind (39). Dysfunktionen von Komplex I werden beispielsweise mit mitochondrialen Erkrankungen, wie Parkinson und auch dem Alterungsprozess in Zusammenhang gebracht (51). Eine Aktivitätsminderung von Komplex I führt zu einer Abnahme von NAD⁺, welcher ein ausschlaggebender Cofaktor für Enzyme vieler zellulärer Prozesse ist, wie DNA Reparaturen, den Stoffwechsel und Proteinacetylierungen (39).

Komplex II der Atmungskette ist wie oben bereits beschrieben gleichzeitig die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus und enthält neben drei Eisen-Schwefel-Zentren und einer Hämgruppe, das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als prosthetische Gruppe, welches bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat zwei Elektronen aufnimmt und dabei zu FADH₂ reduziert wird. FADH₂ gibt die Elektronen an die Eisen-Schwefel-Zentren innerhalb des Komplex II weiter und von dort werden sie auf Ubichinon übertragen, wodurch es zu Ubichinol reduziert wird. Komplex II pumpt als einziger Komplex der Atmungskette keine Protonen in den Intermembranraum. Das in der mitochondrialen Innenmembran frei lösliche Ubichinon, welches synonym als Coenzym Q bezeichnet wird, sammelt die Elektronen von Komplex I und II und überträgt diese auf Komplex III. Die Cytochrom-C-Oxidoreduktase, Komplex III der Atmungskette, übernimmt die Elektronen von Ubichinon und überträgt sie auf Cytochrom c. Hierbei werden insgesamt 4 Protonen in den Intermembranraum befördert. Komplex III enthält ebenfalls als Coenzym ein Eisen-Schwefel-Zentrum und Hämgruppen. Komplex IV, die Cytochrom-C-Oxidase, übernimmt die Elektronen von Cytochrom c und überträgt sie auf Sauerstoff, welcher wiederum durch Bindung an Protonen aus der Matrix zu H₂O reduziert. Die dabei freiwerdende Energie ermöglicht Komplex IV einen Export von weiteren zwei Protonen in den Intermembranraum. Komplex IV enthält neben zwei Hämgruppen zwei Kupferzentren. Das mitochondriale Membranpotenzial resultiert im Wesentlichen aus dem Protonengradienten durch die Atmungskette und ist unverzichtbar für die Funktionalität der ATP-Synthase, einem Transmembranprotein welches aus Adenosindiphosphat und Phosphat mittels des Protonengradienten ATP synthetisiert (52) und essentiell für den Energiestoffwechsel von Zellen ist. Die „Kraftwerke“ der Zelle machen ihrem Namen also alle Ehre, da sie nicht nur kontinuierlich Energie in Form von ATP liefern und sich dem zellulären Bedarf durch Biogenese, Zellteilung und -fusion ständig anpassen, sondern ebenso durch ihre vielseitigen Beteiligungen am Zellstoffwechsel einen großen Einfluss auf die Gesundheit des gesamten Organismus haben (38).

Einleitung

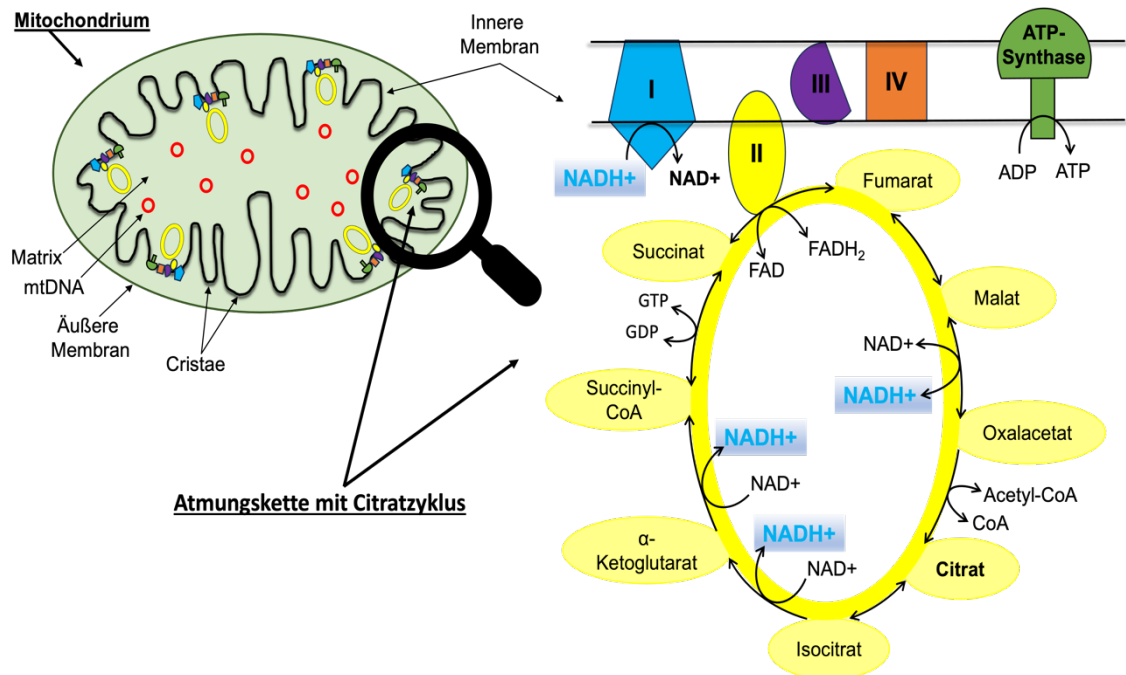


Abbildung 1 Schematische, vereinfachte Darstellung eines Mitochondriums mit Citratzyklus und Atmungskette

1.2 Sarkopenie

1.2.1 Definition der Sarkopenie

Der Begriff Sarkopenie wurde erstmals in den achtziger Jahren durch Irwin H. Rosenberg geprägt, mit dem Ziel die bis dahin erworbenen Erkenntnisse bezüglich des altersbedingten Verlustes der Muskelmasse in einem Wort zusammenzufassen (77). Basierend auf dem damaligen Wissensstand, dass Muskelmasse den verhältnismäßig stärksten Rückgang in Struktur und Funktion im Laufe des Lebens aufzeigt und somit einen großen Stellenwert im Alterungsprozess hat, wurde die Zusammenstellung der griechischen Worte "sarx" (Fleisch) und "penie" (Verlust) dafür gewählt (53). Im Januar 2018 erhielt Sarkopenie in Deutschland einen Diagnoseschlüssel (ICD-10-GM, M62.50) und im gleichen Jahr stellte die European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP2) (54) eine überarbeitete Version ihrer Konsensusdefinition von 2010 vor. Sarkopenie ist ein geriatrisches Syndrom mit akutem oder chronischem Verlauf, welches als ein progressiver und generalisierter Verlust von Muskelmasse und -kraft definiert wird. Außerdem ist Sarkopenie mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für körperliche Einschränkungen, einem erhöhten Sturzrisiko, Frakturen und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert (54, 55).

1.2.2 Diagnostik und Diagnosekriterien der Sarkopenie

Die Diagnostik der Sarkopenie erfolgt gemäß den Kriterien des europäischen Sarkopenie-Konsensus (54, 55), welche im Folgenden beschrieben werden. Zur Identifizierung sarkopener Patienten im klinischen Setting und im Praxisalltag wurde ein Fragebogen bestehend aus fünf Fragen entworfen (56). Abgefragt werden Kraft und Mobilität im Alltag (Gehen, Aufstehen, Treppensteigen) und ergänzend eine Sturzanamnese erhoben. Pro Frage werden null bis zwei Punkte vergeben, wobei ab einer Punktzahl von ≥ 4 Punkten eine weiterführende Diagnostik erfolgen sollte oder gegebenenfalls bei ≤ 4 Punkten eine zeitnahe Reevaluation angestrebt werden sollte. Für die weiterführende Diagnostik wurde von der EWGSOP2 ein Diagnosealgorithmus konzipiert. Dieser beginnt mit einer Messung der Handkraft mittels Dynamometer, welche im Detail unter 4.2.1 beschrieben wird, oder wahlweise Messung der Beinkraft mithilfe des "chair-rise-test". Sofern das Testergebnis unter dem festgelegten Grenzwert liegt, kann eine Prä-sarkopenie bestehen. Diese Diagnose ist im klinischen Alltag bereits ausreichend, um Interventionen einzuleiten (57). Die Feststellung einer niedrigen Muskelkraft stellt den Verdacht auf Sarkopenie dar. Für die Bestätigung der Sarkopenie wird im nächsten Schritt mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (dual-energy x-ray absorptiometry = DXA), Bioimpedanzanalyse (BIA), Computertomographie (CT), oder Magnetresonanztomographie (MRT) die Muskelmasse und -qualität bestimmt. Die Diagnose Sarkopenie liegt vor, wenn sowohl die Muskelkraft als auch die Muskelmasse reduziert sind. Zur Bewertung des Sarkopenie Schweregrads wird die körperliche Leistungsfähigkeit mittels der Ganggeschwindigkeit, oder dem "short physical performance battery" Test, oder dem "timed-up-and-go" Test, oder der 400m Gehstrecke gemessen.

1.3 Risikofaktoren und Pathophysiologie der Sarkopenie

Die Ätiologie der Sarkopenie ist nicht abschließend geklärt und es werden multifaktorielle Ursachen diskutiert, welche Auswirkungen auf die Entstehung und die Progression der Sarkopenie begünstigen (58). Diese werden im Rahmen der altersbedingten Veränderung der Muskulatur in den folgenden Abschnitten erläutert.

1.3.1 Muskelveränderungen im Alter und Sarkopenie

Die Skelettmuskulatur ist ein sehr dynamisches Gewebe und zeichnet sich durch ihre hohe Plastizität aus (59). Art und Umfang körperlicher Aktivitäten, Ernährung, körperlicher Stress und andere äußere Umstände nehmen darauf ebenso Einfluss wie voranschreitendes Alter und damit einhergehend strukturelle und folglich funktionale Veränderungen der Skelettmuskulatur. Die altersbedingten Veränderungen des Muskels zei-

Einleitung

gen sich dementsprechend durch die Reduktion der Muskelmasse und Abnahme der Muskelkraft. Goodpaster et al. haben festgestellt, dass die Muskelkraft der Beinmuskulatur bei über 70 Jährigen im Vergleich zur Muskelmasse pro Jahr dreimal so schnell abnimmt, was auf einen rapiden Funktionsverlust des Muskels im Alter hinweist (60). In der zweiten und dritten Lebensdekade erreicht die Muskelkraft ihr Maximum und nimmt ab der fünften Lebensdekade um circa ein bis zwei Prozent jährlich ab, wobei sich die Abnahme ab einem Alter von 65 Jahren nochmals verstärkt (61). Hierbei scheint der Verlust der Muskelkraft bei Männern ausgeprägter zu sein, als bei Frauen (62).

Die Reduktion der Muskelmasse in Relation zum Körpergewicht beginnt ebenfalls in der dritten Lebensdekade, während die Abnahme der absoluten Skelettmuskelmasse mit circa 45 Jahren beginnt, wovon insbesondere die Muskulatur der unteren Extremität betroffen ist (63). Mit steigendem Alter kommt es zu einem kontinuierlichen Verlust der Muskelmasse, welcher ab einem Alter von > 70 Jahren beschleunigt abzulaufen scheint (64-66). Durch Immobilisation wird der Verlust der Muskelmasse zusätzlich verstärkt. So konnte Kortebein et al (67) im Rahmen einer Studie eine Verringerung der Muskelproteinsynthese von 30%, einhergehend mit einer Reduktion der Muskelmasse um 3.2% und einem Verlust der Muskelkraft von 15.6% bei 67 Jahre alten, gesunden Probanden während zehntägiger Bettruhe feststellen. Gleichermassen zeigte sich auch schon nach einer kürzeren Zeitdauer von nur 5 Tagen der Ruhigstellung ein erheblicher Verlust an Skelettmuskelmasse und -kraft, einhergehend mit einer Aktivierung des katabolen Stoffwechsels (68).

Der altersbedingte Rückgang des Muskelgewebes ist auf zellulärer Ebene durch den Verlust und die Atrophie von Muskelfasern gekennzeichnet (69), wobei ein altersbedingter Verlust ab dem 25. Lebensjahr zunächst von beiden Fasertypen gleichermaßen stattfindet (70). Der Verlust von Muskelfasern ist unter anderem bedingt durch einer Abnahme der motorischen Einheiten in Folge einer Denervierung (71). Neben dem Verlust der motorischen Einheiten kommt es außerdem zu qualitativen Veränderungen, welche unter anderem eine Instabilität neuromuskulärer Synapsen, Gruppierung verschiedener Fasertypen durch wiederkehrende Denervierung und gestörter Reinnervation bewirken (72). Veränderungen des Nervensystems, beziehungsweise neurodegenerative Prozesse sind ebenfalls mit Sarkopenie assoziiert (73). So konnten Drey et al. einen Verlust motorischer Einheiten in Assoziation sarkopener Patienten feststellen, während die verbleibenden motorischen Einheiten einen Größenzuwachs zeigten, vermutlich als Kompensationsmechanismus (74).

Die primäre Ursache der reduzierten Muskelmasse im Alter scheint indessen vor allem die Atrophie der Muskelfasern vom Typ II darzustellen (75), was wiederum einen Ein-

Einleitung

fluss auf die Leistungsfähigkeit und Belastungsart hat. Eine Verringerung der Schnellkraft ist durch die Atrophie der Typ-II-Fasern somit im alternden Muskel besonders ausgeprägt (76), wobei davon hauptsächlich Männer betroffen zu sein scheinen (77, 78). So konnte auch im Zusammenhang der Sarkopenie ebenfalls eine Muskelfaseratrophie der schnellkontrahierenden Typ-II-Fasern vor allem für Männer gezeigt werden (79).

Satellitenzellen regulieren das Wachstum und die Regeneration der Skelettmuskelzellen und sind daher eng verknüpft mit Muskelwachstum und Muskelatrophie. Ein Rückgang von Muskelfaser Typ-II-spezifischen Satellitenzellen wurde konkordant zum Verlust der Muskelmasse, sowie der Reduktion des Muskelfasertyps II ab einem Alter von circa 50 Jahren und verstärkt in seneszenten Muskelzellen ab einem Alter von 70 Jahren beobachtet (80). Ein Zusammenhang zwischen einer satellitenzellenabhängigen Abnahme der Regenerationsfähigkeit im alternden Muskel wird ebenfalls im Rahmen der Sarkopenie vermutet (81-83).

1.3.2 Veränderung des Metabolismus im Alter und Sarkopenie

Aufgrund der Abnahme von Typ II Muskelfasern und der infolgedessen veränderten Muskelfaserzusammensetzung zugunsten von langsam kontrahierenden Typ I Muskelfasern konnte eine Verschiebung von anaerobem zu aerobem Energiestoffwechsel im alternden Skelettmuskel beobachtet werden (84-86). Altersbedingte Veränderungen im Energiestoffwechsel, dem kontraktilen Apparat des Skelettmuskels und die neuromuskuläre Degeneration weisen außerdem eine enge Verknüpfung mit einem veränderten Muskelproteom auf (87). Théron et al. demonstrierten in einer Analyse des Muskelproteoms von Biopsien des Musculus vastus lateralis von Frauen im Alter von 78 Jahren im Vergleich zu Frauen im Alter von 53 Jahren eine deutliche Abnahme von Proteinen, welche am Energiestoffwechsel beteiligt sind, wie beispielweise Untereinheiten der ATP-Synthase (88). In einer Übersichtsarbeit wurde dargestellt, dass Veränderungen des Muskelproteoms mit altersbedingter Skelettmuskelatrophie assoziiert ist, welche im Zusammenhang mit Sarkopenie steht (89). Dabei zeigten sich deutliche Veränderungen für eine Vielzahl kontraktiler Proteine, welche essenziell für die Aufrechterhaltung der Muskelfunktion sind (89). Die Dysbalance von Auf- und Abbau der Muskelproteine im Skelettmuskel scheint eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess zu spielen, welche unter anderem durch die sogenannte anabole Resistenz, einer verminderte Reaktion auf anabole Stimuli durch die Nahrungsaufnahme des gealterten Muskels verursacht wird (90, 91).

1.3.3 Proinflammatorische Prozesse und endokrinologische Veränderungen im Alter und bei Sarkopenie

Ursächlich für das Entstehen der anabolen Resistenz ist vermutlich eine Kombination aus verminderter körperlicher Aktivität, einer verringerten postprandialen Menge an Aminosäuren, einer Insulinresistenz, inflammatorischen Prozessen und weiterer gestörter Mechanismen des alternden Skelettmuskels (90, 92-94). Darunter wird insbesondere chronisch entzündlichen Prozessen im Alter mit erhöhten Spiegel von Tumornekrosefaktor und Interleukinen (IL-1 und IL-6) eine große Bedeutung zugeschrieben (95). Der Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen beeinträchtigt die Muskulatur durch die Stimulation des muskulären Proteinabbaus (96) und den Einfluss sowohl auf die Regulation des anabolen Hormons Insuline like Growth Faktor 1(IGF-1) (97) als auch auf die Insulinsensitivität (98). Zytokine könnten durch die Aktivierung des Ubiquitinsystems und dem daraus resultierenden Abbau von Proteinen, ebenso wie durch eine Hemmung der IGF-1 Aktivität und die Entwicklung einer Insulinresistenz einen Auslöser für Sarkopenie darstellen (99). Die altersbedingten Veränderungen des Hormonhaushaltes haben einen entscheidenden Einfluss auf den Verlust der Muskelmasse und Muskelkraft (100). Bei Männern ließ sich eine signifikante Assoziation von Muskelmasse mit dem Testosteronspiegel nachweisen (101, 102) und es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme des Testosteronspiegels mit steigendem Alter als auch eine zunehmende Prävalenz für Hypogonadismus ab einem Alter von 50 Jahren (103). Frauen zeigten ab dem 55. Lebensjahr eine starke Reduktion der Muskelkraft (62), weshalb eine Assoziation zum Klimakterium und dem damit einhergehenden niedrigeren Östrogenspiegel vermutet wird (102, 104). Neben der altersbedingten Abnahme von Sexualhormonen, scheinen insbesondere anabole Hormone wie Insulin eine große Rolle in der Pathogenese der Sarkopenie zu spielen (105). So konnte gezeigt werden, dass der Alterungsprozess mit einer Insulinresistenz einhergeht (106, 107) und ein Zusammenhang von Insulinresistenz mit Sarkopenie besteht (108, 109). Endokrinologische Veränderungen im Alter betreffen unter anderem auch das Wachstumshormon (= Growth Hormone, GH), welches ab der 3. Lebensdekade stetig um circa ein Prozent jährlich sinkt (110-112). GH stimuliert die Sekretion von IGF-1 (113) und eine Abnahme von IGF-1 kann zu einer Abnahme der Muskelmasse, Muskelkraft, reduzierter Proteinsynthese und vermehrtem Zelltod führen (111, 114). Im Rahmen einer Studie konnten verringerte Konzentrationen von sowohl IGF-1 als auch dem IGF-1-Bindeprotein (IGFBP3) bei sarkopenen Patienten nachgewiesen werden (115). Hormone und Androgene spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Muskelstoffwechsels und dem Erhalt der Muskelmasse, sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch (113). So konnte nicht nur eine Abnahme der oben beschriebenen Hormone

Einleitung

Testosteron, GH und IGF-1 beobachtet, sondern auch ein signifikanter Zusammenhang mit Sarkopenie gezeigt werden (116). Außerdem wird vermutet, dass das Wachstumshormon IGF-1 in Bezug auf die Denervierung und dem Verlust motorischer Einheiten im Rahmen der Sarkopenie eine potenzielle Rolle in der Pathogenese spielt (117).

1.3.4 Lebensstiländerung und Mangelzustände im Alter und Sarkopenie

Einen maßgeblichen Faktor der altersbedingten Veränderungen der Muskulatur stellen die mit dem Alter einhergehenden Lebensstiländerungen, hinsichtlich Bewegung und Ernährung dar. Die körperliche Aktivität älterer Menschen in Deutschland wurde 2018 durch das Regionalbüro Europas der World Health Organization (WHO) erhoben und ein Bewegungsmangel unter gesundheitlicher Perspektive bei über der Hälfte (= 58%) der > 65-jährigen festgestellt (118). Subgruppen mit mangelnder körperlicher Aktivität von > 70-jährigen zeigten eine erhöhte Prävalenz für Sarkopenie (119).

Die Ergebnisse einer Meta-Analyse von 2019 zeigten, dass 23% der europäischen Bevölkerung im Alter von ≥ 65 Jahren ein hohes Risiko und 48,4% ein moderates bis hohes Risiko für eine Protein-Energie-Unterernährung zeigten, wobei davon insbesondere hospitalisierte Patienten betroffen waren (120). In einer weiteren Übersichtsarbeit konnte gezeigt werden, dass das Alter neben anderen Faktoren eine Mangelernährung begünstigt (121). Im Rahmen der KORA- Age Studie wurde festgestellt, dass 52% der Erwachsenen im Alter von 65 bis 93 Jahren einen Vitamin-D-Mangel (< 50 nmol/l), 27% einen Vitamin-B12-Mangel (< 221), 11% einen Eisenmangel und 9,8% einen Folsäuremangel hatten (122). Zwischen Mangelernährung und Sarkopenie konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (123, 124). Außerdem wurde ein erhöhtes Sturzrisiko bei mangelernährten > 70-jährigen beobachtet (125).

Insbesondere für Vitamin D wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Veränderungen der Muskelmasse, körperlichen Leistungsfähigkeit und erniedrigten Ausgangswerten von Vitamin D bei älteren Erwachsenen über einen Beobachtungszeitraum von drei Jahren festgestellt (126). Vitamin D hat einen großen Einfluss auf den Muskelstoffwechsel und spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Muskelregeneration als auch bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion (94, 127-129). Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vitamin-D-Spiegel im Serum und dem muskulären Energiestoffwechsel festgestellt werden, was die Relevanz von Vitamin D für die Aufrechterhaltung einer optimalen Energieproduktion in den Muskelzellen verdeutlicht (130).

Eisen ist ebenso unerlässlich für die Aufrechterhaltung verschiedener zellulärer und mitochondrialer Funktionen und der Eisenstoffwechsel ist entsprechend von großer

Einleitung

Bedeutung im Skelettmuskelgewebe, welches einen Anteil von 10 bis 15 Prozent des im Körper vorhandenen Eisen enthält (131). Als essenzieller Mineralstoff spielt Eisen eine bedeutende Rolle in zahlreichen biochemischen Prozessen der Mitochondrien, darunter der Sauerstoffbindung, dem Sauerstofftransport und der Energieproduktion (132, 133). Dies umfasst auch die Generierung von ATP im Skelettmuskel, da Eisen wie bereits erwähnt ein wesentlicher Bestandteil der Enzymkomplexe der mitochondrialen Elektronentransportkette ist und somit von fundamentaler Bedeutung für die Redoxreaktionen und den damit verbundenen effektiven oxidativen Abbau von Kohlehydraten und Fetten ist (134). Gleichzeitig sind die Mitochondrien an der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase und an Prozessen wie Transport, Speicherung und Verwertung von Eisen in der Zelle beteiligt (135). Es besteht eine hohe Prävalenz von Eisenmangel in der älteren Bevölkerung (136) und angesichts der genannten vielfachen Funktionen von Eisen könnten die Folgen eines Eisenmangels entsprechend zu Beeinträchtigung auf zellulärer Ebene führen. Gleiches scheint jedoch auch für eine Eisenüberladung zuzutreffen, welche wie der Eisenmangel ebenso zu Störungen der zellulären Mechanismen führen kann (131, 137). So konnte in einer Übersichtsarbeit dargestellt werden, dass der Alterungsprozess mit einer gestörten Eisenhomöostase einhergeht, welche im weiteren Verlauf zum Verlust der mtDNA-Stabilität führt und somit möglicherweise zum altersbedingten Muskelabbau beiträgt (133).

1.3.5 Mitochondriale Veränderungen im Alter und Sarkopenie

Als Hauptproduzenten der zellulären Energie werden altersbedingte Muskelveränderungen vor allem auf Mitochondrien zurückgeführt und ihnen wird ebenso in der Pathogenese der Sarkopenie eine große Bedeutung zugeschrieben (138-141). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Mitochondrien mit zunehmendem Alter sowohl bei Männern als auch Frauen deutlich abnimmt (142) und die verbleibenden Mitochondrien eine verminderte Funktion im Alter zeigen (143). Als Grund dafür werden bereits seit vielen Jahren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert, welche durch die Atmungskette hauptsächlich von Komplex I und III produziert werden (144-146). ROS-Akkumulationen können aufgrund ihrer hohen Reaktivität insbesondere die in der Mitochondrienmatrix gelegene mtDNA beschädigen, wodurch es zu Mutationen kommen kann. Infolgedessen kann ein Circulus vitiosus entstehen, da mtDNA-Schäden in einer gestörten Synthese der Atmungskettenenzyme resultieren können. Dies kann zu einer gestörten ATP-Synthese führen und zusätzlich eine vermehrte Produktion von ROS verursachen, wodurch weitere Mutationen begünstigt werden (147-149). Bua et al. konnten in dem Zusammenhang eine Zunahme an Muskelfasern des Musculus vastus

Einleitung

lateralis mit Anomalien der Elektronentransportkette von 25% im Alter von 49 bis 92 Jahren feststellen (150). Dabei wurde außerdem beobachtet, dass die Abschnitte der Muskelfasern mit Anomalien der Elektronentransportketten einen außergewöhnlich hohen Anteil an mtDNA mit Deletionsmutationen besaßen (150). Analog dazu wurde in einer weiteren Studie mit zunehmenden Alter eine Abnahme der mtDNA bei gleichzeitig exponentiellem Anstieg an mtDNA-Deletionsmutationen in den Mitochondrien des Musculus vastus lateralis beobachtet (151). Unabhängig von oxidativen Schäden durch ROS und oxidativen Modifikationen mitochondrialer Stoffwechsellzyme gibt es noch weitere degenerative mitochondriale Prozesse, welche Einfluss auf den Alterungsprozess haben, wie beispielsweise Dysregulationen des Citratzyklus, welche zu einer verminderten Energieproduktion und verminderten metabolischen Effizienz führen (152). So wurde mit zunehmendem Alter eine signifikante Abnahme der Citratsynthase-Aktivität, einem Schlüsselenzym des Citratzyklus, festgestellt und eine Reduktion der Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität (Komplex IV) der Atmungskette (140). Damit einhergehend konnte in einer weiteren Studie neben einer deutlichen Abnahme der mtDNA-Dichte im Alter eine kontinuierliche Abnahme der mitochondrialen Kapazität für die oxidative Phosphorylierung und damit einhergehend eine Abnahme der ATP-Produktion gezeigt werden, welche mit funktionellen Veränderungen der noch bestehenden Mitochondrienpopulation in Verbindung gebracht wurde (142, 143). Außerdem gingen sowohl Veränderungen der mitochondrialen Biogenese als auch der Dynamik und Mitophagie mit einer eingeschränkten oxidativen Kapazität und reduziertem Ermüdungswiderstand im alternden Skelettmuskel einher (153). Alway et al. nehmen an, dass eine mitochondriale Dysfunktion zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran führt und es aufgrund eingeschränkter Mitophagie zu einer Anhäufung dysfunktionaler Mitochondrien in der Zelle kommt. Durch die erhöhte Permeabilität könnte Mitochondrieninhalt in das Zytosol austreten und dadurch sowohl in den Muskelzellen als auch in den Motoneuronen eine Apoptose auslösen, welche im weiteren Verlauf zum Verlust der Muskelfasern und Motoneuronen führen und somit zu der Entwicklung einer Sarkopenie beitragen könnte (154).

Anhand einer umfangreichen Analyse des Muskelmetaboloms von sowohl gesunden Menschen mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren als auch gesunden Menschen mit einem mittleren Alter von 72 Jahren und gebrechlichen Menschen mit einem Durchschnittsalter von 78 Jahren, konnten im Vergleich deutliche Unterschiede im Muskelmetabolom und eine Reduktion der Citratzyklusmetabolite für die älteren Probanden gezeigt werden, was ebenfalls auf dysfunktionale Mitochondrien oder eine Abnahme der Mitochondrienanzahl mit steigendem Alter hinweist (155). Zudem wurde ein signifikanter Unterschied des Muskelproteoms und der Citratzyklusmetabolite zwischen

Einleitung

den gesunden 72-jährigen und gebrechlichen 78-jährigen Studienteilnehmern beobachtet (155). So konnte auch kürzlich durch Untersuchungen des Metaboloms sarkopener Patienten gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Sarkopenie und der Konzentration bestimmter Metaboliten, insbesondere von Fettsäure-Metaboliten und der Aminosäure Citrullin besteht. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Assoziation zwischen Sarkopenie und einer mitochondrialen Dysfunktion hin (115). Ebenso konnte in einer Übersichtsarbeit über die Auswirkungen von Metaboliten auf die Funktion der Mitochondrien in der Pathogenese der Skelettmuskelalterung gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und bestimmten Metaboliten, wie Aminosäuren und Fettsäuren als auch Vitamin D von wesentlicher Bedeutung bei der Pathogenese der Sarkopenie sind (156). Die Studienlage zeigt deutlich, dass Veränderungen der mitochondrialen Physiologie und des mitochondrialen Stoffwechsels sich stark auf die Zellfunktion und den Energiestoffwechsel auswirken und damit zum progressiven Alterungsprozess wie im Rahmen der Sarkopenie beitragen.

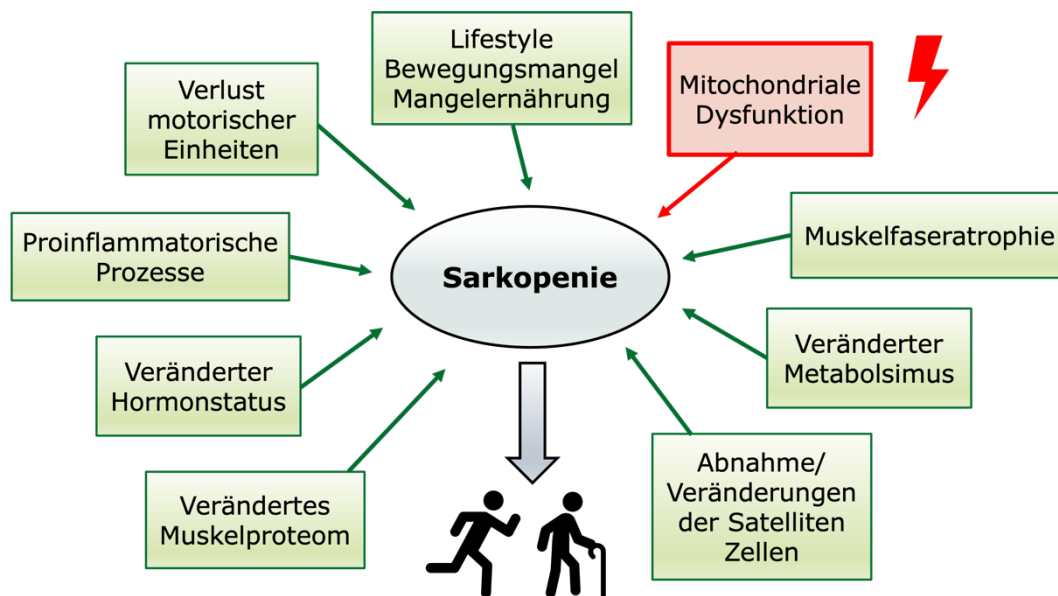


Abbildung 2 Risikofaktoren und Pathomechanismen der Sarkopenie, nachempfunden nach Picca et al. (139)

2 Zielsetzung

Die altersbedingten Veränderungen des Skelettmuskels unterliegen multifaktoriellen Ursachen und gehen mit einer Abnahme der Muskelmasse und -kraft einher, wobei die Sarkopenie einen aggravierten Verlauf des Prozesses beschreibt. Ein mit zunehmendem Alter veränderter Lebensstil, wie Bewegungsmangel und Fehlernährung spielen dabei eine ebenso große Rolle wie Veränderungen des Metabolismus, sowie endokrinologische und zelluläre Veränderungen. Auf molekularer Ebene werden als Ursache des alternden Muskels vor allem die Mitochondrien in Betracht gezogen und es wird vermutet, dass eine mitochondriale Dysfunktion an der Pathogenese der Sarkopenie maßgeblich beteiligt ist.

Mitochondrien erfüllen insbesondere im Skelettmuskel eine Vielzahl wichtiger Funktionen und sind an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt. Durch die oxidative Phosphorylierung von Glukose und Fettsäuren und der damit verbundenen Produktion von ATP erfüllen sie ihre Hauptaufgabe als zelluläre Energiequelle und sind darüber hinaus durch die Integration apoptotischer Signalwege für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Muskelgewebes von zentraler Bedeutung. Veränderungen des mitochondrialen Metabolismus und damit einhergehende Verschiebungen der Konzentrationen von Metaboliten im Blutserum können daher nicht nur Aufschluss über die mitochondriale Aktivität geben, sondern gleichermaßen über die zelluläre Funktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei geriatrischen und sarkopenen Patienten nach Oberschenkelhalsfraktur anhand der Untersuchung von Biopsien des Muskelgewebes und mit Blutserumanalysen eine potenzielle mitochondriale Dysfunktion zu detektieren. Dafür wird aus Muskelhomogenat der Gewebeproben die Aktivität der Atmungskettenenzyme geprüft. Aus den Muskelgewebeproben werden außerdem primäre Myoblastenkulturen generiert und Stoffwechseleränderungen in Echtzeit gemessen. Zudem wird in den Blutseren der Probanden die Konzentration mitochondrialer Metabolite des Citratzyklus, sowie der Vitamin-D-Gehalt und Serummarker des Eisenstoffwechsels gemessen. Dadurch sollen die folgenden Fragestellungen geklärt werden:

1. Lässt sich eine Aktivitätsminderung mitochondrialer Enzymkomplexe der Atmungskette im Muskelhomogenat aus Muskelbiopsien geriatrischer, sarkopener Patienten nachweisen?
2. Sind in primären Myoblastenkulturen, welche aus Muskelbiopsien geriatrischer und sarkopener Patienten generiert wurden Veränderungen im Metabolismus nachweisbar?

Zielsetzung

3. Welchen Einfluss haben multisystemische Faktoren, wie Citratzyklusmetabolite und der Eisenmetabolismus und externe Faktoren, wie Vitamin D auf die Mitochondrien im Skelettmuskel geriatrischer, sarkopener Patienten?

Basierend auf der Überlegung, dass externe Faktoren, wie Vitamin D und Eisen einen bedeutenden Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel haben, wird die Hypothese aufgestellt, dass es infolge einer Imbalance dieser Faktoren zu mitochondrialen Dysfunktionen kommt. Die mitochondrialen Dysfunktionen wiederum könnten in eine verminderte Skelettmuskelfunktion resultieren, welche mit Sarkopenie assoziiert ist. Die vorliegenden Untersuchungen sollen daher helfen, ein besseres Verständnis für die Bedeutung mitochondrialer Dysfunktionen und deren Entstehung im Rahmen der Sarkopenie zu erhalten.

3 Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das hier beschriebene Patientenkollektiv und das damit einhergehende Prozedere der Rekrutierung und Diagnostik wurde bereits in der Dissertation zwei weiterer Doktorandinnen (Stefanie Jarmusch und Fabiana Tanganelli) der Arbeitsgruppe dargelegt. Auf etwaige Doppelungen sei hiermit hingewiesen.

3.1.1 Rekrutierungsprozess

Die Rekrutierung fand von November 2017 bis März 2019 am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München in Kooperation mit der Klinik für Unfallchirurgie und Traumatologie der Universität München am Campus Großhadern statt. Die Patientenkohorte der NEUSARC (Neurogene Sarkopenie) Studie umfasste 42 Teilnehmer, welche aufgrund einer proximalen Femurfraktur eine operative Versorgung mittels Marknagelosteosynthese oder Endoprothesenimplantation erhielten. Von allen Probanden wurde präoperativ das Einverständnis zur Teilnahme an der NEUSARC Studie und der damit einhergehenden intraoperativen Gewinnung einer Muskelbiopsie des Musculus vastus lateralis eingeholt. Es erfolgte zusätzlich eine Aufklärung über die Studienbedingungen sowie notwendiger postoperativer Untersuchungen. Das Studienprotokoll wurde von dem ethischen Komitee der medizinischen Fakultät bestätigt (IRB-No. 328-15) und nach den Standards der Deklaration von Helsinki von 1964 durchgeführt.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In diese Arbeit eingeschlossen wurden Patienten im Alter von 70 Jahren und älter, welche sich einer operativen Therapie an der Klinik für Unfallchirurgie und Traumatologie des Klinikums der Universität München nach proximaler Femurfraktur unterzogen.

Von dieser Arbeit ausgeschlossen wurden betreute Patienten, Pflegebewohner und Patienten mit einem Body-Mass-Index (BMI) von mehr als 30kg/m^2 . Weitere Ausschlusskriterien waren eine bestehende genetische oder erworbenen neuromuskulären Erkrankung, wie Myasthenia gravis, muskuläre Dystrophie, Amyotrophe Lateralsklerose und Poliomyelitis, eine vorliegende schwere Demenz, chronische inflammatorische Erkrankungen, wie Morbus Chron, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis als auch das Bestehen einer systemischen Kortisondauertherapie, oder einer Krebserkrankung oder deren Therapie in den letzten fünf Jahren.

3.2 Sarkopeniediagnostik

3.2.1 Bestimmung der Handkraft

Die maximale Handkraft der Probanden wurde mithilfe eines hydraulischen Dynamometers bestimmt (DHD-1 Digital Handy Dynamometer, Saehan). In aufrecht sitzender Position mit 90° angewinkeltem Arm wurde der Patient aufgefordert den Messbalken des Dynamometers in der jeweiligen Hand dreimal in Folge mit maximaler Handkraft zu drücken. Die Messungen wurde an beiden Händen durchgeführt, wobei der höchste Messwert der maximalen Handkraft entsprach. Eine maximale Handkraft von < 16kg für Frauen und < 27kg für Männer wurden als Cut-Off-Werte nach Empfehlung der EWGSOP2 (54) verwendet.

3.2.2 Messung der Muskelmasse mittels Bioimpedanzanalyse

Die Zusammensetzung der Körpermasse wurde mit Hilfe der BIA ermittelt. Hierbei werden verschiedene Gewebetypen des menschlichen Körpers mittels elektrischer Leitfähigkeit nach Anlegen einer schwachen Wechselspannung bestimmt. Es wird die Gesamtmasse des menschlichen Körpers, die fettfreie Körpermasse, bestehend aus Muskel, Knochen und Flüssigkeit und die Fettmasse ermittelt.

Für die Messung wurde dem ruhig liegenden Patienten kontralateral zur operierten Körperseite sowohl eine Spannungselektrode als auch eine Messelektrode an Handgelenk und Fußgelenk der jeweils leicht abgespreizten Extremität befestigt. Die Messung wurde mittels Bioimpedanzspektroskopie durchgeführt. Das verwendete Gerät Imp SFB7 (ImpediMed, Carlsbad CA, USA) beinhaltet eine Multifrequenzanalyse und wurde mit der dazugehörigen Software SFB17 ausgewertet. Es wurden die LBM und FM bestimmt und Messdaten bei 50kHz verwendet. Zur Berechnung der appendikulären Skelettmuskelmasse (ASM; [kg]) wurde gemäß der Empfehlungen der EWGSOP2 (54) die Gleichung von Sergi et al. (157) verwendet:

$$ASM = -3,964 + (0,227 * RI) + (0,095 * weight) + (1,384 * sex) + (0,064 * Xc)$$

Formel 1: Berechnung der ASM [kg]: RI = Resistive Index [cm²/Ω], weight = Körpergewicht [kg], sex = Geschlechtskonstante (0 für Männer, 1 für Frauen), Xc = Reaktanz.

wobei:

$$RI = \frac{height^2}{Rz}$$

Formel 2: Berechnung von RI [cm²/Ω]: height = Körpergröße [cm], Rz = Widerstand aus BIA [Ω]

Die ASM wurde der Körperoberfläche angepasst und somit ein Skeletal Muscle Mass Index (SMI) berechnet:

$$SMI = \frac{ASM}{height^2}$$

Methoden

Formel 3: Berechnung für SMI [kg/m²]: ASM [kg], height = Körpergröße [m]

Die durch die EWGSOP2 (54) festgelegten Cut-off-Werte für eine reduzierte Muskelmasse sind für Männer bei < 7.00 kg/m² und für Frauen bei < 5.5 kg/m².

Sowohl die Durchführung der Messungen für die maximale Handkraft als auch die Bestimmung der Muskelmasse mithilfe der BIA erfolgten durch zwei weitere Doktoranden (Stefanie Jarmusch und Fabian Hofmeister) der Arbeitsgruppe.

3.2.3 Sarkopeniediagnose und Einteilung in Sarkopeniegrade

Probanden mit einer verminderten Handkraft und verminderten Muskelmasse gemäß den Kriterien der EWGSOP2 (54) erhielten die Diagnose Sarkopenie. Aus den klinischen Daten wurde zur Einschätzung der Sarkopenieschwere als metrisches Maß ein Z-Score ermittelt. Der Z-Score wurde für Alter und Geschlecht standardisiert und auf den Wertebereich der Standardnormalverteilung der Kohorte transformiert. Daraus ergab sich abhängig vom Geschlecht der Probanden folgende Formel:

$$a.) Z_{\sigma} = \frac{27 - \text{Handkraft}}{SD_{\text{Handkraft}}} + \frac{7,0 - \text{SMI}}{SD_{\text{SMI}}}$$

$$b.) Z_{\varphi} = \frac{16 - \text{Handkraft}}{SD_{\text{Handkraft}}} + \frac{5,5 - \text{SMI}}{SD_{\text{SMI}}}$$

Formel 4: Berechnung des Z.Scores für a.) Männer und b.) Frauen, SD = Standardabweichung, SMI = Skeletal Muscle Mass Index

Folglich gilt: Je höher der Z-score, desto ausgeprägter ist die Sarkopenie bei den Probanden.

3.3 Gewinnung des Muskelgewebes

3.3.1 Entnahme und Präparation der Muskelbiopsie

Im Rahmen einer offenen Operation der proximalen Femurfraktur wurde den Probanden an der betroffenen Körperseite ein ca 0.5 cm x 2 cm großes Muskelbiopsat des Musculus vastus lateralis entnommen. Die Entnahme erfolgte durch die Chirurgen des Instituts für Unfallchirurgie und Traumatologie der LMU München. Das Biopsat wurde unmittelbar nach der Exzision vorsichtig in ein steriles Gefäß überführt, welches vom Operationssaal in einer gekühlten Styrobox zur Weiterverarbeitung in das myologische Labor des Friedrich-Baur-Institutes, Campus Innenstadt der LMU transportiert wurde. Dort wurde es unter der Sicherheitswerkbank mithilfe von zwei Skalpelln in zwei kleinere Portionen zerteilt, wobei darauf geachtet wurde eine Quetschung des Gewebes möglichst zu vermeiden. Zuvor wurden eventuelle Fettanlagerungen vorsichtig vom Muskelbiopsat mittels Skalpell abgetragen. Der größere Anteil des Muskelstücks wur-

Methoden

de für histologische Untersuchungen verwendet und der kleinere Anteil wurde bis zur Anfertigung der Primärzellkultur für 4 bis maximal 5 Tage bei 4°C in einem mit Solution A befüllten 15-ml-Röhrchen gelagert.

3.4 Zellbiologische Methoden

Alle aufgeführten, die Zellkulturen betreffenden Arbeitsschritte wurden zur Verhinderung der Kontamination des Gewebes an einem Arbeitsplatz mit Sicherheitsstufe S2, unter einer Sicherheitswerkbank mit autoklavierten, bzw. sterilisierten Materialien unter einem Luft-Abzug durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach der Arbeit mit 70%-igem Alkohol gesäubert.

3.4.1 Anlage der Primärzellkultur

Zur Anlage der primären Myoblastenzellkulturen wurde das Biopsat zunächst aus dem 15-ml-Röhrchen in eine 10-cm-Petrischale überführt und der Solution A Überstand abgesaugt. Mithilfe eines sterilen Skalpells wurde das Biopsat in 1 mm große Stücke zerschnitten. Nach Zugabe von 5 ml Solution ATE (Solution A mit 4,5 ml Trypsin und EDTA) wurden die Muskelstücke mit einer 25-ml-Pipette aufgenommen und durch die obere Öffnung einer Wheaton Flask pipettiert. Die 10-cm-Petrischale wurde anschließend noch zweimal mit je 5 ml Solution ATE gespült, und die Spülflüssigkeit ebenfalls in die Wheaton Flask überführt, sodass ein Gesamtvolumen von 15 ml entstand. Die Muskel-Solution-ATE-Suspension wurde in der Wheaton Flask auf dem Magnetrührer für 15 Minuten stark gerührt. Um weiterhin Sterilität zu bewahren, wurde die Wheaton Flask im Anschluss mit 70% Alkohol desinfiziert und der untere Deckel nach dem Öffnen unter der Sicherheitswerkbank abgeflammt. Nach etwa einer Minute wurde die Muskel-Solution-ATE-Suspension aus der Wheaton Flask in ein mit 15 ml DMEM (supplementiert mit 10% FCS und 40 g/µl Gentamicin) befülltes 50-ml-Röhrchen vorsichtig überführt. Der oben beschriebene Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, sodass keine Gewebereste in der Wheaton Flask verblieben. Die drei 50-ml-Röhrchen mit Muskel-Solution-ATE-Suspension wurden nun bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das entstandene Zellpellet des ersten 50-ml-Röhrchens in 5 ml Skeletal Growth Medium SGM (SGM, PELOBIOTECH, Planegg/Martinsried, Deutschland), supplementiert mit 5 ml Gibco™ GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 2 ml Penicillin, resuspendiert. Die Resuspension wurde auf das Zellpellet des zweiten 50-ml-Röhrchens transferiert und darin resuspendiert. Abschließend wurde das Zellpellet des dritten 50-ml-Röhrchens gleichermaßen mit der bisher entstandenen Zellsuspension der anderen Röhrchen resuspendiert und die dar-

Methoden

aus resultierende Suspension schließlich in eine 60-cm-Petrischale überführt und bei 37 °C in 5% CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Nach frühestens 24 Stunden und spätestens drei Tagen fand der erste Mediumswechsel statt.

Die Anlage der Primärzellkultur erfolgte durch Fabiana Tanganelli, einer weiteren Doktorandin der Arbeitsgruppe.

3.4.2 Passagieren der Zellkultur

Die Kultivierung erfolgte wie oben bereits erwähnt in SGM, supplementiert mit 5 ml Gibco™ GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 2 ml Penicillin. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 70% erreichten, wurden sie passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 8-10 ml PBS gewaschen, um Zellreste und Mediumsrückstände zu entfernen. Anschließend wurde 1.5 ml Trypsin/ EDTA Lösung auf die Zellen gegeben. Die enzymatische Wirkung der Endopeptidase Trypsin führt zu einer Auflösung der Zell-Matrix-Verbindungen, sodass es zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale kommt. Der Ca²⁺-Chelator EDTA wiederum löst die Zellkontakte untereinander (158). Nach einer Einwirkzeit von drei Minuten im Inkubator bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre wurde lichtmikroskopisch überprüft, ob sich die Zellen von der Zellkulturschale gelöst hatten und der Prozess gegebenenfalls durch leichtes Beklopfen beschleunigt. Durch die Zugabe von 3.5 ml frischem SGM auf die gelösten Zellen, wurde die Enzymreaktion gestoppt. Die Zellen wurden anschließend für die Weiterkultivierung auf drei neue mit 5 ml SGM bestückten 10-cm Petrischalen aufgeteilt.

3.4.3 Kryokonservierung der Zellkultur

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach der zweiten Passage und Erreichen von > 70% Konfluenz der Zellkultur. Vorerst wurden die Zellen mit 8-10 ml PBS gewaschen und nach Zugabe von 1.5 ml Trypsin/ EDTA für drei Minuten bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert (wie bereits in 3.4.2 beschrieben). Nach vollständiger Ablösung der Zellen von dem Boden der Zellkulturschale, wurden 8 ml DMEM hinzugefügt und die Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei 12 °C und 1300 Umdrehungen pro Minute pelletiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet mit 7.5 ml Freezing Medium homogenisiert. Die Zellsuspension wurde auf fünf 1.5-ml-Kryoröhrchen aufgeteilt und für die stufenweise Abkühlung zunächst bei -80°C für maximal 5 Tage gelagert und im Anschluss bis zur weiteren Verarbeitung der Zellen erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

3.4.4 Auftauen der kryokonservierten Zellkultur

Das Kryoröhrchen wurde nach Entnahme aus dem Stickstofftank schonend zunächst bei Raumtemperatur und weiterhin durch Handwärme bis zum Erreichen eines ca. 3 cm großen noch gefrorenen Stückes aufgetaut. Anschließend wurde das Kryoröhrchen mit 70%-igem Alkohol desinfiziert und unter der Sicherheitswerkbank und der Inhalt mit dem verbliebenen gefrorenen Stück in eine mit 3.5 ml SGM befüllten 5-cm-Zellkulturschale gekippt. Verbliebene Flüssigkeit im Kryoröhrchen wurde vorsichtig mithilfe einer 1000- μ l-Pipette in die Zellkulturschale transferiert. Zur Kultivierung wurde die Zellkultur anschließend bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Um eine Seneszenz der Zellen zu verhindern, erfolgte die Messung wiederum bereits nach der zweiten Passage der Zellen, wie in 3.4.2 bereits beschrieben.

3.4.5 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat der Zellen

Am Vortag der metabolischen Analysen wurde vor der Aussaat der definierten Zellzahl zunächst die Gesamtzellzahl der Zellsuspension bestimmt. Dafür wurden die Zellen vorab wie in 3.4.2 beschrieben trypsinisiert und in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden in einem separaten Mikroreaktionsgefäß 10 μ l der trypsinisierten Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau-Lösung versetzt. Unmittelbar danach wurden 10 μ l des Ansatzes in die Zählkammer pipettiert und mithilfe eines automatisierten Zellzählers (TC20, BioRad, Hercules, California, USA) die Zellzahl und Zellviabilität ermittelt. Für die Berechnung der Zellkonzentration wurde mit der Anzahl der lebenden Zellen gerechnet. Zunächst wurde dafür ein Faktor aus der ermittelten Zellzahl lebender Zellen (N_{ist}) und der für die Aussaat definierten Zellzahl (N_{soll}) berechnet, mittels

$$f = \frac{N_{(ist)}}{N_{(soll)}}$$

Formel 5 Berechnung der Zellkonzentration

Das Verhältnis des definierten Volumens des Testmediums zum Faktor f ergab das zu pipettierende Volumen der trypsinisierten Zellsuspension, um die gewünschte Zellkonzentration für die Aussaat zu erhalten:

$$Zellsuspension (V) = \frac{\text{Testmedium (V)}}{\text{Faktor}(f)}$$

Formel 6 Berechnung des Testvolumens

Die Zellen wurden in die für das Seahorse Gerät konzipierten Zellkulturplatten (XFp Cell Culture Miniplates (103025-100), Seahorse Bioscience, Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Zellkammer ausgesät. Pro Messung wurden die acht Zellkammern der Zellkulturplatten mit Zellen von je zwei verschiedenen Proben bestückt, sodass pro Probe mindestens drei Messungen durchgeführt

Methoden

wurden. Die übrigen zwei Zellkammern wurden mit Testmedium bestückt und dienten als Kontrolle.

3.5 Metabolische Untersuchungen

3.5.1 Metabolische Analysen mittels Seahorse XFp Analyzer

3.5.1.1 Messprinzip des Seahorse XFp Analyzers

Der Seahorse XFp Analyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) ist ein Gerät, welches eine Messung von Stoffwechselprozessen in Echtzeit an lebenden Zellen einer Zellkultur ermöglicht. Die Grundlagen dieser Echtzeitanalysen basieren auf Messungen extrazellulärer Sauerstoffkonzentrationen und pH-Veränderungen, welche Rückschlüsse auf intrazelluläre Stoffwechselprozesse erlauben. Das Gerät verfügt über eine Sensorenplatte, welche mit analytspezifischen Fluorophoren für Sauerstoff und Protonen ausgestattet ist. Ändert sich während einer Messung im Zellmedium die Sauerstoff- oder Protonenkonzentration, so ändert sich auch die Fluoreszenz der Fluorophoren, deren Signale dann über ein Fiberglaslichtwellenleitersystem an das Gerät weitergeleitet und ausgewertet werden. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus und Messprinzips des Seahorse XFp Analyzers. Vor Beginn einer Messung müssen die Zellkammern der Zellkulturplatten der zu untersuchenden Zellkultur beimpft werden, sodass am Boden der Zellkammern ein einschichtiger Zellrasen wächst. Im Anschluss wird für die Messung die Sensorenplatte zunächst heruntergefahren, sodass die Messungen in einer transienten Mikrokommer zwischen dem einschichtigen Zellrasen und dem Sensor stattfinden. Durch diese räumliche Nähe des Sensors zum Zellrasen in der Mikrokommer können im Verlauf auftretende Veränderungen im Medium innerhalb kürzester Zeit detektiert werden. Nach Injektion verschiedener Substanzen über integrierte Injektionskanäle können daraufhin verschiedene Stoffwechselprozesse isoliert durchlaufen und betrachtet werden und die damit einhergehenden Stoffwechselveränderungen im Medium anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals der Fluorophoren in Echtzeit gemessen werden. Die Messungen der zu bestimmenden Parameter werden automatisch dreimal wiederholt und das Medium zwischen den Messungen durch Hochfahren der Sensorenplatte durchmischt. Die Sauerstoffkonzentration respektive Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate, OCR*) korreliert dabei mit der mitochondrialen Respiration der Zellen. Die pH-Veränderungen werden mithilfe der extrazellulären Azidifikationsrate (*extracellular acidification rate, ECAR*) erfasst und stehen im Zusammenhang mit der glykolytischen Aktivität der Zellen.

Methoden

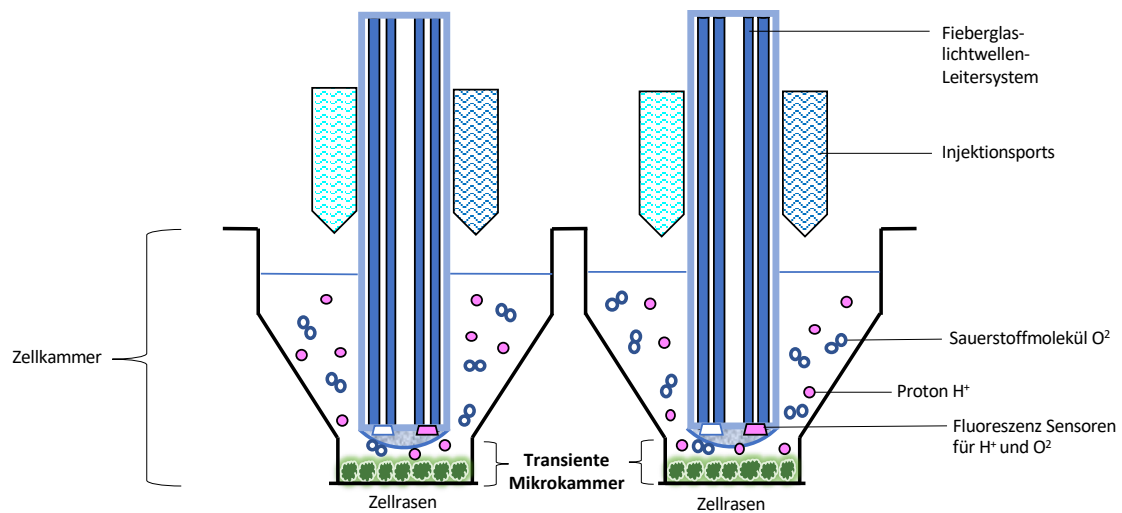


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Seahorse XFp Analyzer Aufbaus und dessen Messprinzip, exemplarisch für zwei Zellkammern. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent.)

3.5.2 Messablauf der mitochondrialen Respiration

Für die Untersuchung der mitochondrialen Respiration wurde das *XFp Cell Mito Stress Test Kit* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Bei dem Mito-Stresstest wird die *OCR* gegen die Zeit gemessen. Das Test-Kit enthält die Substanzen Oligomycin, Carbonylcyanid-4-Trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) und eine Mischung aus Antimycin A und Rotenon, welche sequenziell durch die Injektionskanäle der Sensorenplatte in das Medium der Zellkammern injiziert werden und auf verschiedene Komponenten der Atmungskette wirken. Dadurch ermöglicht der Mito-Stresstest eine Beurteilung des oxidativen Stoffwechsels der Zellen. Es werden insgesamt sechs Parameter ermittelt: Die basale Respiration, das Protonen Leck, die maximale Respiration und die nicht-mitochondriale Respiration. Außerdem werden die ATP-Produktion und die respiratorische Reservekapazität aus den gemessenen Parametern berechnet. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Messablaufes. Zu Beginn der Messung wird der Sauerstoffverbrauch der Zellen im Ausgangszustand gemessen. Nach 20 Minuten wird der ATP-Synthase-Hemmer Oligomycin injiziert, wodurch der Protonenkanal blockiert und somit die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP gehemmt wird. Durch diese Inaktivierung wird weniger Sauerstoff verbraucht und es kommt zum Absinken der *OCR*, woraus sich der zur ATP-Produktion benötigte Sauerstoffverbrauch ableiten lässt. Das Protonen-Leck repräsentiert die Differenz der tatsächlichen ATP-Produktion und der basalen Respiration. Es zeigt den Anteil, welcher aufgrund von Leckströmen über die mitochondriale Membran nicht für die Synthese von ATP genutzt werden kann. Nach weiteren 30 Minuten wird der Entkoppler FCCP injiziert. Dieser baut das mitochondriale Membranpotenzial ab, welchem eine Abnahme des Protonengradienten folgt und die Atmungskette infolgedessen zur maximalen Aktivität stimuliert. Aus dem

Methoden

damit einhergehenden Anstieg der *OCR* lässt sich die maximale Respiration bestimmen. Die Differenz aus der maximalen Respiration und der basalen Respiration ergibt die respiratorische Reservekapazität. Die Reservekapazität zeigt die Fähigkeit der Zellen auf einen gesteigerten Energiebedarf zu reagieren. Die letzte Injektion von Rotenon/ Antimycin A nach weiteren 50 Minuten bewirkt einen Abfall des Sauerstoffverbrauchs. Rotenon inhibiert Komplex I der Atmungskette und Antimycin A Komplex III, sodass die mitochondriale Respiration komplett zum Erliegen kommt. Die verbleibende niedrige *OCR* beschreibt somit die nicht- mitochondriale Respiration, welche aus anderen sauerstoffverbrauchenden Enzymen der Zellen resultiert. Die Differenz der gemessenen *OCR* zu den verschiedenen Messzeitpunkten von der *OCR* der nicht-mitochondrialen Respiration ergibt die rein durch die Mitochondrien verursachte *OCR* zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

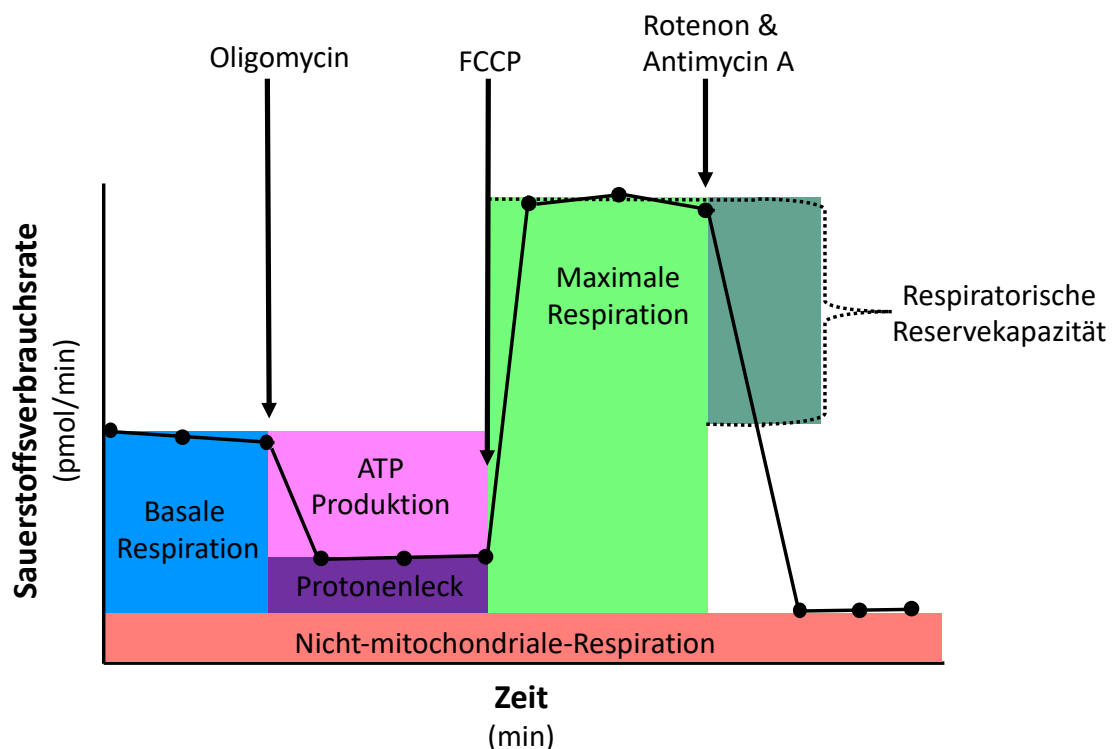


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messablaufs der mitochondrialen Respiration. Gemessen wird die Sauerstoffverbrauchsrate (*OCR*) in *pmol/min* gegen die Zeit in *min*. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent)

3.5.3 Messablauf der glykolytischen Aktivität

Für die Untersuchung der glykolytischen Aktivität der Zellen wurde das *XFp Glycolysis Stress Test Kit* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet. In diesem Test-Kit sind Glukose, Oligomycin und 2-Deoxyglucose enthalten, welche ebenfalls im Verlauf der Messung durch die Injektionskanäle ins Medium der Zellkammern injiziert werden und

Methoden

mit Enzymen der Glykolyse als auch Bestandteilen der Atmungskette der Zellen reagieren. Bei dem Glyko-Stresstest wird die extrazelluläre Azidifikationsrate, *ECAR*, gemessen und insgesamt vier Parameter bestimmt: Die Glykolyse, die glykolytische Kapazität und die nicht-glykolytische Azidifikationsrate. Der vierte Parameter, die glykolytische Reserve wiederum wird aus der Glykolyse und glykolytischen Kapazität berechnet. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des Messablaufes und der ermittelten Parameter. Es erfolgt analog zur Messung der OCR im Mito-Stresstest zunächst die Messung der *ECAR* im Ausgangszustand. Nach 20 Minuten wird Glukose injiziert, wodurch die Zellen zur Glykolyse angeregt werden und einen Anstieg der *ECAR* verursachen. Die nächste Injektion von Oligomycin erfolgt nach weiteren 20 Minuten. Durch die durch Oligomycin vermittelte Inhibition der ATP-Synthase der Atmungskette findet in den Zellen ein Wechsel von aerobem zu überwiegend anaerobem Stoffwechsel statt. Der dadurch gesteigerten Glykolyse folgt eine weitere Erhöhung der Azidifikationsrate, sodass der *ECAR* bis zu einem Maximum ansteigt. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich die glykolytische Kapazität der Zellen messen. Die Differenz aus der glykolytischen Kapazität und der zuvor gemessenen Glykolyse ergibt die glykolytische Reserve. Die Injektion von dem Glukose-Analogon 2-Deoxyglucose nach weiteren 50 Minuten bindet kompetitiv an Hexokinase, sodass die Glykolyse komplett gehemmt wird. Die resultierende niedrige *ECAR* ergibt die nicht-glykolytische Azidifikation, welche durch andere Stoffwechselprozesse der Zellen zustande kommt. Analog zum Mito-Stresstest kann nun durch die Differenz der zu den Messzeitpunkten bestimmten *ECAR* von der *ECAR* der nicht glykolytischen Azidifikation die rein durch Glykolyse bedingte *ECAR* berechnet werden.

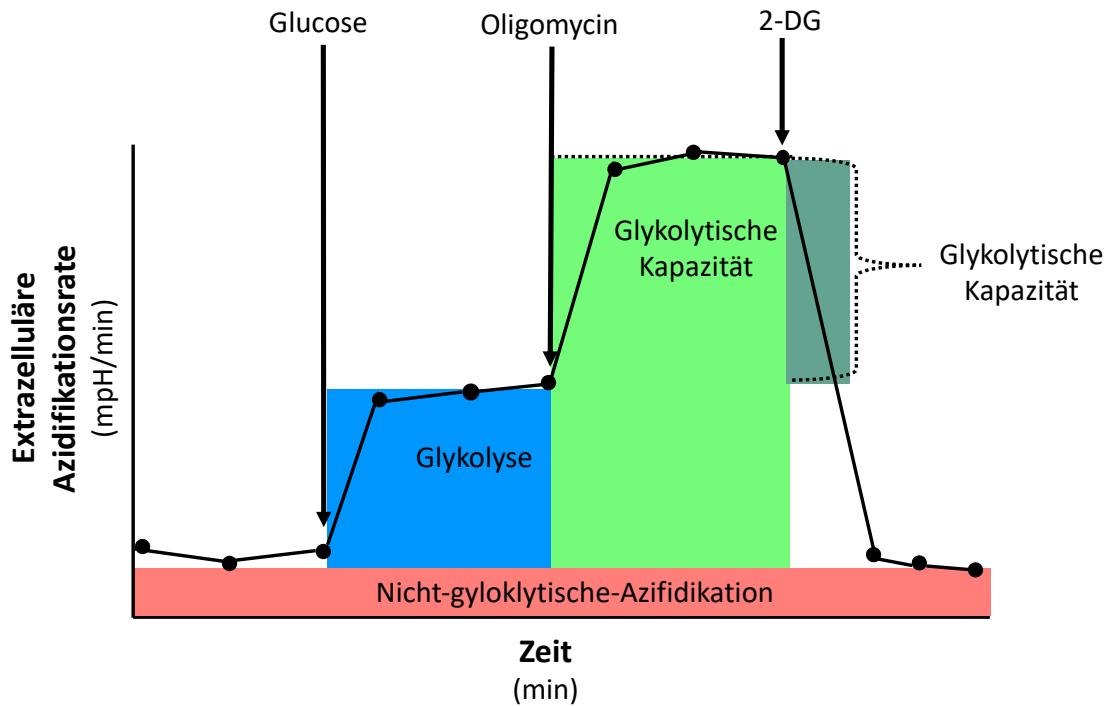


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Messablaufs der glykolytischen Aktivität. Gemessen wird die extrazelluläre Azidifikationsrate (ECAR) in mpH/min gegen die Zeit in min. (Modifizierte Darstellung nach Seahorse Bioscience, Agilent)

3.5.4 Vorbereitung der Zellen und des Sensoraufsatzes

Am Vortag der Messung wurden sowohl für den *Mito-Stresstest* als auch für den *Glyko-Stresstest* die Zellen wie in 3.4.5 beschrieben mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen in 80 μ l SGM pro Zellkammer der *Zellkulturplatte* ausgesät und für 12 Stunden bei 37° in 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert, sodass am Boden der Zellkammern ein einschichtiger Zellrasen anwachsen konnte.

Pro Messung wurde außerdem eine Kalibrierplatte am Vortag mit je 200 μ l XF *Callibrant* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) pro Kammer hydriert und über Nacht bei 37°C ohne CO₂ Begasung inkubiert.

3.5.5 Bestimmung der mitochondrialen Respiration der Zellen

Die Messung der mitochondrialen Respiration mit dem *XFp Cell Mito Stress Test Kit* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Am Tag der Messung wurde zunächst das Assaymedium für den *Mito-Stresstest* ange-setzt. Hierfür wurden 5 ml *Seahorse XF Base Medium* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit 50 μ l 100 mM Pyruvat, 50 μ l 200 mM Glutamin und 20 μ l 2.5 M Glukose supplementiert. Anschließend wurden 0.1% NaOH titriert, bis ein pH von 7.4 erreicht wurde. Das Assaymedium wurde dann bei 37°C für 15 Minuten in einem Wärmebad erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur wurden die Zellen eine Stunde vor Messbeginn mit

Methoden

dem erwärmten Assaymedium gewaschen. Vorab wurde lichtmikroskopisch überprüft, ob sich ein einschichtiger Zellrasen am Boden jeder Zellkammer der *Zellkulturplatte* gebildet hatte. Nach dem Waschschrift wurde jede Kammer mit 80 µl erwärmten Assaymedium befüllt und die Zellen bei 37°C ohne CO₂ Begasung für 60 Minuten inkubiert. Kurz vor Beginn der Messung erfolgte die Beladung der Injektionsports der Kalibrierplatte. Die Substanzen des *Mito Stress Test Kit* wurden nach Herstellerangaben mit dem Assaymedium verdünnt, sodass sich für Oligomycin und FCCP eine Konzentration von 12.5 µM und für Glukose 6.25 µM ergab. Die Ports der Kalibrierplatte wurden entsprechend eines Startvolumens von 180 µl mit den Substanzen beladen und somit 20 µl Oligomycin in Port A, 22 µl FCCP in Port B und 25 µl Rotenon/ Antimycin A in Port C pipettiert. Die Kallibrierplatte wurde anschließend in den Seahorse XFP Analyzer eingefahren, sodass das Gerät selbstständig vor jeder Messung eine Kallibration durchführen konnte und eine adäquate Funktion der Sensoren gewährleistet werden konnte. Nach erfolgter Kalibration wurde die Kalibrierplatte wieder entnommen und unmittelbar vor Beginn der Messung die 80 µl Assaymedium aus jeder Zellkammer vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und mit dem Startvolumen von 180 µl erwärmten Assaymedium befüllt. Die *Zellkulturplatte* wurde dann in den Seahorse XFP Analyzer transferiert und der Mito-Stresstest gestartet.

3.5.6 Bestimmung der glykolytischen Aktivität der Zellen

Die Messung der glykolytischen Aktivität mit dem *XFP Cell Glycolysis Stress Test Kit* wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die folgenden Arbeitsschritte gleichen bis auf wenige Ausnahmen der Durchführung des Mito-Stresstests wie in 3.5.5 beschrieben.

Vorab wurde am Tag der Messung das Assaymedium (5 ml Seahorse Base Medium und 50 µl Glutamin) angesetzt, welches mithilfe von 0.1% NaOH auf einen pH von 7.4 titriert wurde und für 15 Minuten in einem Wärmebad auf 37°C erwärmt wurde. Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle wurden die Zellen mit dem erwärmten Assaymedium eine Stunde vor Messbeginn gewaschen und anschließend bei 37°C ohne CO₂ Begasung inkubiert. Für die Injektionsports der Kalibrierplatte, welche kurz vor Beginn der Messung beladen wurden, wurden die Substanzen des *Glucose Stress Test Kit* nach Herstellerangaben mit dem Assaymedium verdünnt. Port A wurde mit 20 µl Glukose in einer Konzentration von 25 mM beladen, Port B mit 22 µl Oligomycin in einer Konzentration von 12.5 µM und Port C mit 25 µl 2-Deoxyglukose in einer Konzentration von 125 mM. Die Kalibrierplatte wurde in den *Seahorse XFP Analyzer* gefahren, sodass vor Messbeginn eine Kalibration durchgeführt werden konnte. Direkt vor der Messung wurden 80 µl Assaymedium aus jeder Zellkammer vorsichtig abgesaugt und mit

Methoden

einem Startvolumen von 180 µl Assaymedium befüllt. Die *Zellkulturplatte* wurde schließlich in den *Seahorse XFP Analyzer* überführt und der Glyko-Stresstest gestartet.

3.5.7 Nachbereitung der Zellen und Auswertung der Seahorse-Messungen

Nach den Messungen wurde das Assaymedium aus jeder Zellkammer vorsichtig abgesaugt, verworfen und die Zellen für eine weitere Zählung wie in 3.4.5 beschrieben bis auf wenige abweichende Arbeitsschritte behandelt. Nach einem Waschschrift mit 180 µl PBS pro Zellkammer wurden die Zellen mit 20 µl Trypsin EDTA pro Zellkammer trypsinisiert. Sobald sich die Zellen nach erfolgter Inkubation vom Boden der Zellkammer gelöst hatten, wurden sie mit 20 µl Trypanblau pro Zellkammer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellzählung mit dem automatisierten Zellzähler. Für die Analysen wurde mit der Gesamtzellzahl gerechnet. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe von *Wave Desktop*. Mittels Microsoft Excel wurden die Messwerte auf die gemessene Zellzahl normalisiert und für jede einzelne Zellkammer analysiert.

3.6 Messung der mitochondrialen Enzymaktivität

Die mitochondrialen Atmungskettenenzyme im Muskelhomogenat der kryokonservierten Muskelproben wurde nach der in Fischer et al., 1986 (159) beschriebenen Methode bestimmt. Die Aktivitäten von Komplex I, Komplex II+III, Komplex IV und die Citratsynthase wurden dabei spektralphotometrisch gemessen. Für alle Messungen wurde das Varian Cary® 50 UV-Vis-Spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet.

Sowohl die Herstellung des Muskelhomogenats als auch die Messungen der Atmungskettenenzymaktivität erfolgten durch die technischen Assistentinnen des Friedrich-Baur-Instituts, Campus Innenstadt.

3.6.1 Herstellung des Muskelhomogenats

Wie in Fischer et al (160) beschrieben, wurden 600 mg der kryokonservierten Muskelprobe für die Herstellung des Muskelhomogenats verwendet und mithilfe eines sterilen Skalpell in kleine Stücke zerteilt. Das zerteilte Gewebe wurde dann mit eiskaltem SETH-Puffer (250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 50 U/ml Heparin) suspendiert und schonend mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Das resultierende Homogenat wurde zentrifugiert (600 g, 4°C 10 Minuten) und der Überstand für die Bestimmung der mitochondrialen Atmungskettenenzyme verwendet.

3.6.2 Bestimmung von NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Durch den Multiproteinkomplex NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) werden wie bereits in 2.1.3 beschrieben Elektronen von NADH auf Ubichinon übertragen, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert, was bei 334 nm und einer Temperatur von 30°C photometrisch gemessen wurde. 35 Minuten vor der Bestimmung wurden 225 µl aqua dest bei laufendem Vortexer mit 25 µl Decylubiquinon vermischt und dieser Ansatz bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Außerdem wurde eine 2%-ige Rotenon-Lösung aus 2 mg frischem Rotenon und 1 ml 100%-igem Ethanol angesetzt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung des Testmixes, wofür 3540 µl des Testgemisch (20 ml 50 mM KPO₄ pH 7.4, 100 mg BSA, 15.4 ml aqua dest) mit 100 µl 0.2 M MgCl₂ (4.066g/100ml) und 80 µl 10mM NADH (7mg/ml) vermischt wurden. Für den finalen Testansatz wurden davon 480 µl in Halbmikroküvetten mit 2 µl Antimycin (2mg/ml 100% Ethanol) 10 Minuten vorinkubiert und nach Zugabe von 15 µl der Decylubiquinon-Lösung mit einem Vorlauf von 6 Minuten die Extinktionsabnahme bei 334 nm gemessen und eine Nulllinie erstellt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 20 µl Muskelhomogenat gestartet. Durch die Zugabe von 2 µl Rotenon-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die Differenz der Extinktionsabnahme nach der Zugabe von Rotenon und der Extinktionsabnahme nach Zugabe des Muskelhomogenats der Probe wurde für die Auswertung verwendet.

3.6.3 Bestimmung von Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex II/III)

Die Succinat Dehydrogenase (Komplex II) katalysiert wie bereits in 2.1.3 beschrieben die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden von der an die Succinat Dehydrogenase gebundene prosthetische Gruppe FAD übernommen. FAD wiederum überträgt die Elektronen auf Ubichinon, wobei Ubichinol entsteht. Ubichinol wird dann durch die Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) oxidiert und Cytochrom-c reduziert. Die Reduktion von Cytochrom c durch die Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase wurde bei 550 nm und einer Temperatur von 30°C photometrisch gemessen. Vorab wurde für die Messung ein Testmix vorbereitet. Hierfür wurden 4 ml des Testgemisches, hergestellt aus 2 ml 1 M KPO₄, pH 7.4, 2 ml 0.1 M EDTA (3.722g/100 ml aqua dest), 1 ml 0.2 M NaN₃ (13 mg/ml a.d.) auf 100 ml aqua dest, mit 0.6 ml Cytochrom c (14 mg/ml) vermischt. Für den finalen Testansatz wurden zu 460 µl Testgemisch in Halbmikroküvetten 20 µl 60 mmol Succinat (16.2 mg/ml a.d.) und 1 µl Rotenon gegeben und für 10 min vorinkubiert und auf die Messtemperatur von 30°C erwärmt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 20 µl Muskelhomogenat der Probe gestartet. Es wurde die Extinktionszunahme bei 550 nm gemessen.

3.6.4 Bestimmung von Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Cytochrom fungiert wie bereits in 2.1.3 beschrieben als Elektronen Transporter zwischen Komplex III und Komplex IV. Die durch Komplex IV vermittelte Oxidation von Cytochrom c wurde bei 30°C und 550nm gemessen. Zunächst wurde dafür reduziertes Cytochrom c hergestellt. Dazu wurden 578 mg Cytochrom c in 52 ml 50 mM KPO₄ pH 7.4 gelöst. Anschließend wurden die 0.9 mM Cytochrom c mit 100 µl 1.15 M Na-Dithionit (200.2 mg/ml) reduziert, was durch einen Farbumschlag von rot zu hellrot sichtbar wurde. Im Anschluss wurde unter Kühlung auf Eis und Rühren auf dem Magnetrührer für 4 Stunden Stickstoff durchgeleitet, wodurch überschüssiges Dithionit aus der Lösung entfernt wurde. Die Lösung wurde danach aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Für den finalen Testansatz wurden in Halbmikroküvetten 45 µl der reduzierten Cytochrom c Lösung mit 395 µl aqua dest und 50 µl 0.1 M KPO₄, pH 7.0 für 10 Minuten inkubiert und auf 30°C erwärmt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 10 µl Muskelhomogenat gestartet und die Extinktionsabnahme bei 550 nm für 180 Sekunden gemessen. Um den Leerwert zu bestimmen, wurde bei einer Messung statt des Muskelhomogenats 10 µl SETH Puffer dazugegeben. Cytochrom c wurde durch die Zugabe von K₃[Fe(CN)₆] nach 180 Sekunden schließlich vollständig oxidiert.

3.6.5 Bestimmung der Citratsynthase

Durch die Citratsynthase wird wie bereits in 2.1.3 beschrieben die erste Reaktion des Citratzyklus katalysiert. Die Aktivität der Citratsynthase wurde bei 37°C und 366 nm gemessen und diente als Referenzwert der Aktivität aller Atmungskettenenzyme. Vorab wurde auch hierfür ein Testmix vorbereitet und aus 1.5 ml 0.1M Triäthanolaminhydrochlorid-Lösung (TRAM), pH 8.5, 20 µl Malatdehydrogenase (MDH), 40 µl 10 mM Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Lösung (APAD) und 80 µl 70 mM Malat-Lösung hergestellt. Davon wurden 500 µl für den finalen Testansatz in Halbmikroküvetten für 10 Minuten inkubiert und auf die Messtemperatur von 37°C erwärmt. Die Messung wurde durch die Zugabe von 10 µl Muskelhomogenat und 10 µl Acetyl-CoA gestartet und die Extinktionsabnahme bei 366 nm gemessen.

3.7 Serumanalysen

Am dritten postoperativen Tag erfolgte durch zwei weitere Doktoranden (Stefanie Jarusch und Fabian Hofmeister) der Arbeitsgruppe die venöse Blutentnahme für die Serumanalysen. Die Proben wurden mit 2000 rpm 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das daraus resultierende Serum bei -80°C bis zum Tag der Analyse gelagert.

Die Analysen der Serumproben wurden durch das Institut für Laboratoriumsmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität, das Endokrinologische Labor der Medizinischen

Methoden

Klinik und Poliklinik IV der Universität München und der Abteilung für Stoffwechsel und Ernährung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchgeführt. Die Testprinzipien werden zusammengefasst in den folgenden Kapiteln kurz erläutert.

3.7.1 Bestimmung von Ferritin, Transferrinsättigung und sTfR

Sämtliche klinische Parameter wurden mit dem Cobas 800 automated analyzer (Roche, Rotkreuz, Switzerland) gemessen, wobei die Transferrinsättigung als auch der sTfR mithilfe eines immunturbidimetrischen Messverfahrens ermittelt wurde und Ferritin mittels Partikel-verstärkender immunologischer Turbidimetrie. Bei dem immunturbidimetrischen Verfahren bildet Transferrin, beziehungsweise sTfR ein Präzipitat mit einem spezifischen Antiserum, welches je nach Test entweder Anti-Human-Transferrin-Antikörper oder Anti-sTfR-Antikörper enthielt. Die Extinktionsabnahme durch den Antigen-Antikörperkomplex wurde daraufhin photometrisch bestimmt. Das Prinzip der Partikel-verstärkenden Immunturbidimetrie beruht auf einer Agglutination von Ferritin mit Anti-Human-Ferritin-Antikörper beschichteten Latexpartikeln, wobei wiederum die resultierende Extinktionsabnahme photometrisch bestimmt wurde.

3.7.2 Bestimmung der Citratzyklusmetabolite

Die Analysen der Citratzyklusmetabolite wurden mit einem Hochdruck-Flüssigkeitschromatografen (1200 Agilent, Waldbronn, Deutschland), gekoppelt mit einem Tandem Massenspektrometer (40000 QTRAP Sciex, Darmstadt, Deutschland) (HPLC-MS/MS) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im negativen Eisenmodus mittels Elektrospray-Ionisation (ESI), nach der in Marchioro et al. 2020 (161) beschriebenen Methodik, welche im Folgenden kurz zusammengefasst ist. Vor Messbeginn wurden 50 µl Plasma in 400 µl Methanol präzipitiert und für 10 Minuten bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 100 µl unter Stickstoffstrom getrocknet und in 50 µl H₂O rekonstituiert. Anschließend wurden 5 µl der Probe in eine analytische Säule injiziert und chromatographisch aufgetrennt. Hierfür wurde eine Kinetex F5 core-shell HPLC-Säule (Kinetex F5, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). verwendet, mit einer Gehäuselänge von 150 mm, einem Innendurchmesser von 2.1 mm und 2.6 µm Partikelgröße. Die Flussgeschwindigkeit der Gradientenelution betrug 250 µl/min. Die mobile Phase der Gradientenelution setzte sich zusammen aus Phase A mit H₂O und 1% Formaldehyd und Phase B mit Methanol/ Isopropanol (50/50) und 1% Formaldehyd. Bei der Gradientenelution wurde 1% B in 1 Minute auf 65% B erhöht und dann für 6 Minuten gehalten. Anschließend wurde es in 0.5 Minuten zurück auf die Anfangsbedingungen gefahren.

3.7.3 Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin D, Calciferol

Die Quantifizierung von 25-Hydroxy-Vitamin D (25-(OH)D) erfolgte mithilfe des IDS iSYS multidiscipline automated analyzer (Immundiagnostic System Limited, Boldon, UK). Das Testprinzip des IDS-iSYS 25-Hydroxy-Vitamin D Tests basiert auf der Chemilumineszenz-Immunoassay-Technologie. In einer Vorbehandlung der Serumprobe erfolgte zunächst die Denaturierung des Vitamin-D bindenden Proteins (VDBP). Danach wurde die vorbehandelte Probe mit dem Testpuffer neutralisiert und anschließend ein spezieller, mit Acridin markierter Anti-25-(OH)D Antikörper hinzugefügt. Nach einem Inkubationsschritt wurden an 25-(OH)D gebundene Magnetpartikel hinzugefügt und die Probe nochmals inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Magnetpartikel mittels Magneten fixiert und die Probe gewaschen. Durch die nachfolgende Zugabe von Triggersubstanzen wurde die Messung gestartet. Das durch die Acridinmarkierung ausgesendete Licht verhält sich dabei umgekehrt proportional zu der Konzentration von 25-(OH)-D der Probe.

3.8 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software SPSS Version 29 (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Daten der Patientencharakteristika als auch Seahorse- und Serumanalysen wurden nach Sarkopeniegraden unterteilt. Für diese Variablen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die jeweiligen Sarkopeniegrade berechnet. Die Patientencharakteristika wurden zusätzlich noch geschlechtergetrennt analysiert. Da die Werte mit Ausnahme des Geschlechts metrisch skaliert und normalverteilt waren, wurden die Unterschiede der Patientencharakteristika zwischen den Geschlechtern mittels t-Test für unabhängige Stichproben auf Signifikanz geprüft. Auf Normalverteilung wurden sämtliche Parameter mittels Kolmogorov-Smirnov Test, sowie mittels Histogramme geprüft. Mithilfe der Korrelation nach Bravais-Pearson wurden sowohl für einzelne klinische Parameter, die Atmungskettenenzym-Aktivitäten, die Seahorsemesswerte der basalen Respiration und Glykolyse als auch die Serumanalysen auf Zusammenhänge mit dem Z-Score untersucht. Zusätzlich wurden basale Respiration und Glykolyse auf eine Korrelation mit Handkraft und SMI geprüft. Sofern ein linearer Zusammenhang bestand, wurde zur Beurteilung der Effektstärke und als Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs für diese Variablen der Korrelationskoeffizient nach Pearson r angegeben. Zur Prüfung des Einflusses von Geschlecht und Alter auf die Korrelation zweier Variablen wurde mittels multipler Regressionsanalyse eine Adjustierung durchgeführt. Hierfür wurde der standardisierte Regressionskoeffizient β angegeben. Alle statistischen Analysen wurden mit einem p -

Methoden

Wert < 0.05 als signifikant angesehen. Es wurde keine Korrektur für die Multiplizität von statistischen Tests angewandt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Für die NEUSARC Studie wurden insgesamt 42 Probanden von November 2017 bis März 2019 rekrutiert. Hiervon wurden 31 Probanden in der vorliegenden Arbeit eingeschlossen. Der Sarkopeniegrad konnte mithilfe der unter 4.2 beschriebenen klinischen Untersuchungen bei jedem der 31 Probanden ermittelt werden. Myoblastenkulturen konnten ebenfalls von allen 31 Probanden generiert werden und mittels der Seahorse Analysen in Echtzeit metabolische Profile erstellt werden. Unter Berücksichtigung der Fragestellung nach Veränderungen des Metabolismus im Rahmen der Sarkopenie, wurden deshalb diese 31 Probanden in die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Für die Untersuchung der Atmungskettenenzyme war Material von insgesamt 8 (25.8%) der 31 Probanden verfügbar. Ausreichend Material für die Serumanalysen war von 24 (77.4%) der 31 Probanden für die Bestimmung von Vitamin D und der Eisenwerte verfügbar, sowie von 18 (58.1%) Probanden für die Untersuchung der Citratzyklusmetabolite, beziehungsweise von 17 Probanden (54.8%) für die Citratmessungen.

4.1.1 Patientencharakteristika und Einteilung in Sarkopeniegrade

Das Patientenkollektiv von 31 Probanden mit einem mittleren Alter von 82 ± 6 Jahren umfasste 14 Männer (45.2%) und 17 Frauen (54.8%). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Patientencharakteristika der Kohorte, getrennt nach Geschlecht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern zeigte sich in der Körpergröße ($p < 0.001$), der Handkraft ($p = 0.007$) und dem SMI ($p = 0.011$). Die weiblichen Probanden waren mit einer Größe von $\bar{x} = 163.2$ cm im Durchschnitt ca. 12 cm kleiner als die männlichen Probanden ($\bar{x} = 175.4$ cm) und verfügten im Vergleich zu den Männern über eine geringere Handkraft mit $\bar{x}_{\text{Frauen}} = 19.4$ kg, versus $\bar{x}_{\text{Männer}} = 27.0$ kg und niedrigeren SMI mit $\bar{x}_{\text{Frauen}} = 6.4$ kg/m², versus $\bar{x}_{\text{Männer}} = 7.4$ kg/m².

	Gesamtkohorte (n = 31)	Männer (n = 14)	Frauen (n = 17)	p- Wert
Alter [Jahre]	82.2 (± 6.3)	82.7 (± 6.0)	81.7 (± 6.7)	0.344
Körpergröße [cm]	168.7 (± 9.2)	175.4 (± 9)	163.2 (± 5)	< 0.001
Körpergewicht [kg]	70.9 (± 13.7)	74.6 (± 15)	67.8 (± 12)	0.085
BMI [kg/m ²]	24.9 (± 4.1)	24.2 (± 3.9)	25.4 (± 4.2)	0.198
Handkraft [kg]	22.8 (± 8.8)	27.0 (± 9.5)	19.4 (± 6.7)	0.007
SMI [kg/m ²]	6.9 (± 1.2)	7.4 (± 1.2)	6.4 (± 1.1)	0.011
Z-Score	-0.9 (± 1.8)	-0.4 (± 1.8)	-1.4 (± 1.7)	0.065

Tabelle 1: Patientencharakteristika der Gesamtkohorte mit Mittelwert (\pm Standardabweichung) und geschlechtergetrennt; p-Werte berechnet mit t-Test für unabhängige Stichproben

Ergebnisse

Die Unterteilung der Kohorte erfolgte zusätzlich nach Sarkopeniegraden und Geschlecht (Tabelle 2). Daraus wird ersichtlich, dass die männlichen, sarkopenen Probanden im Durchschnitt mit einem Alter von $\bar{x}_{\text{Männer}} = 86.3$ Jahren älter waren als die sarkopenen Probandinnen mit einer Alter von $\bar{x}_{\text{Frauen}} = 79.5$ Jahren. Aufgrund der kleinen Probenzahl der sarkopenen Probanden (Männer= 2 und Frauen= 3) wurde auf einen statistischen Vergleich der einzelnen Gruppen zwischen den Geschlechtern verzichtet. Eine Korrelation steigenden Alters mit dem Z-Score konnte nicht festgestellt werden ($r = 0.225$, $p = 0.224$). Von den 31 Probanden waren insgesamt 16 Probanden nicht-sarkopen (51.6%), 10 prä-sarkopen (32.3%) und 5 Probanden sarkopen (16.1%). Hier von waren unter den 14 männlichen Probanden 5 nicht-sarkopen (35.7%), 7 prä-sarkopen (50.0%) und 2 sarkopen (14.3%). Die 17 Frauen unterteilten sich in 11 nicht-sarkopene (64.7%), 3 prä-sarkopene (17.6%) und 3 sarkopene (17,6%) Probandinnen.

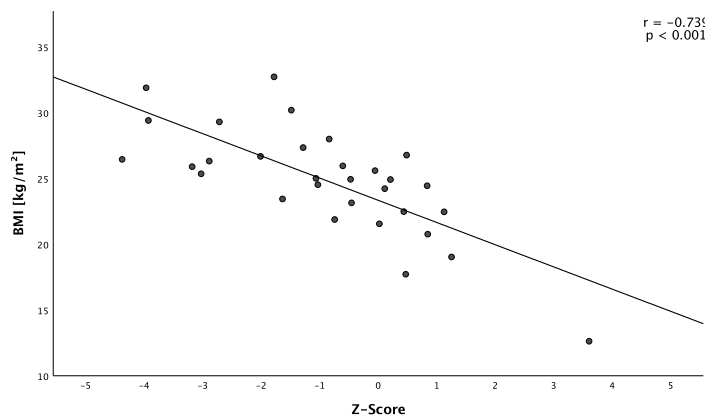
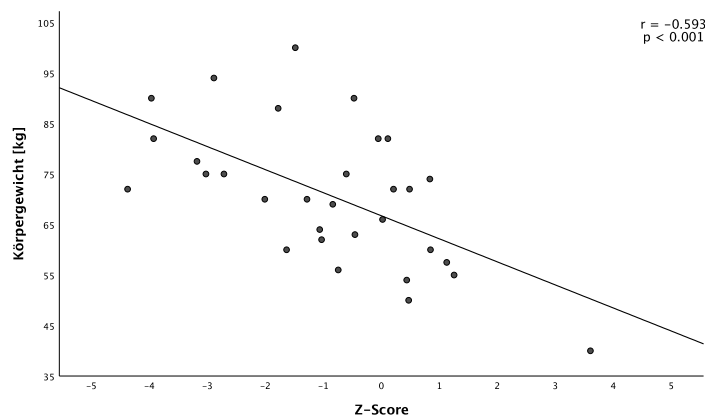
	Männer (n = 14)			Frauen (n = 17)		
	nicht- sarkopen (n = 5)	prä-sarkopen (n = 7)	sarkopen (n = 2)	nicht- sarkopen (n = 11)	prä-sarkopen (n = 3)	sarkopen (n = 3)
Alter [Jahre]	82.1 (±5.9)	82.0 (±7.1)	86.3 (±1.0)	81.2 (±7.3)	85.9 (±4.5)	79.5 (±5.8)
Körpergröße [cm]	177.8 (±11.0)	175.4 (±7.0)	169.0 (±13.0)	163.2 (±4.0)	157.3 (±3.0)	169.3 (±1.0)
Körpergewicht [kg]	79.9 (±12.0)	78.3 (±11.0)	48.8 (±12.0)	72.2 (±11.0)	64.3 (±9.0)	55.0 (±5.0)
BMI [kg/m ²]	25.1 (±1.2)	25.4 (±2.7)	17.5 (±7.0)	27.0 (±3.4)	25.9 (±3.0)	19.2 (±1.5)
Handkraft [kg]	37.6 (±5.8)	22.5 (±3.9)	16.4 (±4.2)	23.0 (±5.3)	12.0 (±2.7)	13.4 (±2.4)
SMI [kg/m ²]	8.0 (±1.1)	7.5 (±0.6)	5.5 (±1.5)	6.7 (±0.9)	6.8 (±1.3)	5.0 (±0.5)
Z-Score	-2.0 (±1.4)	0.0 (±0.7)	2.4 (±1.8)	-2.2 (±1.4)	-0.6 (±0.9)	0.9 (±0.4)

Tabelle 2: Patientencharakteristika mit Mittelwert (±Standardabweichung) geschlechtergetrennt und unterteilt nach Sarkopeniegraden

Die Einteilung in Sarkopeniegrade erfolgte anhand der Cut-Off-Werte für Handkraft und SMI nach den Kriterien der EWGSOP2 (54), wie in 4.2.3 beschrieben. Demnach wurden die männlichen Probanden mit einer reduzierten Handkraft < 27kg und einem reduzierten SMI < 7kg/m², sowie die weiblichen Probanden mit einer reduzierten Handkraft < 16kg und einer reduzierten SMI < 5.5 kg/m² als sarkopen eingestuft. Probanden mit reduzierter Handkraft, bei gleichzeitig nicht reduziertem SMI wurden als prä-sarkopen definiert. Insgesamt lagen die Messungen bei 9 (64.3%) der männlichen Probanden unter dem Cut-Off-Wert von 27 kg und bei 6 (41.2%) der weiblichen Probanden unter dem Cut-Off-Wert von 16 kg. Bei den Messungen des SMI lagen 2 (14.3 %) der

Ergebnisse

männlichen und 3 (17.6%) der weiblichen Probanden unter dem jeweiligen Cut-Off-Wert. Neben den zur Berechnung des Z-Scores verwendeten Variablen (Handkraft und SMI), korrelierten Körpergewicht ($r = -0.593$ $p < 0,001$) und BMI ($r = -0.739$ $p < 0,001$) signifikant mit dem Z-Score. Je höher der Z-Score und somit sarkopener der Patient, desto niedriger waren das Körpergewicht (Abbildung 6) und der BMI (Abbildung 7). Nach Adjustierung durch das Geschlecht, sowie Geschlecht und Alter waren diese Zusammenhänge gleichbleibend signifikant.



4.2 Aktivität der Atmungskettenenzyme

Hinsichtlich der Fragestellung, ob mitochondriale Enzymkomplexe sarkopener, geriatrischer Patienten beeinträchtigt sind, wurde zunächst die Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenenzyme aus Muskelhomogenat der Muskelbiopsien des Musculus vastus lateralis bestimmt. Aufgrund der limitierten Menge des Muskelgewebes war für die Herstellung des Muskelhomogenats und im Zuge dessen für die Bestimmung der Atmungskettenenzymaktivität ausreichend Material von 8 Probanden verfügbar. Darunter waren 3 nicht-sarkopene (2 männlich und 1 weiblich), 3 prä-sarkopene (2 männlich und 1 weiblich) und 2 sarkopene (2 weibliche) Probanden. Es wurde die Aktivität von Komplex I, Komplex II/ III und Komplex IV bestimmt. Als Referenzwerte für die Komplexe I bis IV wurde zusätzlich die Citratsynthase-Aktivität bestimmt, worauf die Kom-

Ergebnisse

plexaktivitäten normiert wurden. In der Regressionsanalyse zeigte die Komplex-I-Aktivität normiert zur Citratsynthase eine deutliche Tendenz der negativen Korrelation zum Z-score mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0.661$ und einer grenzwertigen Signifikanz von $p = 0.074$. Je höher der Z-Score und somit sarkopener der Proband, desto niedriger war die Aktivität von Komplex I (Abbildung 8). Aufgrund der grenzwertigen Signifikanz in Assoziation mit dem Z-Score für Komplex I wurde der Zusammenhang mithilfe der multiplen Regressionsanalyse um Geschlecht und Alter adjustiert. Hierbei zeigte sich für das Geschlecht eine Zunahme der Signifikanz ($\beta = -0.812$, $p = 0.055$), welche nach zusätzlicher Adjustierung durch das Alter wieder zurückging ($\beta = 0.0735$, $p = 0.098$). Komplex II/III zeigte ebenfalls einen negativen Trend im Zusammenhang zum Z-Score, jedoch ohne Signifikanz ($r = -0.397$, $p = 0.331$) (Abbildung 9). Für Komplex IV konnte kein Zusammenhang zur Sarkopenie festgestellt werden (Abbildung 10). Sowohl für die Aktivität von Komplex II/III und Komplex IV wurde von der Adjustierung nach Geschlecht und Alter aufgrund fehlender Hinweise auf Korrelation abgesehen. Ebenso wurden die Messungen aufgrund der geringen Probenanzahl nicht geschlechtergetrennt untersucht.

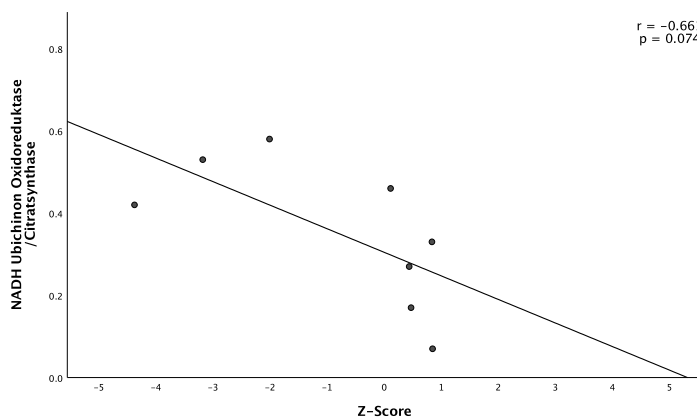


Abbildung 8: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score

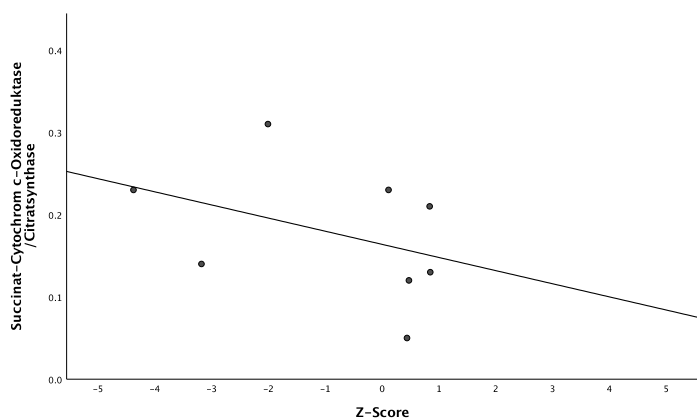


Abbildung 9: Komplex II/III (Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score

Ergebnisse

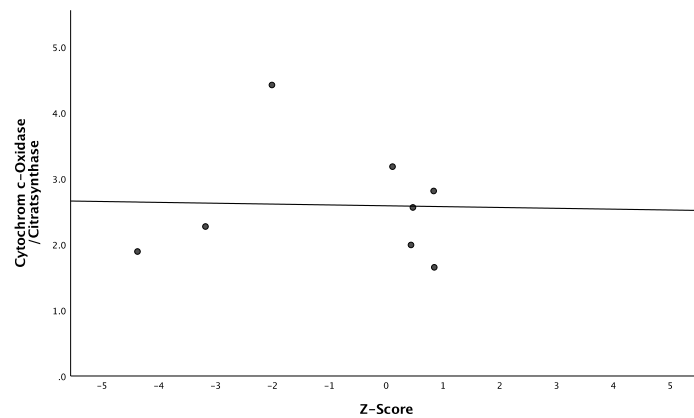


Abbildung 10: Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) Aktivität in Korrelation mit dem Z-Score

4.3 Metabolische Analysen

Zur Feststellung möglicher Veränderungen des Metabolismus sarkopener, geriatrischer Patienten, wurden von den Myoblastenkulturen der Muskelbiopsien Echtzeitanalysen mit dem Seahorse XFp Analyzer durchgeführt. Für die Messungen des Metabolismus konnten primäre Myoblastenkulturen von allen 31 Probanden aus den Muskelbiopsien des Musculus vastus lateralis generiert werden. Hierbei konnte weder für den Mito-Stresstest noch für den Glyko-Stresstest ein Zusammenhang mit den Sarkopeniegraden festgestellt werden. Aus

Tabelle 3 lässt sich entnehmen, dass die Mittelwerte der einzelnen Parameter des Glyko-, also auch Mito-Stresstests zwischen den Sarkopeniegraden kaum Unterschiede aufweisen. Da die nicht glykolytische Azidifikationsrate und nicht mitochondriale Respiration durch andere Stoffwechselprozesse der Zellen zustande kommen und keinen relevanten Messwert der Tests darstellen, wurde zur Übersichtlichkeit auf die Darstellungen der Mittelwerte für diese Parameter in

Tabelle 3 verzichtet.

Ergebnisse

		Gesamtkohorte (n= 31)		
		nicht- sarkopen (n = 16)	prä-sarkopen (n = 10)	sarkopen (n = 5)
Glyko- Stresstest [mpH/min]	Glykolyse	1.9 (±0.8)	1.7 (±1.2)	1.9 (±1.1)
	Glykolytische Kapazität	2.6 (±1.0)	2.5 (±1.7)	2.6 (±1.6)
	Glykolytische Reserve	0.7 (±0.4)	0.7 (±0.5)	0.7 (±0.5)
Mito- Stresstest [pmol/min]	Basale Respiration	1.9 (±0.7)	1.8 (±0.5)	1.9 (±0.7)
	ATP-Produktion	1.5 (±0.7)	1.1 (±0.7)	1.6 (±0.6)
	Maximale Respiration	4.0 (±1.8)	3.7 (±1.0)	3.9 (±2.1)
	Respiratorische Reservekapazität	2.1 (±1.3)	1.9 (±0.7)	2.0 (±1.6)
	Protonen Leck	0.4 (±0.3)	0.7 (±0.5)	0.3 (±0.1)

Tabelle 3: Mittelwerte (±Standardabweichung) des Glyko-Stresstests [mpH/min] und Mito-Stresstest [pmol/min] unterteilt in Sarkopeniegrade

4.3.1 Ergebnisse des Mito-Stresstests

Bei dem Mito-Stresstest wurde wie in 4.5.2 beschrieben die OCR und somit der Sauerstoffverbrauch der Zellen in pmol/min gegen die Zeit ermittelt. Hierbei wurde der Sauerstoffverbrauch unter normalen Bedingungen, die basale Respiration, zunächst ohne Inhibition einzelner Komponenten der Atmungskette gemessen. In der Regressionsanalyse zeigte die basale Respiration für die Myoblastenkulturen der 31 Probanden eine nicht signifikante, abnehmende Tendenz ($r = -0.139$, $p = 0.456$) des Sauerstoffverbrauchs in Korrelation mit dem Z-Score (Abbildung 11). Nach Adjustierung durch das Geschlecht ($\beta_1 = -0.107$, $p = 0.562$) und das Alter ($\beta_2 = -0.102$, $p = 0.577$) bestand diese Tendenz weiterhin, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

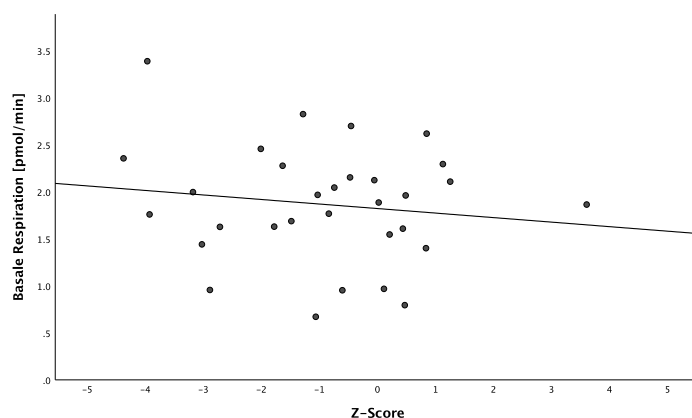


Abbildung 11: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit dem Z-Score

Zur Überprüfung, ob sich die beobachtete Tendenz auf eine der zur Berechnung des Z-Scores verwendeten Variablen zurückführen lässt, wurde die basale Respiration zusätzlich mit der Handkraft, sowie dem SMI korreliert. Wie in Abbildung 12 zu sehen war die mitochondriale Respiration in Bezug auf die Handkraft ($r = -0.009$, $p = 0.963$) und

Ergebnisse

SMI ($r= 0.047$, $p= 0.800$) (Abbildung 13) nahezu gleichbleibend. Auch nach Adjustierung auf Geschlecht und Alter für Handkraft ($\beta_1=0,045$, $p= 0.793$; $\beta_2= 0.038$, $p= 0.818$) und SMI ($\beta_1=0.099$, $p= 0.571$; $\beta_2= 0.099$, $p= 0.579$) änderte sich dies nicht.

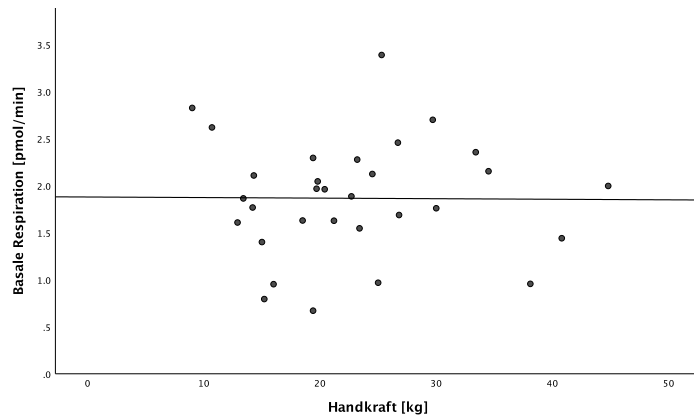


Abbildung 12: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit der Handkraft [kg]

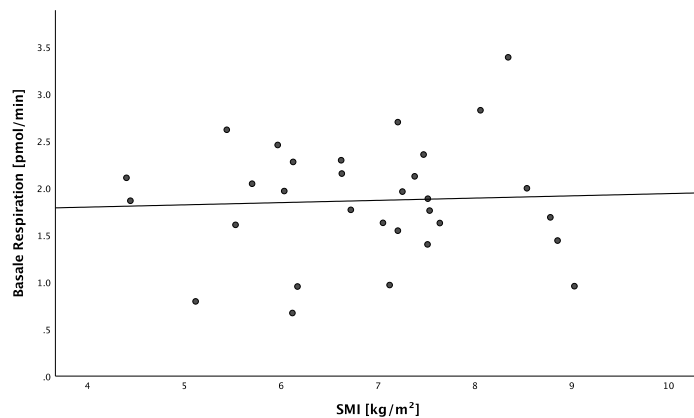


Abbildung 13: Basale Respiration [pmol/min] in Korrelation mit SMI [kg/m²]

Darüber hinaus konnten auch in isolierter Betrachtung, unabhängig vom Sarkopeniegrad, oder Z-Score keine geschlechterspezifischen Unterschiede für die basale Respiration festgestellt werden (Abbildung 14). Der Seahorse XFp Analyzer misst im Rahmen des Mito-Stresstests wie in 4.5.2 beschrieben neben der OCR der basalen Respiration, auch die OCR des Protonenlecks, der maximalen Respiration, sowie der nicht-mitochondrialen Respiration. Aus diesen Werten lassen sich zudem die OCR der ATP-Produktion und der respiratorischen Reservekapazität berechnen. Da sich bei diesen Variablen analog zur basalen Respiration in der statischen Analyse die gleiche Tendenz zeigte, ebenfalls ohne statistische Signifikanz, wurde auf die graphische Darstellung dieser Variablen in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Ergebnisse

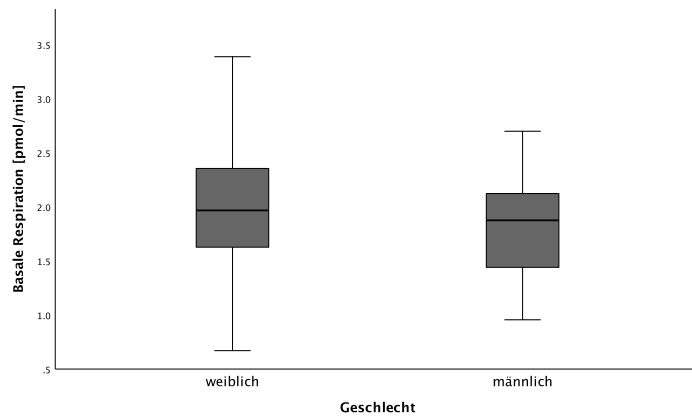


Abbildung 14: Boxplot der basalen Respiration [pmol/min] aufgetragen gegen Geschlecht

4.3.2 Ergebnisse des Glyko-Stresstests

Mit dem Glyko-Stresstest wurden pH-Veränderungen anhand der extrazellulären Azidifikationsrate (ECAR) im Medium der Myoblastenkulturen in mpH/min gegen die Zeit gemessen. Zunächst wurde die Glykolyse der Myoblastenkulturen, nach Zugabe von Glukose im Ausgangszustand gemessen. Hierbei zeigte sich in Korrelation mit dem Z-Score ähnlich wie bei der basalen Respiration für die Myoblastenkulturen eine abnehmende Tendenz der ECAR mit steigendem Z-Score, jedoch ebenfalls keine Signifikanz ($r = -0.270$, $p = 0.141$) (Abbildung 15).

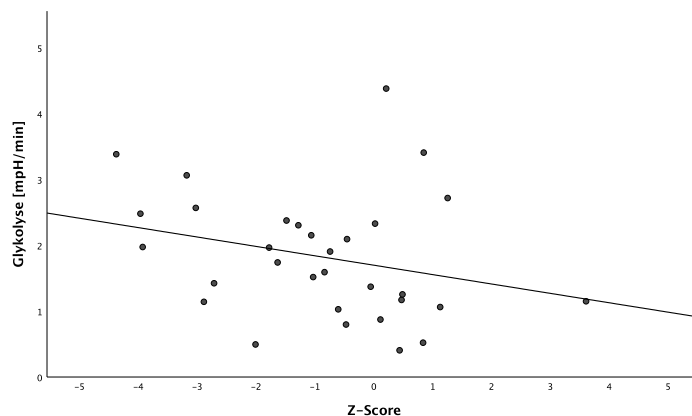


Abbildung 15: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation mit dem Z-Score

Für die Glykolyse wurde entsprechend zur Überprüfung der beobachteten Tendenz ebenfalls die Handkraft als auch SMI in Korrelation zum Z-Score untersucht. Für die Handkraft ($r = 0.192$, $p = 0.300$) (Abbildung 16) als auch den SMI ($r = 0.219$, $p = 0.237$) ließ sich hierfür eine steigende Tendenz der ECAR beobachten, jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 17). Nach Adjustierung für Geschlecht, sowie Geschlecht und Alter zeigte sich für keine der drei Variablen Z-Score ($\beta_1 = -0.259$, $p = 0.150$, $\beta_2 = -0.227$, $p = 0.217$), Handkraft ($\beta_1 = 0.211$, $p = 0.212$, $\beta_2 = 0.156$, $p = 0.351$) und SMI ($\beta_1 = 0.237$, $p = 0.166$, $\beta_2 = 0.246$, $p = 0.167$) eine Änderung.

Ergebnisse

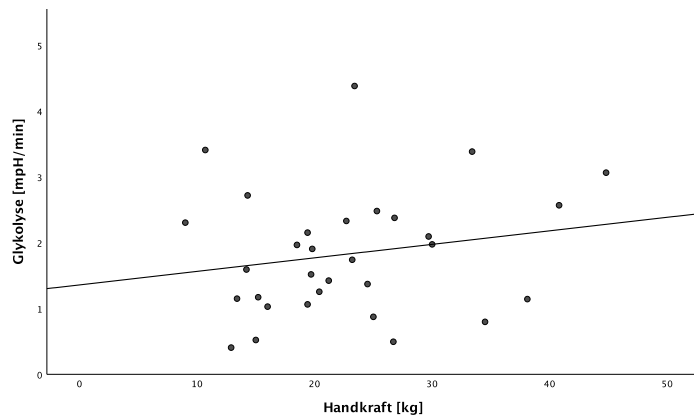


Abbildung 16: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation zur Handkraft [kg]

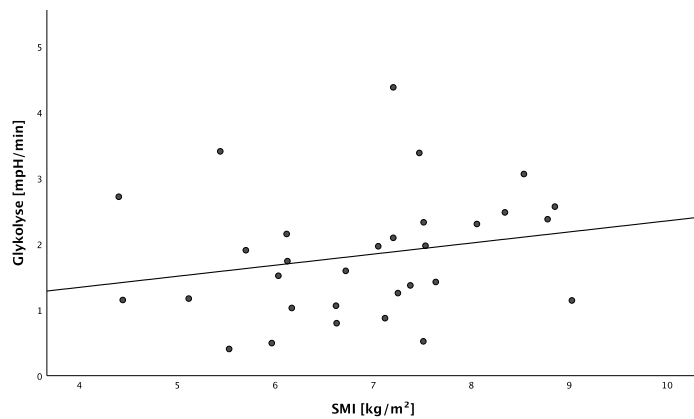


Abbildung 17: Glykolyse [mpH/min] in Korrelation mit SMI [kg/m²]

Wie auch bei der basalen Respiration konnte bei der Glykolyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern unabhängig vom Sarkopeniegrad und Z-Score festgestellt werden (Abbildung 18). Im Rahmen des Glyko-Stresstests wurden ebenfalls weitere Parameter durch den Seahorse XFp Analyzer ermittelt, wie in 4.5.3 beschrieben. Für die anderen drei Variablen im Rahmen des Glyko-Stresstests (glykolytische Kapazität, glykolytische Reserve und nicht glykolytische Azidifikation) konnten ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet werden, weshalb auch hier auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

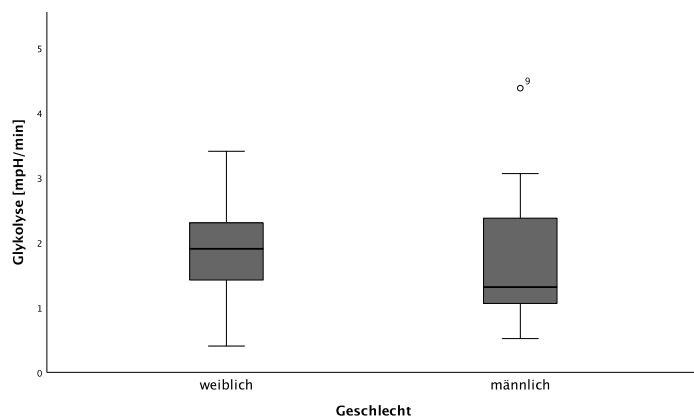


Abbildung 18: Boxplot der Glykolyse [mpH/min] aufgetragen gegen Geschlecht

Ergebnisse

4.3.3 Serumanalysen

Für die Untersuchungen des Einflusses multisystemischer Faktoren auf die Mitochondrien der geriatrischen und sarkopenen Patienten, wurde den Probanden am dritten postoperativen Tag Blut entnommen. Für die Serumanalysen konnte ausreichend Material bei 24 (77%) von den 31 Probanden gewonnen werden. Für diese 24 Probanden, darunter 11 männliche und 13 weibliche Probanden, erfolgte die Bestimmung von Vitamin D und für die Analyten des Eisenstoffwechsels, Ferritin, Transferrinsättigung und sTfR. Für die Citratzyklusmetabolite war ausreichend Material von 18 (58%) der 31 Probanden verfügbar, beziehungsweise Material von 17 (54%) Probanden für die Bestimmung von Citrat, welche sich in 9 männliche, respektive 8 männliche für Citrat und 9 weibliche Probanden unterteilten. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verfügbare Probenanzahl der einzelnen Serumwerte, sowie die Mittelwerte und Standardabweichung der Analyten, unterteilt in Sarkopeniegrade. Zwischen den Mittelwerten der Serumanalysen zeigte sich zwischen den Geschlechtern kein signifikanter Unterschied.

	Anzahl der Probanden mit Serumanalysen			
	nicht-sarkopen	prä-sarkopen	sarkopen	
Anzahl (n)	13	7	4	24
Vitamin D [$\mu\text{g/l}$]	29.2 (± 9.7)	25.8 (± 6.6)	14.7 (± 3.7)	
Ferritin [$\mu\text{g/l}$]	324.4 (± 240.9)	243.9 (± 120.4)	439.0 (± 405.6)	
Transferrinsättigung [%]	14.2 (± 6.6)	23.4 (± 6.8)	38.3 (± 28.1)	
sTfR [mg/l]	2.9 (± 0.9)	2.3 (± 0.4)	2.7 (± 0.7)	
Anzahl (n)	10	5	3	18
Fumarat [$\mu\text{mol/l}$]	1.0 (± 0.2)	1.4 (± 0.3)	1.9 (± 0.4)	
Succinat [$\mu\text{mol/l}$]	5.1 (± 1.1)	5.8 (± 1.5)	9.2 (± 2.0)	
Malat [$\mu\text{mol/l}$]	4.4 (± 0.8)	6.0 (± 1.5)	9.3 (± 1.6)	
Alpha-Ketoglutarat [$\mu\text{mol/l}$]	121.8 (± 85.4)	99.5 (± 37.5)	123.0 (± 4.0)	
Anzahl (n)	9	5	3	17
Citrat	60.0 (± 14.2)	53.1 (± 8.3)	126.4 (± 60.4)	

Tabelle 4: Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Serumanalysen unterteilt nach Sarkopeniegraden und Angabe der verfügbaren Probenanzahl (n)

4.3.4 Ergebnisse der Vitamin D Analysen

Anhand der Mittelwerte für Vitamin D lässt sich eine deutliche Abnahme mit steigendem Sarkopeniegrad beobachten (Tabelle 4). So zeigte sich in der Regressionsanalyse für die Vitamin-D-Konzentration im Serum in Korrelation mit dem Z-Score ein signifi-

Ergebnisse

kant erniedrigter Serumspiegel ($r = -0.063$, $p < 0,001$). Je höher der Z-Score, desto niedriger war die Vitamin-D-Konzentration im Serum der Probanden (Abbildung 19). Dieser signifikante Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung durch das Geschlecht ($\beta_1 = -0.649$, $p < 0.001$) und Alter ($\beta_2 = -0.640$, $p < 0.001$) ohne wesentliche Veränderung des Korrelationskoeffizienten r und Regressionskoeffizienten β bestehen.

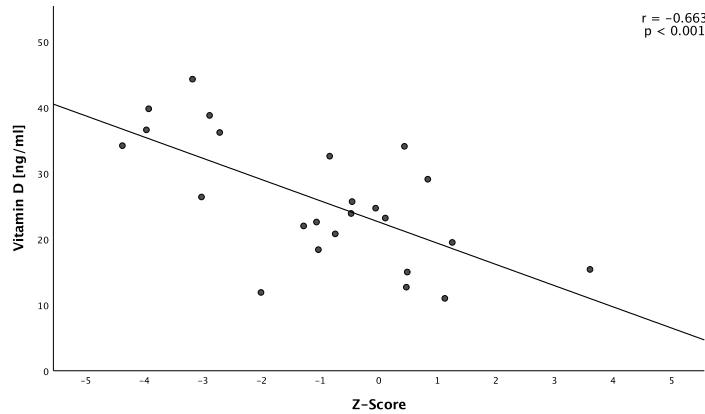


Abbildung 19: Vitamin D [ng/ml] in Korrelation mit dem Z-Score

4.3.5 Ergebnisse für Ferritin, Transferrinsättigung und sTfR

Die Messwerte von Ferritin, der Transferrinsättigung und sTfR zeigten für alle Parameter eine steigende Tendenz der Serumkonzentration in Bezug auf den Sarkopeniegrad (Tabelle 4), wobei sich für die Serumkonzentration von Ferritin und sTfR zunächst ein Abfall der Mittelwerte von nicht-sarkopene auf prä-sarkopene Probanden beobachten ließ, mit anschließendem Anstieg der Serumkonzentration bei den sarkopenen Probanden. Entsprechend zeigte sich für Ferritin ($r = 0.124$, $p = 0.564$) (Abbildung 20) und sTfR ($r = 0.075$, $p = 0.728$) (Abbildung 21) keine signifikante Korrelation mit dem Z-Score.

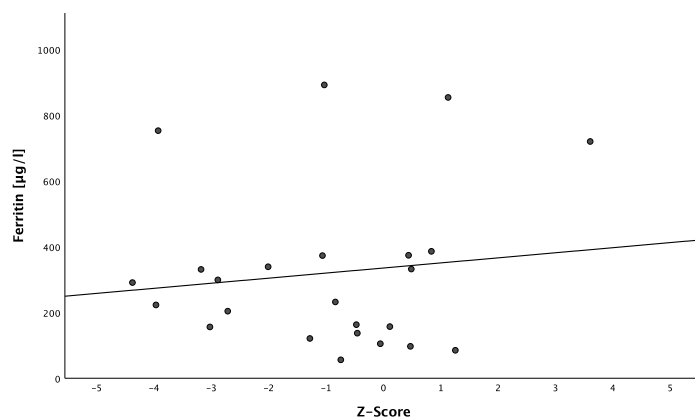


Abbildung 20: Ferritin [µg/l] in Korrelation mit dem Z-Score

Ergebnisse

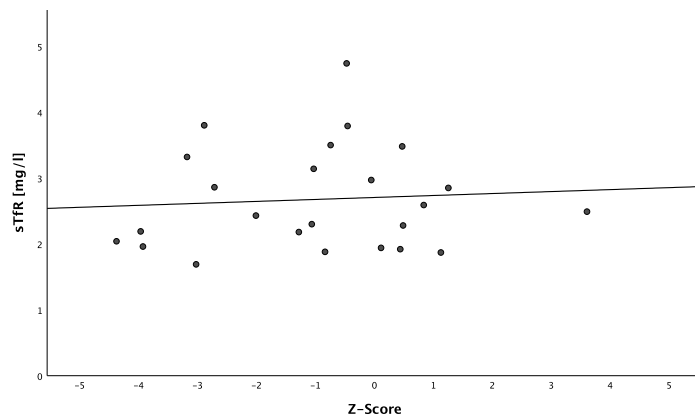


Abbildung 21: Löslicher Transferrinrezeptor (sTfR) [mg/l] in Korrelation mit dem Z-Score

Die Adjustierung nach Geschlecht führte für beide Parameter zu keiner Änderung. Im Gegensatz dazu ließ sich für die Transferrinsättigung eine kontinuierliche Erhöhung im Serum mit steigendem Sarkopeniegrad beobachten (Tabelle 4). Diese Beobachtung bestätigte sich für die Transferrinsättigung in einem linearen Zusammenhang zum Z-Score mit einer signifikanten, positiven Korrelation ($r = 0.450$, $p = 0.028$) (Abbildung 22). Nach Adjustierung für das Geschlecht ($\beta_1 = 0.550$, $p = 0.005$) und Alter ($\beta_2 = 0.571$, $p = 0.004$) verstärkte sich der Zusammenhang.

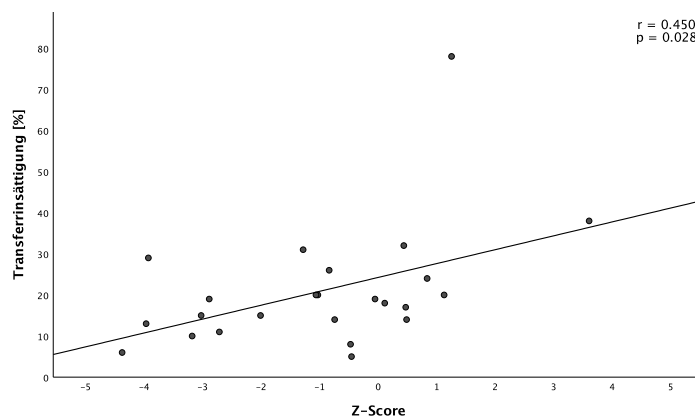


Abbildung 22: Transferrinsättigung [%] in Korrelation mit dem Z-Score

4.3.6 Ergebnisse der Citratzyklusmetabolite

Die Analysen der Citratzyklusmetabolite zeigten bis auf Alpha-Ketoglutarat in Bezug auf den Sarkopeniegrad einen direkt proportionalen Konzentrationsanstieg (Tabelle 4). Dieser Anstieg ließ sich ebenso in Assoziation mit dem Z-Score beobachten. Ein signifikanter Zusammenhang mit dem Z-Score zeigte sich dabei für Fumarat ($r = 0.697$, $p = 0.001$) (Abbildung 23), Succinat ($r = 0.714$, $p < 0.001$) (Abbildung 24), Malat ($r = 0.711$, $p < 0.001$) (Abbildung 25) und Citrat ($r = 0.607$, $p = 0.010$) (Abbildung 26). Für alpha-Ketoglutarat zeigte sich ebenfalls ein Trend, jedoch ohne Signifikanz ($r = 0.135$, $p = 0.593$) (Abbildung 27). Für die Citratzyklusmetabolite Fumarat, Malat, Citrat und Succinat zeigte sich der Zusammenhang auch nach Adjustierung durch Geschlecht und

Ergebnisse

Alter mit weiterhin eindeutiger Signifikanz. Für Citrat nahm die Signifikanz nach Adjustierung durch das Geschlecht ($\beta_1 = 0.598$, $p = 0.004$) und Alter ($\beta_2 = 0.588$, $p = 0.006$) zu.

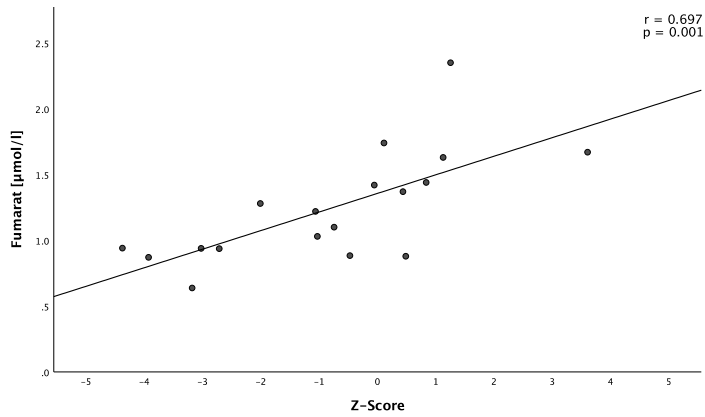


Abbildung 23: Fumarat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score

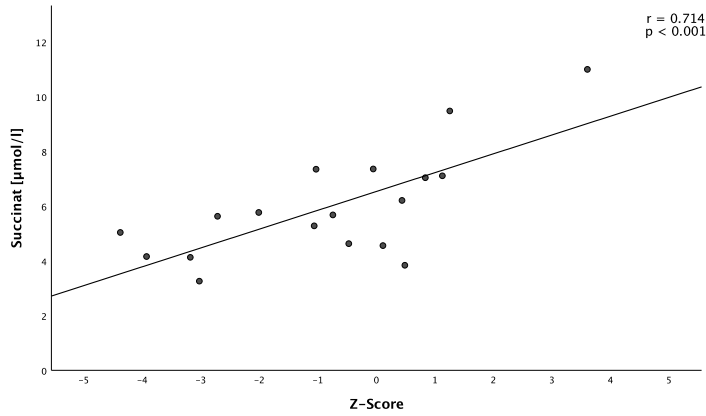


Abbildung 24: Succinat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score

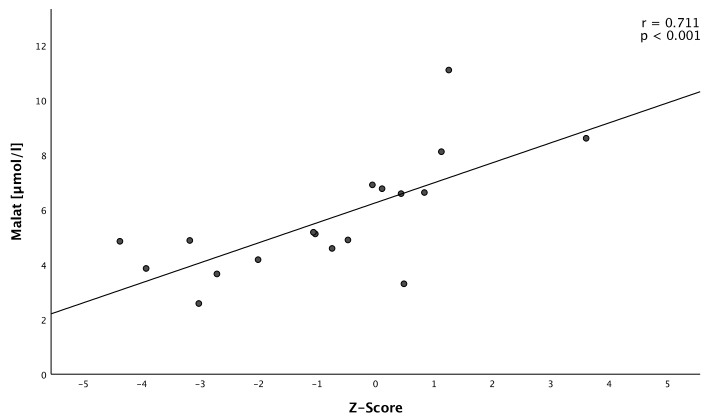


Abbildung 25: Malat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score

Ergebnisse

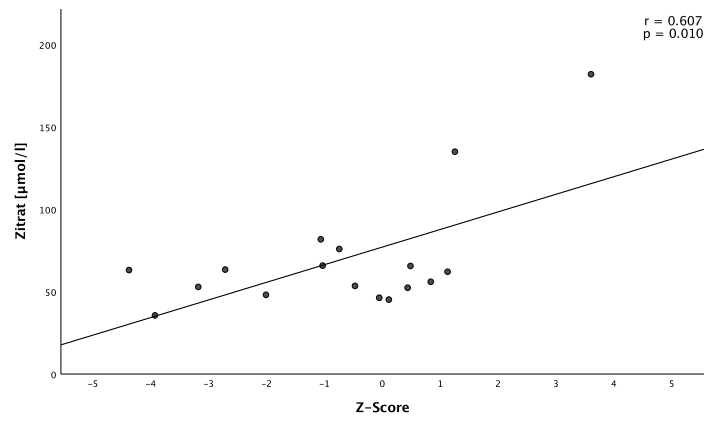


Abbildung 26: Citrat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score

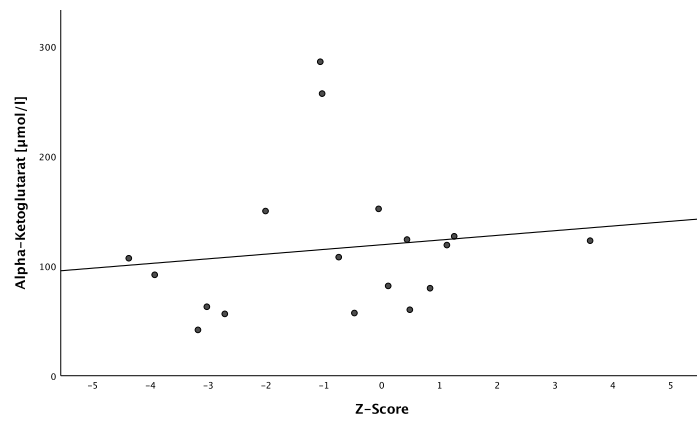


Abbildung 27: Alpha-Ketoglutarat [$\mu\text{mol/l}$] in Korrelation mit dem Z-Score

5 Diskussion

5.1 Z-Score und Sarkopeniegrade

Sarkopenie ist ein geriatrisches Syndrom und wird definiert als progressiver Verlust von Muskelmasse und -funktion (54). Wie in der Einleitung erläutert, überschneiden sich die Ursachen für die physiologische altersbedingte Muskelatrophie und den Funktionsverlust der Muskulatur zum Teil mit der Pathogenese der Sarkopenie. Dadurch wird deutlich, dass eine Differenzierung des altersabhängigen physiologischen Verlustes von Muskelmasse und Muskelkraft gegenüber der Sarkopenie erschwert ist. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit für 31 Probanden ein Z-Score berechnet und die Kohorte in die drei Gruppen nicht-sarkopen, prä-sarkopen und sarkopen unterteilt. Der Z-Score spiegelt dabei das Kontinuum der Sarkopenie-Entwicklung wider und lässt somit eine differenziertere Betrachtung der Progression pathologischen Muskelfunktionsverlusts zu. Es bleibt jedoch zu beachten, dass der Z-Score ein berechneter Wert aus den erhobenen Messparametern Handkraft und Skelettmuskelmasseindex ist. Die Stabilität des Z-Scores ist stark von der Stichprobengröße abhängig und kann bei kleinen Stichproben stärker von zufälligen Schwankungen beeinflusst werden. Trotz großer Sorgfalt bei der Durchführung der Messung dieser beiden Parameter ist der Untersucher auf eine adäquate Mitarbeit des Probanden angewiesen, da Messfehler, oder tagesformabhängige Schwankungen einen direkten Einfluss auf die Messwerte und folglich auch auf den Z-Score haben. Somit haben in der vorliegenden Kohorte mit $n=31$ stark vom Mittelwert abweichende Werte einen großen Einfluss auf den Z-Score der gesamten Kohorte. Es ist zu beachten, dass die Messungen für Handkraft und Skelettmuskelmassenindex bei allen Probanden in einem vergleichbaren Setting nach stattgehabter Oberschenkelhalsfraktur und anschließender Operation durchgeführt wurden. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen und in Hinblick auf die Normalverteilung der vorliegenden Daten stellt der Z-Score dennoch ein nützliches Instrument zur Interpretation und Bewertung für das Ausmaß der Krankheitslast, beziehungsweise der Sarkopenieschwere dar. Die Unterteilung in die Sarkopeniegrade wiederum erfolgt anhand absoluter Werte, wie in 4.2.3 beschrieben, wodurch die Sarkopeniegrade im Gegensatz zum Z-Score unabhängig von der Zusammensetzung der Kohorte sind. Die Einteilung in Sarkopeniegrade ist dadurch eine robuste Methode gegenüber Ausreißern. Auf diese Weise können Unterschiede innerhalb der Kohorte, welche mit höherer oder niedrigerer Krankheitslast einhergehen gut beurteilt werden.

5.2 Verminderte mitochondriale Atmungskettenenzymaktivität

Aufgrund der zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärten Rolle der Mitochondrien bei Sarkopenie, wurden in der vorliegenden Arbeit die Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenenzyme untersucht und somit der zentrale Mechanismus der Energieproduktion durch die oxidative Phosphorylierung, bei der Energie in Form von ATP mithilfe der Atmungskettenenzyme generiert wird. Hierbei konnte eine deutlich abnehmende Tendenz mit annähernder Signifikanz ($p = 0.07$) für die Enzymaktivität der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) in Assoziation mit dem Z-Score festgestellt werden. Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) und Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), folgten diesem Trend. Eine signifikante Abnahme zeigte sich jedoch für keinen der Komplexe im Zusammenhang mit dem Z-Score. Trotzdem deuten die Ergebnisse auf eine Aktivitätsabnahme der Atmungskettenenzymkomplexe im Rahmen der Sarkopenie hin. Zwar wurde durch Boffoli et al. ebenfalls eine Aktivitätsminderung, insbesondere für die Komplexe I, II und IV im alternden Skelettmuskel festgestellt (162), jedoch scheint die Reduktion der Enzymaktivität im Zusammenhang der Sarkopenie stärker ausgeprägt zu sein. So zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit in einer Studie durch Migliavacca et al., in welcher ebenfalls eine negative Korrelation der Atmungskettenenzymkomplex-Aktivität im Zusammenhang mit Sarkopenie festgestellt wurde (163). Hierbei wurden durch enzymatische Analysen isolierter Mitochondrien aus Muskelbiopsien sarkopener Probanden funktionelle Defizite der mitochondrialen Enzymaktivität beobachtet, wobei besonders die enzymatischen Aktivitäten der Komplexe I bis IV reduziert waren (163). Komplex I zeigte hierbei die deutlichste Aktivitätsminderung, was auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Somit bestätigt sich die These, dass eine Aktivitätsminderung der Enzymkomplexe in der Pathogenese der Sarkopenie eine entscheidende Rolle spielen könnte. Migliavacca et al. beobachteten außerdem für alle Atmungskettenenzyme, inklusive der ATP-Synthase eine verminderte Genexpression, woraus eine globale Abnahme der Proteinexpression der aktiven Untereinheiten mitochondrialer Atmungskettenenzymkomplexe resultierte (163). Insbesondere zeigte sich eine verminderte Expression mitochondrialer Gene für die Komplexe I, II, III und Komplex V, der ATP-Synthase. Diese waren bei den sarkopenen Probanden um 44- 51% reduziert. Diese Beobachtungen sind ebenfalls vereinbar mit den vorliegenden Ergebnissen, sowohl für die deutliche Aktivitätsminderung von Komplex I als auch für die abnehmenden Tendenz für Komplex II und III. Zwar wurde in einer anderen Studie durch Zahn et al. ebenfalls eine verminderte Genexpression mit zunehmendem Alter für die Atmungsketten-Enzymkomplexe beobachtet (164), dennoch scheint auch in diesem Fall die verminderte Expression mitochondrialer Enzyme im Rahmen der Sarkopenie

Diskussion

stärker auszufallen. Ergebnisse einer Studie, in welcher "pre-frail" Probanden mit einem mittleren Alter von 70 Jahren untersucht wurden, deuteten ebenfalls auf eine deutliche Aktivitätsminderung von Komplex I, II und IV hin und es zeigte sich eine tendenziell geringere mtDNA Dichte im Verhältnis zur nukleären DNA, was mit einer auffallend niedrigeren Transkription mitochondrialer Gensätze im Muskel einherging (165). Obwohl Frailty, beziehungsweise Gebrechlichkeit, ein anderes Krankheitsbild beschreibt, steht es pathophysiologisch teilweise im engen Zusammenhang mit Sarkopenie (166, 167). Es ist davon auszugehen, dass mit zunehmendem Alter eine generelle Aktivitätsminderung der Atmungskettenenzymkomplexe auftritt, aber die Ergebnisse von Andreux et al. (165) und Migliavacca (163) als auch die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Prozess im Rahmen der Sarkopenie aggraviert abläuft. Ebenso ergab die Untersuchung der mitochondrialen Atmungskettenenzymaktivität in einer Studie von Pestronk et al. eine deutliche Reduktion bei sarkopenen Patienten, insbesondere der Komplexe I, II und II/III (168). Allerdings sei erwähnt, dass in der Studie durch Pestronk et al. Probanden im Alter ≥ 50 Jahren und einer Muskelfaseratrophie mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 38 μm als sarkopen definiert wurden. Die Diagnosekriterien entsprechen damit nicht denen der vorliegenden Arbeit, trotzdem werden Muskelfaseratrophien zugunsten der in 1.1.2 beschriebenen Typ-I Fasern in der Literatur zunehmend mit Sarkopenie in Zusammenhang gebracht (79), weshalb eine gewisse Vergleichbarkeit zu den vorliegenden Ergebnissen gegeben ist. Bemerkenswert ist, dass insbesondere für die Komplex-I-Aktivität in der Arbeit von Pestronk et al. eine starke Verringerung bei sarkopenen Patienten festgestellt wurde, wohingegen das Alter allein nur eine mäßig reduzierte Enzymaktivität von Komplex I zeigte (168).

Interessanterweise ergaben die Analysen der vorliegenden Arbeit ebenfalls ausschließlich eine nahezu signifikante Tendenz der Aktivitätsminderung für Komplex I. Für Komplex II/III wurde zwar ein ähnlicher Trend beobachtet, allerdings sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht so deutlich. Ein solcher Trend fehlt für Komplex IV, da hier weder eine Abnahme noch eine abnehmende Tendenz beobachtet werden konnte. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen scheint es also keinen Zusammenhang zwischen Sarkopenie und der Aktivität von Komplex IV zu geben. In Anbetracht dessen liegt die Vermutung nahe, dass Sarkopenie nicht mit einem generellen Verlust von Mitochondrien einhergeht, denn hierbei wäre vermutlich eine Aktivitätsminderung aller Komplexe zu beobachten. Stattdessen scheint vorrangig die Aktivitätsminderung von Komplex I mit Sarkopenie assoziiert zu sein, wie auch die Ergebnisse von Pestronk et al. (168) vermuten lassen. Denkbar wäre also, dass im Rahmen der Sarkopenie eine mitochondriale Dysfunktion vorliegt, welche aus einer Reduktion der Aktivität spezifi-

Diskussion

scher Enzyme, beziehungsweise insbesondere der Reduktion der Enzymaktivität von Komplex I resultiert.

Die eingangs erwähnte Typ-II-Muskelfaseratrophie, welche mit Sarkopenie in Zusammenhang gebracht wird (79) kann die isolierte Aktivitätsminderung von Komplex I nicht erklären, da sich die Muskelfasertypen zwar im Mitochondriengehalt unterscheiden, bei einer Änderung der absoluten Menge an Mitochondrien pro Zelle jedoch eine Aktivitätsabnahme aller Atmungskettenenzyme zu erwarten wäre. Wie in der Einleitung beschrieben gehören die Typ-II-Fasern zu den schnellen glykolytischen Muskelfasern mit geringerem Mitochondriengehalt. Somit gibt die Reduktion von Typ-II-Fasern im sarkopenen Muskel zwar ein Hinweis auf eine Änderung der Muskelzusammensetzung sowie der absoluten Menge an Mitochondrien pro Zelle, lässt jedoch zum aktuellen Zeitpunkt keinen zuverlässigen Rückschluss auf eine veränderte Atmungskettenenzymaktivität zu. In einer Studie durch Murgia et. al wurde mittels Quantifizierung der Expression jeder Untereinheit der gesamten Atmungskette festgestellt, dass der Rückgang der Atmungskettenaktivität im Alter in den langsamen oxidativen Typ-I-Muskelfasern und schnellen glykolytischen Typ-II-Fasern ähnlich stark ausfällt (169). Insofern scheint der fasertypspezifische Gehalt an Mitochondrien eine untergeordnete Rolle bezüglich der Atmungskettenaktivität zu spielen. Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, dass die Unterschiede in der Zusammensetzung der Fasertypen zwischen sarkopenen und nicht-sarkopenen Patienten (79) keinen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse hat.

Es wird vermutet, dass die Aktivitätsminderung von Enzymen im Alter eine Konsequenz der durch ROS verursachten Schäden ist. Wie in 1.3.5 beschrieben, befindet sich die mtDNA in direkter Nachbarschaft der Atmungskette, welche eine der Hauptquellen von ROS darstellt. Dadurch sind die Mitochondrien nicht nur Produzenten von ROS, sondern gleichzeitig Ziel der reaktiven Sauerstoffspezies, denn durch die unmittelbare Nähe ist die mtDNA den ROS ständig ausgeliefert. Darüber hinaus verfügt die mtDNA im Gegensatz zu der zellulären nukleären DNA über ein weniger ausgeprägtes Reparatursystem, was sie um ein vielfaches anfälliger für oxidativen Stress und Schäden durch ROS macht (170). Short et al. stellten außerdem fest, dass ältere Menschen signifikant höhere oxidative Schäden der nukleären DNA aufweisen. Gleichzeitig konnten sie beobachten, dass damit einhergehend die Menge an mtDNA abnahm, was wiederum mit einer reduzierten Menge an mRNA-Transkripten verbunden war, welche für mitochondriale Proteine kodieren (143). Diese Beobachtung ist bedeutsam, da die Kommunikation und Koordination der Transkriptionseignisse sowohl in den Mitochondrien als auch im Zellkern von entscheidender Bedeutung für die Produktion von ATP und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase sind, da die meisten

Diskussion

Proteine, welche für die oxidative Phosphorylierung und andere mitochondriale Prozesse erforderlich sind, nicht ausschließlich von der mtDNA, sondern teilweise auch von der nukleären DNA kodiert werden (171). Dementsprechend können oxidative Schäden an der nukleären DNA ebenso folgenreich für die Funktion der Mitochondrien sein, wie direkte Schäden an der mtDNA. Schlussfolgernd könnte eine generelle Überproduktion von ROS als ein weiterer Pathomechanismus einer gestörten Biogenese der Mitochondrien im Rahmen der Sarkopenie eine wichtige Rolle spielen.

Trotz des bedeutenden Anteils der durch die nukleäre DNA kodierten Proteine zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion, ist die mtDNA natürlich ebenso essenziell für deren Funktionalität, denn sie kodiert ebenfalls Bausteine für die Untereinheiten der Atmungskettenenzymkomplexe (172-174). Beachtlich ist, dass die mtDNA insgesamt für sieben Untereinheiten von Komplex I kodiert, welcher den größten Komplex mit 45 Untereinheiten der Atmungskette darstellt (51, 162, 175). Im Vergleich dazu kodiert die mtDNA für eine der zehn Untereinheiten von Komplex III und drei der circa 13 Untereinheiten für Komplex IV (162, 175). Das hebt die besondere Bedeutung von Komplex I innerhalb der Atmungskette hervor, da ein beachtlicher Anteil seiner funktionellen Untereinheiten direkt von der mtDNA stammt. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen der mtDNA durch oxidativen Stress einen großen Einfluss auf die Funktionalität von Komplex I hat. Dessen Aktivität und Stabilität könnten durch Mutationen dieser durch die mtDNA kodierten Gene für die sieben Untereinheiten beeinträchtigt sein und letztlich zu einer Dysfunktion der Atmungskette führen. Wie in der Einleitung beschrieben, werden die reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 und das Superoxid-Anion O_2^- in den Mitochondrien hauptsächlich als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung durch die Komplexe I und III produziert (144-147, 176). Dies geschieht während der Übertragung von Elektronen auf Ubichinon, wodurch es zu Ubichinol reduziert wird. Dabei kann es zu einer unvollständigen Übertragung der Elektronen kommen und einige Elektronen können auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, was zur Produktion von ROS führt. In einer Übersichtsarbeit von Hahn et al. (177) wurde beschrieben, dass ein Funktionsdefekt von Komplex I und Komplex III zu einer unkontrollierten Oxidation von Ubichinol führen kann. Folglich führt der Funktionsdefekt der mitochondrialen Enzymkomplexe also zu einer gestörten Elektronenübertragung und könnte eine übermäßige Produktion von ROS nach sich ziehen. Dadurch wäre der durch oxidativen Stress in der Einleitung beschriebene *Circulus vitiosus* angeregt, indem mtDNA-Schäden zu einer gestörten Synthese von Atmungskettenenzyme führen, welche ihrerseits zu einer gesteigerten Produktion von ROS führen, was wiederum weitere Mutationen der mtDNA begünstigt (147-149). Dieser *Circulus vitiosus* hat eine gestörte ATP-Produktion zur Folge, wodurch die adäquate Energie-

Diskussion

versorgung des Skelettmuskels nicht mehr durch die Mitochondrien gewährleistet werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Komplexe I bis III lassen demnach durchaus einen erhöhten oxidativen Stress im Rahmen der Sarkopenie vermuten, wobei Komplex I insbesondere davon betroffen zu sein scheint, da ein Großteil des Enzymkomplexes durch die mtDNA kodiert wird.

Allerdings wird die sogenannte "Theorie der freien Radikale" (148) in den letzten Jahren in der Literatur kontrovers diskutiert, da ROS ebenso für die Aufrechterhaltung vieler Prozesse, unter anderem der Genexpression, notwendig sind (147, 178, 179). Nichtsdestotrotz haben ROS aufgrund der oben genannten Gründe einen bedeutenden Einfluss auf den Alterungsprozess und es wird angenommen, dass die durch ROS ausgelösten Akkumulationen von mtDNA Mutationen ebenfalls im Rahmen der Sarkopenie eine wichtige Rolle spielen (180-182), was mit den aktuellen Ergebnissen vereinbar wäre.

Andere Studien konnten hingegen keine Abnahme der Aktivität von Komplex I feststellen, sowohl im alternden Skelettmuskel (183) als auch im sarkopenen Skelettmuskel (184). Obwohl durch die Studie von Shah et al. generell keine Abnahme von Komplex I im sarkopenen Skelettmuskel beobachtet wurde, konnte für die sarkopenen Probanden ein signifikanter Zusammenhang zwischen mtDNA-Deletionen und einer reduzierten Komplex-I-Aktivität gezeigt werden und dass die mtDNA-Deletionen überwiegend die kodierenden Regionen für Komplex I betreffen (184). Sofern die Deletions-Mutationen der mtDNA hauptsächlich in den Bereichen auftreten, welche für Komplex I kodieren, ist annehmbar, dass diese Mutationen zu einer gestörten Synthese von Proteinen für Komplex I führen, was wiederum eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität nach sich ziehen würde. In Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen würde das ebenfalls für eine erhöhte Rate an mtDNA-Deletionen in den für Komplex I kodierenden Regionen bei sarkopenen Patienten sprechen. In Tiermodellen mit sarkopenen Mäusen wurde gleichfalls die Annahme aufgestellt, dass mtDNA-Mutationen ursächlich für Sarkopenie sind und analog zu den aufgeführten Erläuterungen argumentiert, dass aufgrund der Beeinträchtigung der Atmungskettenenzymaktivitäten ein Mangel an oxidativer Phosphorylierung besteht (185). In den sarkopenen Mäusen wurde eine Reduktion von 35-50% der Enzymaktivitäten von Komplex I, III und IV beobachtet (185). Wie in diesem Mausmodell beobachteten einige Studien eine Abnahme aller Komplexe und nicht speziell für Komplex I. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass aufgrund mangelnden Probenmaterials in der vorliegenden Arbeit nur eine Teilmenge der Kohorte mit $n = 8$ auf die mitochondriale Enzymaktivität untersucht werden konnte. Daher ist es plausibel, dass sich bei einer höheren Probenanzahl die Tendenzen aller Komplexe der Aktivitätsminderung im Einvernehmen anderer Studien verdeutlicht hätte. So schlussfolger-

Diskussion

ten auch Migliavacca et al., dass Sarkopenie eher durch ein allgemeines biodynamisches Defizit verursacht wird und nicht durch eine Aktivitätsminderung eines spezifischen Komplexes (163).

Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit sich die verringerte Aktivität eines einzelnen Atmungskettenkomplexes auf die Aktivität der anderen Komplexe auswirkt. Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex I, liefert ein Produkt, welches zugleich ein entscheidendes Substrat der weiteren Komplexe darstellt. Liegt dieses Substrat wie im Falle einer Reduktion der Komplex-I-Aktivität in verringerter Konzentration vor, wäre anzunehmen, dass die nachfolgenden Komplexe ebenfalls in ihrer Funktion und Aktivität eingeschränkt wären. In einer Übersichtsarbeit wurde dargestellt, dass alternative Elektronendonatoren in der Atmungskette, wie bspw. Komplex II oder andere Ubichinon-reduzierende Enzyme eine deutlich geringere Effizienz der Atmungskette bei verminderter Komplex-I-Aktivität zeigten (186, 187). Demnach scheint Komplex I eine Schlüsselrolle im Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette zu spielen. Somit können bei einer Beeinträchtigung der Komplex-I-Aktivität die nachfolgenden Komplexe nicht im vollen Umfang kompensieren, was eine gestörte zelluläre Energieproduktion zur Folge hätte. Eine verminderte Komplex-I-Aktivität hat demnach einen bedeutenden Einfluss auf die Energieversorgung des Skelettmuskels. Entsprechend könnte eine Aktivitätsminderung einzig von Komplex I für den Funktionsverlust der Skelettmuskulatur im Rahmen der Sarkopenie durchaus eine entscheidende Rolle spielen.

5.3 Stoffwechselveränderungen in sarkopenen Myoblastenzellkulturen

Aus den Muskelbiopsien der Probanden wurden Myoblastenzellkulturen angelegt und mittels Echtzeitanalysen die Glykolyse und die mitochondriale Respiration der Zellen untersucht. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Probanden mit einem Durchschnittsalter von 82 Jahren, wurden die Myoblastenzellkulturen nach der zweiten Passage untersucht, um eine in vitro Seneszenz der Zellen und somit eine fortschreitende Zellalterung zu verhindern. Da die Muskelbiopsien der Probanden eine annähernd signifikante Aktivitätsminderung von Komplex I zeigten, wäre für die Myoblastenzellkulturen in Konkordanz eine Abnahme der mitochondrialen Respiration zu erwarten gewesen. Die Analysen zeigten jedoch sowohl für die Basale Respiration als auch für die Glykolyse der Zellen nur eine leicht abnehmende Tendenz in Zusammenhang mit dem Z-Score, jeweils ohne Signifikanz. Der Effekt war somit für die Mitochondrien in den angelegten Myoblastenzellkulturen der Muskelbiopsien nicht reproduzierbar.

Diskussion

Der abnehmende Trend der basalen Respiration und Glykolyse gibt zumindest einen Hinweis darauf, dass mit dem Sarkopenieschweregrad sowohl die mitochondriale Funktion als auch die glykolytische Funktion der Myoblasten nachzulassen scheint. Gemäß dieser Beobachtung wurde durch Analysen von Genexpressionsprofilen in Myoblasten von Spendern unterschiedlichen Alters und in unterschiedlichen Proliferationsstadien, sowohl in vivo als auch in vitro altersbedingte Veränderungen der Stoffwechsellkapazität und der zugehörigen Geneexpressionsprofile bei den älteren Spendern im Alter von 79 Jahren festgestellt (188). Die Ergebnisse von Bortoli et al. zeigten, dass Gene, welche unter anderem an den Stoffwechselwegen des mitochondrialen Elektronentransport, der ATP-Synthase als auch an der Glykolyse und dem Citratzyklus beteiligt sind in den Myoblasten der 79-jährigen Spender vermindert waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich allein das fortgeschrittene Alter auf die Stoffwechsellkapazität der Myoblasten auswirkt, was in einer gestörten Muskelfunktion resultiert. Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Stoffwechselaktivität der Probanden geben einen Hinweis darauf, dass dieser Alterungsprozess im Rahmen der Sarkopenie beschleunigt sein könnte. Wie bereits erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen Sarkopenie und einer Muskelfaseratrophie der schnellkontrahierenden Typ-II-Fasern (79). Da die Typ-II-Fasern die Energie vor allem durch anaeroben Stoffwechsel generieren, wäre im Rahmen der Sarkopenie bei der Verschiebung von Muskelfaser Typ II zu Typ I eine Abnahme der anaeroben Glykolyse zu erwarten, was durch die abnehmende Tendenz der vorliegenden Ergebnisse bestätigt wird. Sofern allerdings eine Verschiebung zu einer insgesamt langsameren Typ-I-Muskelfaserpopulation stattfindet, wäre theoretisch ein gleichzeitiger Anstieg der oxidativen Stoffwechselprozesse bei der Energiegewinnung zu erwarten, da die langsam kontrahierenden Typ-I-Muskelfasern einen höheren Anteil an Mitochondrien besitzen und die Energie überwiegend über die oxidative Phosphorylierung gewinnen. Allerdings stellt sich die Frage, inwiefern Untersuchungen an Vorläuferzellen in vitro, hier Myoblastenkulturen, Rückschlüsse auf ausdifferenzierte Muskelfasern des Metabolismus zulassen und ob sich die veränderte Faserzusammensetzung mit diesem Modell suffizient abbilden lässt. Eine Studie, in welcher ebenfalls mittels der Seahorse-Technologie die Respiration von Zellkulturen untersucht wurden, zeigte sowohl für die basale als auch für die maximale Respiration seneszenter Myoblasten im Vergleich zu jungen Myoblasten signifikant höhere Werte (189). Diese Beobachtung stimmt mit der erwarteten Veränderung bei einer vermehrten Atrophie von Typ-II-Fasern überein und spricht für die Validität des Modells. Gleichzeitig wurde durch Baraibar festgestellt, dass Zwischenprodukte der Glykolyse in seneszenten Myoblasten vermindert waren, was auf eine reduzierte Glykolyse schließen lässt. Allerdings ist zu beachten, dass in der Studie durch Baraibar Muskelsatellitenzellen des Quadrizeps eines 5 Tage alten weiblichen Säuglings isoliert und an-

Diskussion

schließlich in Wachstumsmedium expandiert und kultiviert wurden und somit nur *in vitro* gealtert sind. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der replikativen Seneszenz, also dem Altern *in vitro*, wurden in einer Übersichtarbeit durch Hamon et al. dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die replikative Seneszenz mit oxidativen Veränderungen von Proteinen einhergeht. Diese Beobachtungen betrafen insbesondere Proteine der Glykolyse der Myoblasten, während in den Mitochondrien der seneszenten Myoblasten kaum Proteine modifiziert zu sein schienen (190). Für die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen ist es jedoch entscheidend, ob Myoblasten der verschiedenen Muskelfasertypen bereits je nach Fasertyp eine unterschiedliche Dichte an Mitochondrien aufweisen und ob sich die Faserzusammensetzung bei replikativer Alterung *in vitro* analog zur Alterung *in vivo* zugunsten der Typ-I-Fasern verändert. In dieser Hinsicht ist das vorliegende Studiendesign mit Myoblastenzellkulturen der ≥ 80 Jahre alten Probanden, dem der replikativen Seneszenz hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse überlegen.

Dennoch zeigen die Seahorse-Analysen der vorliegenden Arbeit für beide Stoffwechselwege in den Myoblasten eine abnehmende Tendenz, wobei die Abnahme der Glykolyse minimal stärker ausgeprägt ist. Obwohl die Typ-I-Muskelfasern ihre Energie hauptsächlich über die Mitochondrien generieren, ließ sich kein Shift von anaeroben zu aerober Energiegewinnung in den Myoblasten der Probanden beobachten. Ursächlich dafür könnte ein Defekt der Mitochondrien sein, welcher trotz der Verschiebung bei Sarkopenie zu langsam kontrahierenden Typ-I-Muskelfasern durch eine krankheitsbedingte mitochondriale Dysfunktion dazu führt, dass der Energiebedarf nicht kompensiert werden kann. In einer Studie über Mitochondrien aus Myoblastenkulturen von 27- bis 33-Jährigen im Vergleich zu 72- bis 78-jährigen männlichen Probanden, wurde in den Myoblasten der älteren Probanden ein signifikant erhöhter Grundgehalt des Superoxid-Anion O_2^- in den Mitochondrien festgestellt, bei gleichzeitig niedrigerer Expression einer Superoxiddismutase, welche zum Schutz der Mitochondrien das Superoxid-Anion O_2^- eliminiert (191). So schlussfolgerten Marrone et. al ebenfalls, dass die aufgrund oxidativen Stresses beeinträchtigten Mitochondrien die metabolische Plastizität der Myoblasten nachteilig beeinflussen. Zwar wird hier lediglich die Auswirkung des Alters bezüglich der Myoblasten betrachtet, aber diese könnte im Kontext der Sarkopenie verstärkt sein. Die Ergebnisse der Atmungskettenenzym-Analysen wie in 4.3.1 beschrieben, bestätigen diesen Verdacht. Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen einer Reduktion der mitochondrialen Kapazität sowie Effizienz und einer verlangsamten Gehgeschwindigkeit bei dem 400m Gehstest gezeigt werden, sowohl für Frauen als auch Männer mit einem mittleren Alter von 78 Jahren (192). Wie in 1.2.2 beschrieben, lässt sich der Sarkopenieschweregrad nach den Kriterien der EWGSOP2 (54) unter anderem über einen 400m-Gehstrecke-Test feststellen. Diese Ergebnisse

Diskussion

deuten ebenfalls auf einen mitochondrialen Defekt im Rahmen der Sarkopenie hin. Dennoch ergibt sich in Hinblick der vorliegenden Ergebnisse und der obengenannten Studien die Überlegung, inwieweit der Metabolismus, der *in vitro* kultivierten Myoblasten mit den Myoblasten *in vivo* vergleichbar ist, insbesondere bei fortgeschrittenem Alter des Spenders. Pääsuke et al. stellten diesbezüglich fest, dass bei der Proliferation von Myoblasten *in vitro* sowohl bei jungen Spendern mit einem Durchschnittsalter von 23 Jahren als auch bei Spendern mit einem Durchschnittsalter von 76 Jahren, die oxidative Phosphorylierung vermindert war (193). Allerdings traten die Veränderungen der oxidativen Phosphorylierung bei den jungen Probanden erst ab der dritten Passage der Zellen auf. Im weiteren Verlauf zeigte sich gleichermaßen für beide Altersgruppen von der zweiten bis zur sechsten Passage eine Abnahme der oxidativen Phosphorylierung. Dies deutet darauf hin, dass sich die Abnahme der oxidativen Phosphorylierung für die älteren Probanden bereits in den frühen Passagen manifestiert. Diese Beobachtung wiederum gibt einen Hinweis darauf, dass die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung mit dem tatsächlichen Alter nachzulassen scheint. Genauso zeigt die Reduktion der oxidativen Phosphorylierung über die zweite bis sechste Passage hinweg, dass die Proliferation *in vitro* unabhängig vom Alter des Spenders mit einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung einherzugehen scheint, je fortgeschrittener die Subkultivierung der Zellkultur und somit die replikative Seneszenz ist. Insofern hat das tatsächliche Alter auch auf das replizierende Altern *in vitro* einen Einfluss, zumindest auf die mitochondrialen Stoffwechselwege der Myoblasten ab der zweiten Passage, wie die Studie durch Pääsuke et al. zeigt. Insgesamt bestätigt sich dadurch, dass das Vorgehen der vorliegenden Arbeit richtig war, da die Durchführung der Messungen bereits nach der zweiten Passage das Auftreten einer *in vitro* Seneszenz verhindert, welche mögliche Unterschiede verschleiern könnte. Die Enzyme Hexokinase und Pyruvatkinase der Glykolyse wurden durch den *in vitro* Alterungsprozess interessanterweise bei beiden Gruppen in der Studie durch Pääsuke et al. nicht beeinflusst. Weitere Unterstützung findet das von uns verwendete Modell von einer Studie durch Alsharida et al. Hierbei wurden Myoblastenkulturen von 20 bis 25-Jährigen im Vergleich zu 67 bis 82-Jährigen im Laufe der replikativen Seneszenz untersucht, allerdings wurde in der Studie keine Anzahl der Passagen bis zum Erreichen der replikativen Seneszenz angegeben. Zwar traten bei den seneszenten *in vitro* gealterten Zellen unter anderem eine größere Anzahl an Zellen mit DNA-Schäden und einer beeinträchtigten Expression von Differenzierungsmarkern auf, allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Ganz im Gegenteil ergaben sich klare Hinweise darauf, dass die Veränderungen von muskulären Vorläuferzellen in Kultur bei sowohl jungen als auch älteren Menschen ähnlich sind und das Alter der Spender somit keine Rolle spielt (194). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass in der Studie durch sowohl

Diskussion

Pääsuke et al. als auch Alsharida et al. die Myoblasten gesunder Erwachsener untersucht wurden, wohingegen die Probanden dieser Arbeit zumindest an Prä Sarkopenie oder Sarkopenie erkrankt waren und eventuelle weitere Komorbiditäten vorlagen, solange diese im Einklang der Einschlusskriterien waren, welche in 3.1.2 beschrieben sind. Trotzdem ist annehmbar, dass das von uns verwendete Modell die Beobachtung von Unterschieden der Myoblasten erkrankter Probanden im fortgeschrittenen Alter in vitro im Vergleich zu gesunden Probanden, oder wie in unserem Fall nicht-sarkopenen Probanden erlaubt. Insgesamt deutet die nur leicht abnehmende Tendenz der Glykolyse und Basalen Respiration bei gleichzeitig stark verminderter Komplex-I-Aktivität darauf hin, dass die Abnahme der Muskelfunktion bei Sarkopenie möglicherweise nicht auf einen defekten Metabolismus der Vorläuferzellen beruht. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass muskuläre Dysregulation im Zusammenhang mit Sarkopenie nicht unbedingt eine genetische Ursache haben.

5.4 Diskussion multisystemischer und externer Einflussfaktoren auf Sarkopenie

5.4.1 Diskussion der Citratzyklusmetabolite

Die Blutseren der Patienten wurden mithilfe von Stoffwechselanalysen auf verschiedene Metabolite untersucht. Hierbei zeigte sich insbesondere für einige Metabolite des Citratzyklus eine signifikante Zunahme der Serumkonzentration bei Patienten mit hohem Z-Score. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der verminderten Komplex-I-Aktivität der vorliegenden Arbeit, denn wie einleitend beschrieben, wird unter anderem durch einzelne Schritte des Citratzyklus NADH in den Mitochondrien produziert und im weiteren Verlauf durch die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex I, zu NAD⁺ oxidiert. Eine verminderte Aktivität von Komplex I resultiert in einem verminderten Abbau von NADH und führt somit zu einer Anhäufung von NADH. Entsprechend wurde in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst, dass erhöhte NADH Werte eine direkte Folge von mitochondrialer Dysfunktion sind, da eine der wesentlichen Funktionen von Komplex I die Oxidation von NADH ist (195). Eine NADH-Akkumulation wiederum kann sämtliche Enzyme des Citratzyklus und die damit verbundenen Stoffwechselwege hemmen, was zu einem gestörten Ablauf des Citratzyklus führt (195). Die Regulation des Citratzyklus erfolgt hauptsächlich über die Konzentrationen von ADP, ATP, NAD⁺ und NADH, wobei die inhibitorischen Effekte von NADH insbesondere das regulierende Schlüsselenzym Isocitrat-Dehydrogenase betreffen, sowie die α -Ketoglutarat- und die Malat-Dehydrogenase des Citratzyklus (44). Mehrere Enzyme des Citratzyklus werden also durch ihr jeweiliges Produkt gehemmt, weshalb eine NADH-Akkumulation die signifikanten Erhöhungen der Citratzyklusmetabolite der vorliegenden Arbeit begründen

Diskussion

könnte. In der bereits erwähnten Studie durch Migliavacca et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der beiden Enzyme Citrat-Synthase und Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus im sarkopenen Muskel deutlich reduziert ist (163), wobei die Succinat-Dehydrogenase wie einleitend beschrieben eine Doppelfunktion im mitochondrialen Stoffwechsel hat und außerdem dem Komplex II der Atmungskette entspricht, welcher in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine abnehmende Tendenz zeigte. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und eine Abnahme ihrer Aktivität könnte zu einer Anhäufung von Succinat führen. Die Citratsynthase katalysiert den ersten Schritt des Citratzyklus, die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat (44). Eine verminderte Aktivität würde also diesen ersten Schritt des Citratzyklus beeinträchtigen und infolgedessen zunächst einen Anstieg von Oxalacetat und Acetyl-CoA verursachen. Dieses Ungleichgewicht wiederum könnte zu einer Störung des Citratzyklus führen, was im weiteren Verlauf wiederum einen Anstieg von Citrat bedingen könnte. Insgesamt deuten die verminderten Aktivitäten der Succinat-Dehydrogenase und Citratsynthase der Studie ebenfalls auf eine generelle Dysregulation des Citratzyklus bei Sarkopenie hin. Die Akkumulation von NADH ist ein plausibler Grund für diese Dysregulation, da die NADH-Anhäufung durch direkte Hemmung wie oben erwähnt einige Schlüsselenzyme des Citratzyklus inaktiviert und es infolgedessen zu einer indirekten Hemmung weiterer Enzyme kommt, wodurch der Ablauf des Citratzyklus beeinträchtigt ist und dadurch die entsprechenden Citratzyklus-Metabolite anfallen. Eine vergleichbare Studie an Rhesusaffen, in welcher der Einfluss des Alterungsprozesses und Sarkopenie auf den Stoffwechsel anhand von Muskelbiopsien des Musculus vastus lateralis untersucht wurde, zeigte ähnliche Ergebnisse. Bei den Rhesusaffen mittleren Alters und beginnender Sarkopenie wurde festgestellt, dass das Redox-Verhältnis zugunsten der reduzierten Coenzyme NADH und FAD verschoben war und diese im Skelettmuskel signifikant erhöht waren (196), wobei FAD wie einleitend beschrieben als Cofaktor der Succinat-Dehydrogenase und somit Komplex II der Atmungskette fungiert. Bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat werden zwei Elektronen und zwei Protonen auf das FAD-Molekül übertragen, wodurch FADH_2 entsteht, was bei den sarkopenen Rhesusaffen auszubleiben schien, wie sich an den erhöhten FAD Werten zeigte. Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit der abnehmenden Tendenz für die Komplex-II-Aktivität als auch den erhöhten Succinat-Werten der vorliegenden Arbeit überein, denn eine Anhäufung von Succinat könnte sich möglicherweise auf den Redoxzustand von FAD auswirken durch eine negative Rückkopplungshemmung von Komplex II. Erhöhte Succinat-Werte könnten wiederum wie oben beschrieben die Folge der Dysregulation des Citratzyklus sein. Sowohl die erhöhten NADH-Werte als auch FAD-Werte der sarkopenen Rhesusaffen deuten in Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass es im Rahmen der

Diskussion

Sarkopenie zu Veränderungen im Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid und auch den Flavin-Adenin-Dinukleotid bezogenen Stoffwechsel kommt und es ist annehmbar, dass insbesondere die verminderte Komplex-I-Aktivität als auch eine verminderte Komplex-II-Aktivität der Grund dafür sein könnten. Ein veränderter NAD⁺/NADH Stoffwechsel zeigte sich ebenfalls in der Studie durch Migliavacca et al., in welcher niedrige NAD⁺ Spiegel und somit niedrige Spiegel der oxidierten Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid im Muskel der sarkopenen Probanden festgestellt wurden (163). Die erniedrigten Werte wurden hier allerdings auf eine gestörte NAD⁺ Biosynthese und Speicherung im Muskel zurückgeführt. Die Ursache wird somit in dieser Studie nicht speziell mit der Inaktivität von Komplex I begründet, sondern mit einer verringerten Expression von Enzymen, welche unter anderem an der Regulation der NAD⁺ Biosynthese beteiligt sind. Die Abnahme des NAD⁺ Spiegels zeigte in der Studie aber zusätzlich noch eine Korrelation mit verschiedenen Parametern, wie der Handkraft, der Gehgeschwindigkeit und außerdem mit der Komplex-I-Aktivität (163). Diese Beobachtung legt nahe, dass niedrige NAD⁺ Werte mit einer reduzierten Aktivität von Komplex I einhergehen, was die Annahme unterstützt, dass die Inaktivität von Komplex I im Rahmen der Sarkopenie zu der Akkumulation von NADH maßgeblich beiträgt und dass die daraus resultierenden Veränderungen im NAD⁺/NADH-Stoffwechsel die mitochondriale Funktion bei Sarkopenie beeinträchtigen. So schlussfolgerten auch Migliavacca et al., dass die NAD⁺ Erschöpfung ein Schlüsselfaktor sein könnte, welcher die mitochondriale Aktivität und die Muskelgesundheit bei Personen mit Sarkopenie beeinflusst (163). Die Verschiebung des Redox-Verhältnisses zugunsten von NADH hat eine starke Wirkung auf das gesamte metabolische Gleichgewicht und kann zu Störungen des Zellstoffwechsels, Funktionsstörungen der Mitochondrien und damit einhergehend erhöhtem oxidativem Stress führen (197), welche häufig mit altersbedingten Krankheiten einhergehen. NAD⁺ ist für die Aufrechterhaltung und Reparatur der DNA unerlässlich und erniedrigte NAD⁺ Spiegel werden sowohl mit neurodegenerativen Erkrankungen, einer beschleunigten Seneszenz und "Inflammaging" in Verbindung gebracht, wobei letzteres den Zustand einer niedriggradigen, chronischen Entzündung im Alterungsprozess kennzeichnet und mit einer erhöhten Anfälligkeit für altersbedingte Krankheiten verbunden ist (198). Angesichts der Bedeutung von NAD⁺ bei der Regulation vielfacher Stoffwechselprozesse ist es plausibel, dass eine Akkumulation von NADH aufgrund einer verminderten Komplex-I-Aktivität eine Rolle bei der Entwicklung oder dem Fortschreiten von Sarkopenie spielen könnten, durch Beeinträchtigung des Muskelstoffwechsel, der mitochondrialen Funktion und zellulären Reparaturmechanismen.

Trotz der Tatsache, dass die im Blutserum analysierten Citratzyklusmetabolite nicht ausschließlich aus dem Muskelgewebe stammen, lassen sich daraus dennoch Er-

Diskussion

kenntnisse bezüglich des Muskelstoffwechsels und möglicher Muskelpathologien ableiten. Wie einleitend beschrieben, ist der Muskel abseits seiner mechanischen Funktion maßgeblich an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt und trägt als metabolisch aktives Organ dazu bei, den Energiehaushalt zu regulieren. In einer Übersichtsarbeit wurde dargestellt, dass insbesondere Citratzyklusmetabolite als wichtige Signale für die Substratoxidation und Substratumwandlung im aktiven Muskel fungieren, indem Metabolite wie Citrat, Succinat, Fumarat und Malat regulatorische und signalübertragende Funktionen ausführen (199). Ebenso existiert Kenntnis über einige Krankheiten, bei denen mitochondriale Pathologien und Stresssignale durch eine Veränderung der Citratzyklusmetabolite Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel nehmen. Über verschiedene Signalwege können sie eine Rolle bei Krankheitsentstehung spielen und bei mitochondrialer Dysfunktion sowohl einen Einfluss auf die Genetik und Epigenetik haben als auch eine Steuerung der Immunantwort bewirken (200). Vujic et al. schlussfolgerten, dass die Metabolite des Citratzyklus als wichtige mitochondriale Botenstoffe zwischen verschiedenen Stoffwechselorganen fungieren und nicht nur als Zwischensubstrate für die Energieerzeugung im Mitochondrium (200). Bezüglich der Diagnostik von Erkrankungen spielt beispielsweise Succinat als zirkulierender Biomarker eine zunehmend größere Rolle für diverse metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus (201) und Fettleibigkeit (202) als auch für Krebserkrankungen (203) und kardiovaskuläre Erkrankungen (204). Es ist also annehmbar, dass eine Zunahme von Citratzyklusmetaboliten im Blutserum auch Informationen bezüglich des muskulären Stoffwechsels im Kontext von Pathologien wie Sarkopenie liefern könnten. So konnte beispielsweise in einer Studie über metabolische Funktionsstörungen ein Zusammenhang von Gebrechlichkeit mit einem deutlichen Anstieg von Citratzyklusmetaboliten im Blutserum beobachtet werden. Der Unterschied zeigte sich bei durchschnittlich 79-jährigen Probanden mit diagnostizierter „Frailty“ im Vergleich zu durchschnittlich 77-jährigen Probanden ohne „Frailty“ (205). Hierbei ist erneut wichtig zu bemerken, dass es sich bei Gebrechlichkeit und Sarkopenie zwar um zwei verschiedene Krankheitsbilder handelt, diese beiden Erkrankungen im Kontext der geriatrischen Gesundheit jedoch eng miteinander verbunden sind und zumindest Hinweise auf sich überschneidende Pathophysiologien existieren (167). Die Studie durch Westbrook et al. zeigt die Wichtigkeit der Rolle der Citratzyklusmetabolite und ihre Bedeutung in der Pathophysiologie der Gebrechlichkeit, was auch für Sarkopenie von Nutzen sein könnte.

5.4.2 Diskussion der Eisenwerte

Die Aktivitätsminderung von Komplex I, welche sich für Sarkopenie in der vorliegenden Arbeit zeigte, könnte außerdem im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Serum-

Diskussion

analysen bezüglich der Eisenwerte stehen. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Zusammenhang der Transferrinsättigung und hohem Z-Score, sowie eine leicht ansteigende Tendenz der Ferritin-Werte, bei gleichzeitig nahezu unveränderten Werten des löslichen Transferrinrezeptors (sTfR) für die Probanden mit hohem Z-Score. Diese Konstellation könnte auf eine Eisenstoffwechselstörung, beziehungsweise Eisenverteilungsstörung im Rahmen der Sarkopenie hindeuten, was im weiteren Verlauf zu einem funktionellen Eisenmangel führen könnte. Der signifikante Zusammenhang der steigenden Transferrinsättigung mit dem Z-Score könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Transferrinbindungsstellen für Eisen übersättigt sind und das verfügbare Eisen nicht effizient genutzt wird, denn die gleichzeitig normalen sTfR-Werte deuten darauf hin, dass keine erhöhte Anzahl von löslichen Transferrinrezeptoren exprimiert und somit zunächst keine Unterversorgung von Eisen durch die Zellen signalisiert wird. Die ansteigende Tendenz der Ferritin-Werte wiederum könnten ein Hinweis auf eine adaptive Reaktion des Körpers sein und damit auf den Versuch, die begrenzte Verfügbarkeit von Eisen zu kompensieren, indem verstärkt vorhandenes Eisen in den Eisenspeichern gehalten wird, aber der Zelle nicht zur Verfügung steht. Ein daraus resultierender funktioneller Eisenmangel könnte Auswirkungen auf die Muskelmasse -funktion und -kraft haben. Entsprechend dieser Vermutung konnte in einer Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer verminderten Muskelmasse und einem Eisenmangel in der Allgemeinbevölkerung im Alter von 25 bis 75 Jahren festgestellt werden (206). Gleichfalls konnten Vinke et al. im Rahmen dieser Studie an einem Mausmodell zeigen, dass ein Eisenmangel die Proliferation von Myoblasten beeinträchtigt, was wiederum einen großen Einfluss auf den Muskelerhalt und die Muskelfunktion haben kann (206). Wie einleitend beschrieben ist Eisen als Baustein für die Funktion vieler Enzyme, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, unerlässlich. Die Struktur der einzelnen Enzyme der Atmungskette enthalten Eisen, entweder in Form von Eisen-Schwefel-Zentren in Komplex I, II und III, oder in Form einer Hämgruppe in Komplex III und IV, wobei Hämgruppen und Eisen-Schwefel-Zentren auch im selben Proteinkomplex, wie in den Komplexen II und III, vorhanden sein können (207). Hierbei ist zu beachten, dass Komplex I als der größte Enzymkomplex der Atmungskette auch den höchsten Anteil von insgesamt acht Eisen-Schwefel-Zentren besitzt (44, 208), was die Bedeutung von Eisen für die Funktionalität von Komplex I deutlich macht. Im Mitochondrium wird Eisen durch die Häm- und Eisen-Schwefel-Zentrum-Synthese in seine bioaktive Form umgewandelt, was entscheiden für die Aufrechterhaltung der zellulären und mitochondrialen Funktionen ist (132). Die Eisen-Schwefel-Zentren sind dabei nicht nur essenziell für die Stabilität und Funktionalität der Atmungskettenenzymkomplexe und dabei insbesondere für Komplex I (209), sondern haben weitere vielfältige Aufgaben im sowohl zellulären als auch mitochondrialen Stoffwechsel (210). Das Eisenatom

Diskussion

spielt als Donor und Akzeptor für Elektronen im Wechsel zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand im Eisen-Schwefel-Zentrum eine entscheidende Rolle, unter anderem im Citratzyklus als Cofaktor für die Aktivität verschiedener Enzyme und in der oxidativen Phosphorylierung (210). Daraus wird ersichtlich, dass die Eisenverfügbarkeit einen direkten Einfluss auf die Energieproduktion hat (211). In einer Übersichtsarbeit bezüglich Eisen-Schwefel-Zentren konnte gezeigt werden, dass eine Dysregulation der Eisen-Schwefel-Zentrum-Synthese schwere Auswirkungen auf die Zellfunktion und im weiteren Verlauf auf die Gesundheit haben kann (209). Entsprechend konnten die Ergebnisse einer Studie an einem Mausmodell, in welchem der Einfluss von eisenregulierenden Proteinen auf die mitochondriale Funktion untersucht wurde, zeigen, dass ein mitochondrialer Eisenmangel unter anderem die Eisen-Schwefel-Zentren in ihrer Funktion beeinträchtigt (137). Es ist also anzunehmen, dass ein Eisenmangel oder generell ein gestörter Eisenstoffwechsel, beziehungsweise eine gestörte Eisenhomöostase wie in der vorliegenden Arbeit in einer gestörten Synthese und damit gestörten Funktion der Eisen-Schwefel-Zentren resultiert. Dies könnte insbesondere auf Komplex I der Atmungskette einen großen Einfluss haben und zu einer Funktionsstörung und infolgedessen einer Aktivitätsminderung von Komplex I führen. Gemäß dieser Annahme konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass ein Eisenmangel ohne das Auftreten einer Anämie zu einer signifikanten Aktivitätsminderung von Komplex I im Skelettmuskel führt (212). Diese Ergebnisse zeigten sich vor allem im *Musculus soleus* mit überwiegend oxidativem Stoffwechsel und einem entsprechend größeren Anteil an Muskelfasertyp I und nicht für den *Musculus quadriceps femoris*, welcher vor allem Muskelfasern vom Typ II enthält (212). Vor dem Hintergrund, dass Sarkopenie ohnehin mit einer Muskelfaseratrophie vom Typ II einhergeht (79), würde das zusätzlich die Vermutung einer Komplex I Aktivitätsminderung aufgrund eines Eisenmangels bei Sarkopenie bestätigen. Interessanterweise zeigte sich in der genannten Studie für den Komplex IV weder im *Musculus soleus*, noch im *Musculus quadriceps femoris* eine Aktivitätsminderung zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Eisenmangel (212). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein Eisenmangel spezifisch die Komplex I Aktivität der Skelettmuskulatur betrifft, was ebenfalls die Aktivitätsminderung von Komplex I der vorliegenden Resultate begründen könnte. Gleichermäßen liefern die Ergebnisse einer weiteren Studie Aufschluss über die Bedeutung der Eisenregulation in Bezug auf Komplex I, in welcher gezeigt werden konnte, dass die Hemmung von Komplex I durch fehlreguliertes Eisen den Zelltod auslöste (213). Zwar beziehen sich die Ergebnisse von Urrutia et al. nicht auf Muskelzellen, dennoch verdeutlichen sie die Notwendigkeit einer adäquaten Eisenregulierung, um eine mitochondriale Dysfunktion zu verhindern. Außerdem werden mitochondriale Dysfunktionen, welche mit einer gestörten Regulation des Eisenstoffwechsels einhergehen mit verschiedenen Krankheitsbildern und ent-

Diskussion

sprechend mit verschiedenen Zelltypen in Verbindung gebracht (214), sodass die Ergebnisse ebenfalls Anhaltspunkte für muskuläre Erkrankungen wie Sarkopenie liefern könnten. Die zelluläre und mitochondriale Eisenhomöostase ist ein streng regulierter Prozess, an welchem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind und sowohl ein Eisenmangel als auch eine Eisenüberladung kann die zelluläre und mitochondriale Funktion stark beeinträchtigen (211). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen wie zuvor erläutert vor allem an, dass eine Dysregulation des Eisenstoffwechsels vorliegt. Diese Dysregulation könnte sowohl zu einem funktionellen Eisenmangel führen mit den beschriebenen Konsequenzen als auch zu einer Eisenüberladung. So könnten die vorliegenden Ergebnisse bezüglich des übersättigten Transportproteins, bei gleichzeitig normwertigem löslichen Transferrinrezeptor und steigender Tendenz der Werte für den Eisenspeicher Ferritin ebenso ein Zeichen dafür sein, dass die Eisenspeicher gefüllt und somit ein Überangebot an Eisen besteht. Die daraus resultierende Eisenüberladung könnte ebenso wie ein Eisenmangel einen direkten Einfluss auf den Muskelstoffwechsel und im weiteren Verlauf auf die Muskelfunktion und Muskelmasse haben. Entsprechend konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass eine übermäßige Eisenanreicherung die Differenzierung der Skelettmuskulatur hemmt und zu einem generellen Rückgang der Muskelregeneration führt und folglich zu einer verringerten Muskelmasse (215). Ergebnisse einer Studie konnten zeigen, dass bei älteren Probanden ≥ 70 Jahre Serumferritin signifikant erhöht war, im Vergleich zu der jungen Kontrollgruppe, bei gleichzeitig geringerem mtDNA-Gehalt, welche zudem eine erhöhte Anzahl an mtDNA-Schäden zeigten (133). Hieraus schlussfolgerten Picca et al., dass eine gestörte Eisenhomöostase, in diesem Fall ein Überangebot von Eisen, zum Verlust der mtDNA-Stabilität beitragen könnte. Eine instabile, beziehungsweise geschädigte mtDNA wiederum könnte in einer beeinträchtigten Synthese und folglich einer Funktionsminderung von Komplex I resultieren, wie in 5.2 beschrieben. In Anlehnung daran konnte in einem Mausmodell festgestellt werden, dass nach einer artifiziiell verursachten Eisenüberladung insbesondere die Komplexe I und IV eine verringerte Aktivität zeigten, was ebenfalls auf mtDNA-Schäden und eine veränderte Expression der mRNAs für die Untereinheiten der Atmungskettenenzyme zurückgeführt wurde (216). Diese Beispiele verdeutlichen, dass ein Überschuss an Eisen ebenfalls einen großen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hat und zu einer Aktivitätsminderung von insbesondere Komplex I führen kann, was möglicherweise zur Pathogenese der Sarkopenie beiträgt. Übereinstimmend damit wurde bereits in mehreren Studien eine Eisenanreicherung im Zusammenhang mit Sarkopenie beschrieben (217).

Obwohl Ferritin ein gängiger Marker für eine Eisenüberladung darstellen kann (218), ist es auch ein Biomarker für akute und chronische Entzündungen und somit bei einer

Diskussion

Vielzahl entzündlicher Prozesse im menschlichen Körper erhöht (219). In der bereits erwähnten Studie durch Picca et al. waren bei den älteren Probanden sowohl Ferritin, Hepcidin, Interleukin-6 als auch das C-reaktive Protein erhöht, was ebenfalls Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Eisenstoffwechsel und Entzündungen geben könnte (133). Die Ferritin Werte der vorliegenden Ergebnisse liegen für alle Gruppen und somit für nicht-sarkopene, prä-sarkopene und sarkopene Probanden über dem Normalwert, sowohl für Frauen (Normwert = 50 - 150 µg/l (218)) als auch Männer (Normwert = 15 - 200 µg/l (218)). Sie zeigen jedoch mit zunehmendem Z-Score eine ansteigende Tendenz, was auch auf eine entzündliche Reaktion im Körper hindeuten könnte, welche den Eisentransport und die Eisenverwertung beeinträchtigen könnte. Außerdem ist zu beachten, dass es sich bei der Kohorte um geriatrische und damit teils multimorbide Patienten mit einem hohen Durchschnittsalter handelt, zusätzlich mit Zustand nach einem Trauma. Die Blutentnahmen erfolgten am dritten postoperativen Tag. Es ist also annehmbar, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme entzündliche Prozesse im Körper stattgefunden haben und die Ferritin Werte postoperativ aufgrund dessen erhöht gewesen sein könnten. Dennoch zeigte sich mit steigendem Z-Score eine steigende Tendenz der Ferritinerhöhung und alle Probanden wurden unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Für eine umfassende Abklärung, ob im Rahmen der Sarkopenie eine Dysregulation des Eisenstoffwechsels vorliegt beziehungsweise ein Eisenmangel, oder eine Eisenüberladung, sollten gegebenenfalls noch weitere Laborwerte bestimmt werden, um eine differenziertere Aussage diesbezüglich treffen zu können, denn mit den gegebenen Laborwerten kann nicht eindeutig geklärt werden, ob ein Eisenmangel, oder eine Eisenüberladung die Entwicklung der Sarkopenie bedingt. Dennoch geben die vorliegenden Resultate einen Hinweis auf einen gestörten Eisenstoffwechsel bei Sarkopenie, welcher entweder zu einem Eisenmangel oder einer Eisenüberladung führen könnte und in beiden Fällen eine gestörte mitochondriale Funktion und insbesondere eine verminderte Komplex I Aktivität nach sich ziehen könnte.

5.4.3 Einfluss von Vitamin D auf Sarkopenie

Die Serumanalysen ergaben einen signifikant erniedrigten Vitamin-D-Spiegel im Zusammenhang mit einem erhöhten Z-Score. Das gibt einen Hinweis darauf, dass ein Vitamin-D-Mangel eine mögliche Rolle in der Pathogenese der Sarkopenie spielt. Diese Beobachtung stimmen mit anderen Studien überein, welche ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einem Vitamin-D-Mangel und Sarkopenie feststellen konnten (220, 221). Außerdem wurde bereits in einigen Studien eine Korrelation zwischen einem Vitamin-D-Mangel und erhöhtem Sturzrisiko beobachtet (222, 223). Dieser Zusammenhang stimmt ebenfalls mit den vorliegenden Ergebnissen überein, da bei allen

Diskussion

Probanden ein Zustand nach Sturz und Oberschenkelhalsfraktur vorliegt. In einer Studie an humanen primären Myoblastenkulturen, deren mitochondriale Respiration wie in der vorliegenden Arbeit mithilfe des Seahorse Analyzers untersucht wurde, konnte ein signifikanter Anstieg der mitochondrialen OCR nach Behandlung der Myoblasten mit 1,25(OH)₂D₃ gezeigt werden (224). Die mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate OCR verhielt sich dabei dosisabhängig und zeigte mit steigender Konzentration von 1,25(OH)₂D₃ einen entsprechenden Anstieg. Diese Beobachtung gibt einen eindeutigen Hinweis auf die direkte Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ im Zusammenhang mit einer verbesserten mitochondrialen Funktion der Myoblasten. Außerdem zeigte der dosisabhängige Anstieg der OCR eine Korrelation mit dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR), wodurch die OCR ebenso von der Expression des VDR abhängig zu sein scheint. Diese Beobachtung konnte in einer weiteren Studie an Myoblasten und Myotuben von Mäusen bestätigt werden, in welcher gezeigt wurde, dass ein Verlust an Vitamin-D-Rezeptoren zu einer signifikant verringerten mitochondrialen Atmung führte und die oxidative Phosphorylierung und ATP-Produktion beeinträchtigte (225). Insgesamt veranschaulichen diese Zusammenhänge, dass sowohl Vitamin D als auch der Vitamin-D-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, für die oxidative Phosphorylierung und ATP-Produktion in Muskelzellen spielen. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, wie groß der Einfluss eines Vitamin-D-Mangels auf die mitochondriale Funktion und den Energiestoffwechsel im Skelettmuskel ist. Interessanterweise wurde in einer anderen Studie an humanen primären Myoblasten beobachtet, dass Vitamin D die Proliferation von Myoblasten hemmt, was sich sowohl für humane Myoblasten als auch Maus-Myoblasten zeigte (226). Da die proliferationsinhibierende Wirkung allerdings nicht mit einer Zunahme des Zelltods einherging, wurde durch Montenegro et al. vermutet, dass Vitamin D die Quieszenz fördert und damit eine Stammzellpopulation aufrechterhält und somit letztlich die Selbsterneuerungskapazität fördert (226). Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie an humanen Myoblasten, in welcher gezeigt wurde, dass die direkte Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ hauptsächlich in Muskelvorläuferzellen stattzufinden scheint und 1,25(OH)₂D₃ bei Myoblasten zu einer Hemmung der Proliferation durch eine veränderte Expression von Zellzyklusregulatoren führt, wobei diese Effekte ebenfalls in Zusammenhang mit einer Förderung der Selbsterneuerung von Myoblasten und Aufrechterhaltung des Satellitenstammzellpools gebracht wurden (227). Im Umkehrschluss kann mithilfe dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass ein Vitamin-D-Mangel den gegenteiligen Effekt hätte und sich entsprechend negativ auf eine Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation und im weiteren Verlauf auf die Muskelregeneration auswirken würde und somit die Progression von Sarkopenie fördern könnte. In einem Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass infolge eines dreimonatigen, ernährungsbedingten Vitamin-D-

Diskussion

Mangels die mitochondriale Respiration durch Komplex I und Komplex II der Atmungskette im Vergleich zu Vitamin-D-gesättigten Mäusen um 35 bis 37 Prozent im Muskel signifikant erniedrigt war (228). In der Studie wurden zusätzlich verschiedene Marker des mitochondrialen Proteingehalts von den Untereinheiten der Atmungskettenenzyme und der Citratsynthese untersucht und es konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass ein Vitamin-D-Mangel die mitochondriale Atmung unabhängig von dem mitochondrialen Proteingehalt direkt beeinflusst (228). Das lässt darauf schließen, dass ein Vitamin-D-Mangel eher die funktionellen Aspekte der mitochondrialen Atmungskettenenzymkomplexe und davon insbesondere Komplex I und Komplex II beeinträchtigt und nicht ihre strukturelle Zusammensetzung. Im Kontext der vorliegenden Ergebnisse könnte das bedeuten, dass der Vitamin-D-Mangel in Korrelation mit steigendem Z-Score einen direkten Einfluss und gegebenenfalls ein weiterer Auslöser der Aktivitätsminderung von Komplex-I sein könnte.

Der Einfluss externer Faktoren, wie eines Vitamin-D-Mangel und einer Eisenstoffwechselstörung, vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Veränderungen, könnten somit die Ursache der Aktivitätsminderung von Komplex I darstellen, welche eine Beeinträchtigung des Citratzyklus zur Folge hat. Diese mitochondrialen Beeinträchtigungen wiederum wirken sich negativ auf den gesamten Stoffwechsel der Muskelzellen aus, was insgesamt zur Entwicklung von Sarkopenie beitragen könnte. Abschließend ist somit von einer multifaktoriellen Genese auszugehen.

5.5 Diskussion der Methodik und Limitationen

Bei der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse sollten einige Limitationen berücksichtigt werden. Diese umfassen zum einen die geringe Anzahl von insgesamt nur 31 Studienteilnehmern, wovon zehn Probanden als prä-sarkopen und nur fünf Probanden als sarkopen diagnostiziert wurden. Somit bieten sämtliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Kausalitätsnachweis, sondern lediglich einen Hinweis auf mögliche Pathologien im Zusammenhang der Sarkopenie. Zudem handelt es sich hierbei um eine Querschnittstudie, wodurch weder Rückschlüsse auf den Verlauf noch mögliche intraindividuelle Veränderungen der analysierten Variablen gezogen werden konnten.

Dennoch behält die vorliegende Arbeit eine Relevanz, da Muskelbiopsien geriatrischer Patienten mit einem Durchschnittsalter von 82 ± 6 Jahren nicht einfach zu beschaffen sind und das Probenmaterial somit von besonderem Wert ist. Da infolge der proximalen Femurfraktur ohnehin ein operativer Eingriff bei den Probanden durchgeführt wurde, konnte gleichzeitig aufgrund der günstigen anatomischen Nähe eine Biopsie vom Musculus vastus lateralis entnommen werden. Dadurch begrenzte sich zwar die Auswahl der Studienteilnehmer ausschließlich auf Patienten mit Femurfraktur, jedoch war

Diskussion

es auf diesem Wege möglich wertvolles Material, ohne einen erneuten invasiven Eingriff für die Analyse des Muskelgewebes zu entnehmen. Dennoch ergibt sich durch diese Einschlusskriterien ein Selektionsfehler, wodurch die Vergleichbarkeit auf die allgemeine ältere Bevölkerung eingeschränkt ist. Hinzu kommt, dass für die Messungen der Atmungskettenkomplex-Enzymaktivitäten nur ausreichend geeignetes Probenmaterial von insgesamt acht Probanden verfügbar war, worunter sich drei prä-sarkopene und zwei sarkopene Probanden befanden. Die in den Abbildungen dargestellten Korrelationen für die Atmungskettenenzyme mit dem Z-Score weisen entsprechend für kleine Stichproben somit nur eine geringe bis moderate Stärke auf.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass sowohl die Messungen der Handkraft als auch die BIA nach dem Sturz und anschließender operativer Versorgung der Femurfraktur erfolgt sind. Gleiches gilt für die Blutentnahmen, welche drei Tage postoperativ abgenommen wurden. Die postoperative Verfassung der Probanden könnten möglicherweise Einflüsse sowohl auf die Ergebnisse der funktionellen und physikalischen Messungen als auch auf die Resultate der laborchemischen Analyseverfahren haben. Folglich könnte der beeinträchtigte Gesundheitszustand der Studienteilnehmer die Handkraftmessung verfälscht und mögliche Effekte auf die muskulären Stoffwechselprozesse haben. Da die Untersuchungsbedingungen für alle Probanden identisch waren, ist der Einfluss auf die Messungen jedoch vernachlässigbar. Zudem war nicht bei allen Studienteilnehmern eine Blutentnahme für die Analysen möglich, oder es stand nicht ausreichend Material zur Verfügung. Für Vitamin D und die Eisenwerte war ausreichend Material von 24 Probanden, darunter 13 nicht-sarkopene, sieben prä-sarkopene und vier sarkopene Probanden vorhanden und für die Citratzyklusmetabolite stand Material von 18 Probanden zur Verfügung, darunter zehn nicht-sarkopene, fünf prä-sarkopene und drei sarkopene Probanden, wobei für die Analysen von Citrat zusätzlich das Material eines nicht-sarkopenen Probanden fehlte und somit nur von neun nicht-sarkopenen Probanden die Citratanalysen erfolgten. Außerdem könnte die Betrachtung zusätzlicher Eisen-Serumparameter, wie Transferrin, Hämoglobin, mittleres corpuskuläres Hämoglobin (MCH) und mittleres corpuskuläres Volumen (MCV) eine umfassendere Beurteilung des gestörten Eisenstoffwechsels in Bezug auf Sarkopenie erlauben. Die BIA entspricht außerdem nicht dem Goldstandard zur nichtinvasiven Quantifizierung der Muskelmasse, da im Vergleich Methoden wie Magnetresonanztomographen, oder Computertomographie eine genauere Bestimmung erlauben. Diese Verfahren kommen in der Primärversorgung aufgrund des hohen Kostenaufwands und des Bedarfs hochqualifizierten Personals kaum zur Anwendung (54, 229). Eine zusätzliche Option zur BIA, welche in Klinik und Forschung derzeit zur Bestimmung der Muskelmasse und zur Diagnostik für Sarkopenie häufig Verwendung findet,

Diskussion

ist die DXA (230). Hierbei handelt es sich um die einzige, radiologische Messmethode mit anerkannten Grenzwerten für die Diagnose von Sarkopenie, welches sowohl ein hohes Maß an Genauigkeit und dadurch eine präzise Bestimmung der Muskelmasse als auch reproduzierbare und damit im Zeitverlauf vergleichbare Ergebnisse liefert (230). Zwar ist die Strahlenbelastung der DXA-Messungen gering, allerdings sind die DXA-Messinstrumente nicht portabel und somit bei bettlägerigen Patienten postoperativ nur erschwert einsetzbar (230). Die BIA-Messinstrumente hingegen sind portabel und komplikationslos einzusetzen. Die BIA bietet insgesamt mehr Flexibilität, sowohl für das Forschungsteam als auch für die Probanden, weshalb in der vorliegenden Studie die BIA-Messmethodik zur Quantifizierung der Skelettmuskelmasse gewählt wurde. Nach Empfehlungen der EWGSOP2 wurden die Messergebnisse mithilfe der Gleichung durch Sergi et al. standardisiert (55, 157), wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wurde.

Bezüglich der Echtzeitmessungen des Metabolismus mithilfe des Seahorse XFp Analyzers könnte eine potenziell ungleichmäßige Verteilung der Zellen in den einzelnen Wells in der Mikroplatte eine weitere Einschränkung der Studie darstellen. Zwar wurde am Tag vor der Messung eine Zellzählung durchgeführt und vor dem Beimpfen jedes Wells die Zellsuspension sorgfältig resuspendiert, sowie am Tag der Messung die Wells mikroskopisch auf Zellwachstum und eine homogene Verteilung kontrolliert, jedoch besteht die Möglichkeit geringerer Abweichungen der Zellzahl zwischen den verschiedenen Wells, was infolge zu Messungenauigkeiten führen könnte und somit eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen beeinträchtigen könnte. Durch die sorgfältige Durchführung, sowie die weitgehend automatisierte Durchführung des Seahorse Verfahrens konnten jedoch Messungenauigkeiten bestmöglich reduziert werden. Da das Verfahren insgesamt nur wenig Probenmaterial erfordert, eignete sich diese Technik gut zur Untersuchung des Metabolismus der Myoblastenzellkulturen und die Messmethodik liefert wertvolle Informationen über die mitochondrialen und zellulären Funktionen in Echtzeit (231). Dennoch ist unklar, inwieweit der Stoffwechsel der Myoblastenzellkulturen von gesundheitlich beeinträchtigten Probanden mit einem Durchschnittsalter von 82 ± 6 Jahren in vitro mit den komplexen Stoffwechselforgängen der Myoblasten in vivo vergleichbar ist. Deshalb geben die vorliegenden Ergebnisse die Stoffwechsellage in vivo vermutlich nur bedingt wieder, stellen jedoch einen notwendigen Kompromiss in Ermangelung präziserer Messmethoden dar.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend liefert diese Studie Hinweise darauf, dass ein Komplex-I-Mangel, respektive eine Aktivitätsminderung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, eng mit der multifaktoriellen Pathogenese von Sarkopenie verzahnt ist. In Zusammenschau der Ergebnisse bezüglich der Serum- und zellbiologischen Analysen wird dabei deutlich, dass die beeinträchtigte Funktion von Komplex I viel eher durch externe Faktoren, wie ein Vitamin-D-Mangel und einen gestörten Eisenstoffwechsel verursacht wird, als durch intrinsische, genetische Veränderungen, wie die Ergebnisse der Seahorse Analysen der primären Myoblastenkulturen sarkopener Probanden vermuten lassen. Eine definitive Schlussfolgerung, ob keine intrinsischen Ursachen vorliegen, erfordert jedoch umfassendere Untersuchungen hinsichtlich des Metabolismus, die andere potenzielle Faktoren und Mechanismen unter Einsatz verschiedener methodischer Ansätze berücksichtigen. Infolge des beobachteten Komplex-I-Mangels scheint es zu einer Beeinträchtigung des Citratzyklus zu kommen, was sich durch die erhöhten Citratzyklusmetabolite im Blutserum der sarkopenen Probanden zeigt. Diese Konstellation resultiert vermutlich in einer mitochondrialen Dysfunktion, welche zu einer Reduktion der Muskelfunktion führt und letztlich eine wichtige Ursache für die damit einhergehende Muskelschwäche im Rahmen der Sarkopenie darstellt.

Die Berücksichtigung externer Faktoren wie Vitamin D und auch Eisen sowie deren Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion bieten vielversprechende Möglichkeiten für eine schnelle Diagnostik und gegebenenfalls gezielte Therapie durch Nahrungsergänzung zur Prävention und Behandlung von Sarkopenie. Da sowohl ein Eisenmangel als auch eine Eisenüberladung pathologische Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben kann (218) und speziell einen negativen Einfluss auf mitochondriale Mechanismen wie die Atmungskette und den Citratzyklus gezeigt werden konnte, ist es von großer Bedeutung im Zusammenhang altersbedingter Veränderungen der Skelettmuskulatur eine regelrechte Eisenhomöostase aufrecht zu erhalten (232). Gleichmaßen ist ein normaler Serum-Vitamin-D-Spiegel von enormer Wichtigkeit für die Muskelfunktion (130). In einer Studie an humanen Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Vitamin-D-Supplementierung oxidativen Stress reduzieren kann, indem die Aktivität antioxidativer Enzyme verstärkt wird (233). Weiterhin konnte unter Therapie mit Vitamin D eine signifikante Verbesserung der maximalen oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien Erwachsener beobachtet werden (234). Die Studienlage zeigt, dass eine Vitamin-D-Supplementierung positive Auswirkungen auf die Gesundheit und Funktion der Muskulatur hat und insbesondere einen positiven Effekt auf mitochondriale Funktionen, weshalb sich Nahrungsergänzungen mit Vitamin D bereits als potenziell vorteilhaft für die Prävention und Behandlung von Sarkopenie erwiesen ha-

Schlussfolgerung und Ausblick

ben (235). Wie die Ergebnisse der Studie außerdem zeigen, könnten Serumspiegel der Citratzyklusmetabolite zusätzlich erste Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion im Kontext der Sarkopenie geben und perspektivisch als prognostische Marker für die Diagnostik von Sarkopenie genutzt werden. Einige Studien über das Metabolom konnten bereits zeigen, dass Metabolite eine bedeutende Rolle im Rahmen der Diagnostik für degenerative Veränderungen des Muskels spielen und wichtige neue Erkenntnisse in der Pathophysiologie des progressiven Muskelabbaus im Alter bieten, insbesondere bei Erkrankungen wie Sarkopenie (115, 236, 237). Jedoch ist weitere Forschung nötig, um die genauen molekularen Mechanismen zu verstehen, um Metabolite als diagnostisches Mittel in Zukunft gezielt einzusetzen.

Die Ätiologie von Sarkopenie ist bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt und wie die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, unterliegt die Pathogenese komplexen, multifaktoriellen Mechanismen auf sowohl zellulärer als auch molekularbiologischer und biochemischer Ebene. Um ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen zu entwickeln, bedarf es weiterer Forschung mit größeren Fallzahlen von sarkopenen Patienten, bestenfalls über einen längeren Beobachtungszeitraum. Die Serumanalysen bezüglich Citratzyklusmetaboliten, Vitamin-D- und Eisenwerten bieten ein simples und kostengünstiges, minimal-invasives diagnostisches Mittel, welches in Zukunft möglicherweise nicht nur bei der Sarkopeniediagnostik, sondern auch für therapeutische Zwecke und zur Prävention von Sarkopenie eine große Hilfestellung bieten könnte.

Literaturverzeichnis:

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183-95.
2. Heymsfield SB, Gonzalez MC, Lu J, Jia G, Zheng J. Skeletal muscle mass and quality: evolution of modern measurement concepts in the context of sarcopenia. *Proc Nutr Soc.* 2015;74(4):355-66.
3. Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodriguez-Mañas L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(9):789-96.
4. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1027-59.
5. Chal J, Pourquoi O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development.* 2017;144(12):2104-22.
6. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research & Cell Motility.* 1989;10:197-205.
7. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):500-9.
8. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447-531.
9. Greig CA, Jones DA. Muscle physiology and contraction. *Surgery (Oxford).* 2013;31(4):147-54.
10. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, Wagenmakers AJ. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol.* 2001;536(Pt 1):295-304.
11. Evans PL, McMillin SL, Weyrauch LA, Witzak CA. Regulation of Skeletal Muscle Glucose Transport and Glucose Metabolism by Exercise Training. *Nutrients.* 2019;11(10).
12. de Wendt C, Espelage L, Eickelschulte S, Springer C, Toska L, Scheel A, et al. Contraction-Mediated Glucose Transport in Skeletal Muscle Is Regulated by a Framework of AMPK, TBC1D1/4, and Rac1. *Diabetes.* 2021;70(12):2796-809.
13. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes.* 1981;30(12):1000-7.
14. Merz KE, Thurmond DC. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. *Compr Physiol.* 2020;10(3):785-809.
15. Lundsgaard AM, Fritzen AM, Kiens B. Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(1):18-30.
16. Alghannam AF, Ghaith MM, Alhussain MH. Regulation of Energy Substrate Metabolism in Endurance Exercise. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(9).
17. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(3):475-82.
18. Iizuka K, Machida T, Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *Journal of pharmacological sciences.* 2014;125(2):125-31.
19. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(1):58-74.
20. Lundby C, Jacobs RA. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Experimental physiology.* 2016;101(1):17-22.
21. Hood DA. Invited review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology.* 2001;90(3):1137-57.
22. Akbari M, Kirkwood TBL, Bohr VA. Mitochondria in the signaling pathways that control longevity and health span. *Ageing Res Rev.* 2019;54:100940.
23. Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles. *BMC biology.* 2014;12:1-7.

24. Picard M, Shirihai OS. Mitochondrial signal transduction. *Cell metabolism*. 2022;34(11):1620-53.
25. Kastaniotis AJ, Autio KJ, Kerätär JM, Monteuis G, Mäkelä AM, Nair RR, et al. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(1):39-48.
26. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem*. 2004;271(3):462-9.
27. Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J Nutr*. 2005;135(6 Suppl):1557s-64s.
28. Gao J, Zhou Q, Wu D, Chen L. Mitochondrial iron metabolism and its role in diseases. *Clin Chim Acta*. 2021;513:6-12.
29. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 2008;41(1):11-22.
30. Ashrafi G, Schwarz T. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2013;20(1):31-42.
31. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(4):204-24.
32. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu Rev Physiol*. 2019;81:19-41.
33. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2006;1763(5-6):542-8.
34. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 2013;155(1):160-71.
35. Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*. 2006;175(2):237-47.
36. Nielsen J, Gejl KD, Hey-Mogensen M, Holmberg HC, Suetta C, Krstrup P, et al. Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2017;595(9):2839-47.
37. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(12):872-84.
38. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*. 2018;20(7):745-54.
39. Bornstein R, Gonzalez B, Johnson SC. Mitochondrial pathways in human health and aging. *Mitochondrion*. 2020;54:72-84.
40. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:701-22.
41. Hargreaves M, Spriet LL. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*. 2020;2(9):817-28.
42. Mookerjee SA, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *J Biol Chem*. 2017;292(17):7189-207.
43. Bénit P, Letouzé E, Rak M, Aubry L, Burnichon N, Favier J, et al. Unsuspected task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2014;1837(8):1330-7.
44. Rassow Joachim HK, Netzker Roland, Deutzman Rainer. *Biochemie Duale Reihe 3. Auflage*. Biochemie. 32012. p. 103-15; 61-79.
45. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*. 2014;68(3):475-8.
46. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B, et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*. 2012;337(6090):93-6.

47. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol*. 2012;590(14):3349-60.
48. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(34):30409-12.
49. Gibala M, Young M, Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta physiologica scandinavica*. 2000;168(4):657-65.
50. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(6):711-23.
51. Stroud DA, Surgenor EE, Formosa LE, Reljic B, Frazier AE, Dibley MG, et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*. 2016;538(7623):123-6.
52. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*. 2018;552:50-9.
53. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr*. 1997;127(5 Suppl):990s-1s.
54. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyere O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(4):601.
55. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010;39(4):412-23.
56. Drey M, Ferrari U, Schraml M, Kemmler W, Schoene D, Franke A, et al. German Version of SARC-F: Translation, Adaption, and Validation. *J Am Med Dir Assoc*. 2020;21(6):747-51.e1.
57. Schaupp A, Martini S, Schmidmaier R, Drey M. [Diagnostic and therapeutic approach to sarcopenia]. *Z Gerontol Geriatr*. 2021;54(7):717-24.
58. Tournadre A, Vial G, Capel F, Soubrier M, Boirie Y. Sarcopenia. *Joint Bone Spine*. 2019;86(3):309-14.
59. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003:159-216.
60. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2006;61(10):1059-64.
61. Macaluso A, De Vito G. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. *European journal of applied physiology*. 2004;91:450-72.
62. Samson MM, Meeuwssen I, Crowe A, Dessens J, Duursma SA, Verhaar H. Relationships between physical performance measures, age, height and body weight in healthy adults. *Age and ageing*. 2000;29(3):235-42.
63. Janssen I, Heymsfield SB, Wang Z, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of applied physiology*. 2000.
64. Tzankoff S, Norris A. Effect of muscle mass decrease on age-related BMR changes. *Journal of Applied Physiology*. 1977;43(6):1001-6.
65. Kim TN, Choi KM. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *Journal of bone metabolism*. 2013;20(1):1-10.
66. Morley JE, Anker SD, von Haehling S. Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014. Springer; 2014. p. 253-9.
67. Kortebein P, Ferrando A, Lombeida J, Wolfe R, Evans WJ. Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *Jama*. 2007;297(16):1769-74.

68. Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, Van Loon LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta physiologica*. 2014;210(3):600-11.
69. Wilkinson DJ, Piasecki M, Atherton PJ. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing research reviews*. 2018;47:123-32.
70. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy?: Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15-to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences*. 1988;84(2-3):275-94.
71. Doherty TJ, Vandervoort AA, Brown WF. Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Canadian journal of applied physiology*. 1993;18(4):331-58.
72. Hepple RT, Rice CL. Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2016;594(8):1965-78.
73. Kwon YN, Yoon SS. Sarcopenia: Neurological Point of View. *J Bone Metab*. 2017;24(2):83-9.
74. Drey M, Krieger B, Sieber CC, Bauer JM, Hettwer S, Bertsch T, et al. Motoneuron loss is associated with sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2014;15(6):435-9.
75. Nilwik R, Snijders T, Leenders M, Groen BB, van Kranenburg J, Verdijk LB, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Experimental gerontology*. 2013;48(5):492-8.
76. Brunner F, Schmid A, Sheikhzadeh A, Nordin M, Yoon J, Frankel V. Effects of aging on Type II muscle fibers: a systematic review of the literature. *Journal of aging and physical activity*. 2007;15(3):336-48.
77. Skelton DA, Greig CA, Davies JM, Young A. Strength, power and related functional ability of healthy people aged 65–89 years. *Age and ageing*. 1994;23(5):371-7.
78. Yu F, Hedström M, Cristea A, Dalén N, Larsson L. Effects of ageing and gender on contractile properties in human skeletal muscle and single fibres. *Acta Physiologica*. 2007;190(3):229-41.
79. Tanganelli F, Meinke P, Hofmeister F, Jarmusch S, Baber L, Mehaffey S, et al. Type-2 muscle fiber atrophy is associated with sarcopenia in elderly men with hip fracture. *Experimental Gerontology*. 2021;144:111171.
80. Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, Van Loon LJ. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age*. 2014;36:545-57.
81. Cai Z, Liu D, Yang Y, Xie W, He M, Yu D, et al. The role and therapeutic potential of stem cells in skeletal muscle in sarcopenia. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):28.
82. Huo F, Liu Q, Liu H. Contribution of muscle satellite cells to sarcopenia. *Frontiers in Physiology*. 2022:1652.
83. Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:246.
84. Gelfi C, Viganò A, Ripamonti M, Pontoglio A, Begum S, Pellegrino MA, et al. The human muscle proteome in aging. *Journal of proteome research*. 2006;5(6):1344-53.
85. Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodriguez-Mañas L. Skeletal muscle regulates metabolism via interorgan crosstalk: roles in health and disease. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2016;17(9):789-96.
86. Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle aging. *Proteomics*. 2009;9(4):989-1003.
87. Ubaida-Mohien C, Lyashkov A, Gonzalez-Freire M, Tharakan R, Shardell M, Moaddel R, et al. Discovery proteomics in aging human skeletal muscle finds change in spliceosome, immunity, proteostasis and mitochondria. *Elife*. 2019;8:e49874.
88. Theron L, Gueugneau M, Coudy C, Viala D, Bijlsma A, Butler-Browne G, et al. Label-free quantitative protein profiling of vastus lateralis muscle during human aging. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014;13(1):283-94.

89. Dowling P, Gargan S, Swandulla D, Ohlendieck K. Fiber-Type Shifting in Sarcopenia of Old Age: Proteomic Profiling of the Contractile Apparatus of Skeletal Muscles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2415.
90. Burd NA, Gorissen SH, Van Loon LJ. Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exercise and sport sciences reviews*. 2013;41(3):169-73.
91. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, et al. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *The FASEB Journal*. 2005;19(3):1-22.
92. Barclay RD, Burd NA, Tyler C, Tillin NA, Mackenzie RW. The role of the IGF-1 signaling cascade in muscle protein synthesis and anabolic resistance in aging skeletal muscle. *Frontiers in nutrition*. 2019;6:146.
93. Breen L, Phillips SM. Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing. *Nutrition & metabolism*. 2011;8(1):1-11.
94. Kiesswetter E. Ernährung und Sarkopenie. *Aktuelle Ernährungsmedizin*. 2018;43(01):23-7.
95. Liang Z, Zhang T, Liu H, Li Z, Peng L, Wang C, et al. Inflammaging: The ground for sarcopenia? *Experimental Gerontology*. 2022:111931.
96. Dalle S, Rossmeslova L, Koppo K. The role of inflammation in age-related sarcopenia. *Frontiers in physiology*. 2017;8:1045.
97. Sharma B, Dabur R. Role of pro-inflammatory cytokines in regulation of skeletal muscle metabolism: a systematic review. *Current medicinal chemistry*. 2020;27(13):2161-88.
98. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Møller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF- α and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;291(1):E108-E14.
99. Priego T, Martín A, González-Hedström D, Granado M, López-Calderón A. Role of hormones in sarcopenia. *Vitamins and Hormones*. 115: Elsevier; 2021. p. 535-70.
100. van den Beld AW, Kaufman J-M, Zillikens MC, Lamberts SW, Egan JM, van der Lely AJ. The physiology of endocrine systems with ageing. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018;6(8):647-58.
101. Baumgartner RN, Waters DL, Gallagher D, Morley JE, Garry PJ. Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mechanisms of ageing and development*. 1999;107(2):123-36.
102. Marty E, Liu Y, Samuel A, Or O, Lane J. A review of sarcopenia: Enhancing awareness of an increasingly prevalent disease. *Bone*. 2017;105:276-86.
103. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):724-31.
104. Lowe DA, Baltgalvis KA, Greising SM. Mechanisms behind estrogens' beneficial effect on muscle strength in females. *Exercise and sport sciences reviews*. 2010;38(2):61.
105. Bouchi R, Fukuda T, Takeuchi T, Nakano Y, Murakami M, Minami I, et al. Insulin treatment attenuates decline of muscle mass in Japanese patients with type 2 diabetes. *Calcified tissue international*. 2017;101:1-8.
106. DeFronzo RA. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes*. 1979;28(12):1095-101.
107. Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL, et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(6):768.
108. Moon SS. Low skeletal muscle mass is associated with insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Endocr J*. 2014;61(1):61-70.

109. Cleasby ME, Jamieson PM, Atherton PJ. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J Endocrinol*. 2016;229(2):R67-R81.
110. Zadik Z, Chalew SA, McCarter RJ, Jr., Meistas M, Kowarski AA. The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60(3):513-6.
111. Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2014;2(10):819-29.
112. Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*. 2008;9:213-28.
113. Martín AI, Priego T, López-Calderón A. Hormones and Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:207-33.
114. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *Journal of endocrinology*. 2010;205(3):201-10.
115. Marques J, Shokry E, Uhl O, Baber L, Hofmeister F, Jarmusch S, et al. Sarcopenia: investigation of metabolic changes and its associated mechanisms. *Skeletal Muscle*. 2023;13(1):1-13.
116. Bian A, Ma Y, Zhou X, Guo Y, Wang W, Zhang Y, et al. Association between sarcopenia and levels of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the elderly. *BMC musculoskeletal disorders*. 2020;21:1-9.
117. Jarmusch S, Baber L, Bidlingmaier M, Ferrari U, Hofmeister F, Hintze S, et al. Influence of IGF-I serum concentration on muscular regeneration capacity in patients with sarcopenia. *BMC musculoskeletal disorders*. 2021;22:1-11.
118. Organization WH. Physical activity factsheets for the 28 European Union member states of the WHO European Region. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2018.
119. Mijnders DM, Koster A, Schols JM, Meijers JM, Halfens RJ, Gudnason V, et al. Physical activity and incidence of sarcopenia: the population-based AGES—Reykjavik Study. *Age and ageing*. 2016;45(5):614-20.
120. Leij-Halfwerk S, Verwijs MH, van Houdt S, Borkent JW, Gaitoli P, Pelgrim T, et al. Prevalence of protein-energy malnutrition risk in European older adults in community, residential and hospital settings, according to 22 malnutrition screening tools validated for use in adults \geq 65 years: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2019;126:80-9.
121. Norman K, Haß U, Pirlich M. Malnutrition in older adults—recent advances and remaining challenges. *Nutrients*. 2021;13(8):2764.
122. Conzade R, Koenig W, Heier M, Schneider A, Grill E, Peters A, et al. Prevalence and predictors of subclinical micronutrient deficiency in German older adults: results from the population-based KORA-age study. *Nutrients*. 2017;9(12):1276.
123. Sánchez-Rodríguez D, Marco E, Ronquillo-Moreno N, Miralles R, Vázquez-Ibar O, Escalada F, et al. Prevalence of malnutrition and sarcopenia in a post-acute care geriatric unit: Applying the new ESPEN definition and EWGSOP criteria. *Clin Nutr*. 2017;36(5):1339-44.
124. Gingrich A, Volkert D, Kiesswetter E, Thomanek M, Bach S, Sieber CC, et al. Prevalence and overlap of sarcopenia, frailty, cachexia and malnutrition in older medical inpatients. *BMC Geriatr*. 2019;19(1):120.
125. Eckert C, Gell NM, Wingood M, Schollmeyer J, Tarleton E. Malnutrition risk, rurality, and falls among community-dwelling older adults. *The journal of nutrition, health & aging*. 2021;25:624-7.
126. Conzade R, Grill E, Bischoff-Ferrari HA, Ferrari U, Horsch A, Koenig W, et al. Vitamin D in relation to incident sarcopenia and changes in muscle parameters among older adults: the KORA-Age Study. *Calcified tissue international*. 2019;105(2):173-82.

127. Ceglia L, Harris SS. Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Calcif Tissue Int.* 2013;92(2):151-62.
128. Latham CM, Brightwell CR, Keeble AR, Munson BD, Thomas NT, Zagzoog AM, et al. Vitamin D Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Mitochondrial Health. *Front Physiol.* 2021;12:660498.
129. Girgis CM. Vitamin D and Skeletal Muscle: Emerging Roles in Development, Anabolism and Repair. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):47-57.
130. Dzik KP, Kaczor JJ. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur J Appl Physiol.* 2019;119(4):825-39.
131. Stugiewicz M, Tkaczyszyn M, Kasztura M, Banasiak W, Ponikowski P, Jankowska EA. The influence of iron deficiency on the functioning of skeletal muscles: experimental evidence and clinical implications. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(7):762-73.
132. Levi S, Rovida E. The role of iron in mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(7):629-36.
133. Picca A, Mankowski RT, Kamenov G, Anton SD, Manini TM, Buford TW, et al. Advanced Age Is Associated with Iron Dyshomeostasis and Mitochondrial DNA Damage in Human Skeletal Muscle. *Cells.* 2019;8(12).
134. Dzegala M, Josiak K, Kasztura M, Kobak K, von Haehling S, Banasiak W, et al. Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018;9(5):802-15.
135. Napier I, Ponka P, Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood.* 2005;105(5):1867-74.
136. Busti F, Campostrini N, Martinelli N, Girelli D. Iron deficiency in the elderly population, revisited in the hepcidin era. *Front Pharmacol.* 2014;5:83.
137. Galy B, Ferring-Appel D, Sauer SW, Kaden S, Lyoumi S, Puy H, et al. Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. *Cell Metab.* 2010;12(2):194-201.
138. Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol.* 2016;594(16):4499-512.
139. Picca A, Calvani R, Bossola M, Allocca E, Menghi A, Pesce V, et al. Update on mitochondria and muscle aging: all wrong roads lead to sarcopenia. *Biol Chem.* 2018;399(5):421-36.
140. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, et al. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2288-301.
141. Calvani R, Joseph AM, Adihetty PJ, Miccheli A, Bossola M, Leeuwenburgh C, et al. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem.* 2013;394(3):393-414.
142. Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences.* 2010;65(2):119-28.
143. Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(15):5618-23.
144. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology.* 2010;45(7-8):466-72.
145. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009;47(4):333-43.
146. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Nuclear-Encoded Genes, Enzyme Regulation, and Pathophysiology.* 2012:145-69.
147. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340:209-344.

148. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.
149. Papa S, Skulachev V. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Detection of mitochondrial diseases. 1997:305-19.
150. Bua E, Johnson J, Herbst A, Delong B, McKenzie D, Salamat S, et al. Mitochondrial DNA–deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *The American Journal of Human Genetics.* 2006;79(3):469-80.
151. Herbst A, Lee CC, Vandiver AR, Aiken JM, McKenzie D, Hoang A, et al. Mitochondrial DNA deletion mutations increase exponentially with age in human skeletal muscle. *Aging clinical and experimental research.* 2021;33:1811-20.
152. Breitenbach M, Rinnerthaler M, Hartl J, Stincone A, Vowinckel J, Breitenbach-Koller H, et al. Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. *FEMS yeast research.* 2014;14(1):198-212.
153. Sligar J, DeBruin DA, Saner NJ, Philp AM, Philp A. The importance of mitochondrial quality control for maintaining skeletal muscle function across health span. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2022;322(3):C461-C7.
154. Alway SE, Mohamed JS, Myers MJ. Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev.* 2017;45(2):58-69.
155. Fazelzadeh P, Hangelbroek RW, Tieland M, de Groot LC, Verdijk LB, van Loon LJ, et al. The Muscle Metabolome Differs between Healthy and Frail Older Adults. *J Proteome Res.* 2016;15(2):499-509.
156. Gu X, Wang W, Yang Y, Lei Y, Liu D, Wang X, et al. The Effect of Metabolites on Mitochondrial Functions in the Pathogenesis of Skeletal Muscle Aging. *Clin Interv Aging.* 2022;17:1275-95.
157. Sergi G, De Rui M, Veronese N, Bolzetta F, Berton L, Carraro S, et al. Assessing appendicular skeletal muscle mass with bioelectrical impedance analysis in free-living Caucasian older adults. *Clin Nutr.* 2015;34(4):667-73.
158. Gstraunthaler G, Lindl T. Zell-und Gewebekultur. *Zell-und Gewebekultur.* 2013;10:978-3.
159. Fischer JC, Ruitenbeek W, Gabreëls FJ, Janssen AJ, Renier WO, Sengers RC, et al. A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme Q. *Eur J Pediatr.* 1986;144(5):441-4.
160. Fischer JC, Ruitenbeek W, Stadhouders AM, Trijbels JM, Sengers RC, Janssen AJ, et al. Investigation of mitochondrial metabolism in small human skeletal muscle biopsy specimens. Improvement of preparation procedure. *Clin Chim Acta.* 1985;145(1):89-99.
161. Marchioro L, Hellmuth C, Uhl O, Geraghty AA, O'Brien EC, Horan MK, et al. Associations of maternal and fetal SCD-1 markers with infant anthropometry and maternal diet: Findings from the ROLO study. *Clin Nutr.* 2020;39(7):2129-36.
162. Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Solarino G, Santacrose G, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1226(1):73-82.
163. Migliavacca E, Tay SKH, Patel HP, Sonntag T, Civiletto G, McFarlane C, et al. Mitochondrial oxidative capacity and NAD(+) biosynthesis are reduced in human sarcopenia across ethnicities. *Nat Commun.* 2019;10(1):5808.
164. Zahn JM, Sonu R, Vogel H, Crane E, Mazan-Mamczarz K, Rabkin R, et al. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS genetics.* 2006;2(7):e115.
165. Andreux PA, Van Diemen MP, Heezen MR, Auwerx J, Rinsch C, Groeneveld GJ, et al. Mitochondrial function is impaired in the skeletal muscle of pre-frail elderly. *Scientific reports.* 2018;8(1):1-12.
166. Martin FC, Ranhoff AH. Frailty and Sarcopenia. In: Falaschi P, Marsh D, editors. *Orthogeriatrics: The Management of Older Patients with Fragility Fractures.* Cham (CH): Springer

167. Morley JE. Frailty and sarcopenia in elderly. *Wien Klin Wochenschr.* 2016;128(Suppl 7):439-45.
168. Pestronk A, Keeling R, Choksi R. Sarcopenia, age, atrophy, and myopathy: Mitochondrial oxidative enzyme activities. *Muscle Nerve.* 2017;56(1):122-8.
169. Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, Ciciliot S, Vindigni V, Schiaffino S, et al. Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell reports.* 2017;19(11):2396-409.
170. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1997;94(2):514-9.
171. Basu U, Bostwick AM, Das K, Dittenhafer-Reed KE, Patel SS. Structure, mechanism, and regulation of mitochondrial DNA transcription initiation. *J Biol Chem.* 2020;295(52):18406-25.
172. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017;8(3):349-69.
173. Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi A-R, Blondy P, Lombès A, et al. Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscular Disorders.* 2002;12(5):484-93.
174. Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. Skeletal Muscle Mitochondria and Aging: A Review. *Journal of Aging Research.* 2012;2012:1-20.
175. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 1992;256(5057):628-32.
176. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 2013;1(1):304-12.
177. Hahn A, Zuryn S. Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(9).
178. Słodki S, Bogucka J. Mitochondrial theory of skeletal muscle ageing—new facts, new doubts. *Journal of Veterinary Research.* 2019;63(1):149-60.
179. Chocron ES, Munkácsy E, Pickering AM. Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 2019;1865(2):285-97.
180. Hiona A, Leeuwenburgh C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental gerontology.* 2008;43(1):24-33.
181. Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltramin A, Boncompagni S, et al. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol.* 2004;39(1):17-24.
182. Foreman NA, Hesse AS, Ji LL. Redox signaling and sarcopenia: searching for the primary suspect. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(16):9045.
183. Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Experimental gerontology.* 2004;39(9):1391-400.
184. Shah VO, Scariano J, Waters D, Qualls C, Morgan M, Pickett G, et al. Mitochondrial DNA deletion and sarcopenia. *Genetics in Medicine.* 2009;11(3):147-52.
185. Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, Pamplona R, Seo AY, Hofer T, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS One.* 2010;5(7):e11468.
186. Abramov AY, Angelova PR. Cellular mechanisms of complex I-associated pathology. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(6):1963-9.
187. Sazanov LA. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(6):375-88.
188. Bortoli S, Renault V, Mariage-Samson R, Eveno E, Auffray C, Butler-Browne G, et al. Modifications in the myogenic program induced by in vivo and in vitro aging. *Gene.* 2005;347(1):65-72.

189. Baraibar M, Hyzewicz J, Rogowska-Wrzesinska A, Bulteau AL, Prip-Buus C, Butler-Browne G, et al. Impaired metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. *Free Radic Biol Med*. 2014;75 Suppl 1:S23.
190. Hamon MP, Ahmed EK, Baraibar MA, Friguet B. Proteome Oxidative Modifications and Impairment of Specific Metabolic Pathways During Cellular Senescence and Aging. *Proteomics*. 2020;20(5-6):e1800421.
191. Marrone M, La Rovere RML, Guarnieri S, Di Filippo ES, Monaco G, Pietrangelo T, et al. Superoxide Anion Production and Bioenergetic Profile in Young and Elderly Human Primary Myoblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2615372.
192. Coen PM, Jubrias SA, Distefano G, Amati F, Mackey DC, Glynn NW, et al. Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2013;68(4):447-55.
193. Paasuke R, Eimre M, Piirsoo A, Peet N, Laada L, Kadaja L, et al. Proliferation of Human Primary Myoblasts Is Associated with Altered Energy Metabolism in Dependence on Ageing In Vivo and In Vitro. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8296150.
194. Alsharidah M, Lazarus NR, George TE, Agle CC, Velloso CP, Harridge SD. Primary human muscle precursor cells obtained from young and old donors produce similar proliferative, differentiation and senescent profiles in culture. *Aging Cell*. 2013;12(3):333-44.
195. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):102.
196. Pugh TD, Conklin MW, Evans TD, Polewski MA, Barbian HJ, Pass R, et al. A shift in energy metabolism anticipates the onset of sarcopenia in rhesus monkeys. *Aging Cell*. 2013;12(4):672-81.
197. Amjad S, Nisar S, Bhat AA, Shah AR, Frenneaux MP, Fakhro K, et al. Role of NAD(+) in regulating cellular and metabolic signaling pathways. *Mol Metab*. 2021;49:101195.
198. Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdin E. NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):119-41.
199. Maurer J, Hoene M, Weigert C. Signals from the Circle: Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates as Myometabokines. *Metabolites*. 2021;11(8).
200. Vujic A, Koo ANM, Prag HA, Krieg T. Mitochondrial redox and TCA cycle metabolite signaling in the heart. *Free Radic Biol Med*. 2021;166:287-96.
201. Ceperuelo-Mallafre V, Llauro G, Keiran N, Benaiges E, Astiarraga B, Martínez L, et al. Preoperative Circulating Succinate Levels as a Biomarker for Diabetes Remission After Bariatric Surgery. *Diabetes Care*. 2019;42(10):1956-65.
202. Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, Queipo-Ortuño MI, Bernal R, Gomez-Huelgas R, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *Isme j*. 2018;12(7):1642-57.
203. Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, Prag HA, Chouchani ET, O'Neill LA, et al. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat Metab*. 2019;1:16-33.
204. Cui H, Chen Y, Li K, Zhan R, Zhao M, Xu Y, et al. Untargeted metabolomics identifies succinate as a biomarker and therapeutic target in aortic aneurysm and dissection. *Eur Heart J*. 2021;42(42):4373-85.
205. Westbrook R, Zhang C, Yang H, Tian J, Guo S, Xue QL, et al. Metabolomics-Based Identification of Metabolic Dysfunction in Frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2022;77(12):2367-72.
206. Vinke JSJ, Gorter AR, Eisenga MF, Dam WA, van der Meer P, van den Born J, et al. Iron deficiency is related to lower muscle mass in community-dwelling individuals and impairs myoblast proliferation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023;14(4):1865-79.

207. Atamna H, Walter PB, Ames BN. The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):345-53.
208. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(7):902-14.
209. Wachnowsky C, Fidai I, Cowan JA. Iron-sulfur cluster biosynthesis and trafficking - impact on human disease conditions. *Metallomics*. 2018;10(1):9-29.
210. Stiban J, So M, Kaguni LS. Iron-Sulfur Clusters in Mitochondrial Metabolism: Multifaceted Roles of a Simple Cofactor. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(10):1066-80.
211. Wyart E, Hsu MY, Sartori R, Mina E, Rausch V, Pierobon ES, et al. Iron supplementation is sufficient to rescue skeletal muscle mass and function in cancer cachexia. *EMBO Rep*. 2022;23(4):e53746.
212. Rineau E, Gueguen N, Procaccio V, Geneviève F, Reynier P, Henrion D, et al. Iron Deficiency without Anemia Decreases Physical Endurance and Mitochondrial Complex I Activity of Oxidative Skeletal Muscle in the Mouse. *Nutrients*. 2021;13(4).
213. Urrutia PJ, Aguirre P, Tapia V, Carrasco CM, Mena NP, Núñez MT. Cell death induced by mitochondrial complex I inhibition is mediated by Iron Regulatory Protein 1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(9):2202-9.
214. Ward DM, Cloonan SM. Mitochondrial Iron in Human Health and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2019;81:453-82.
215. Ikeda Y, Satoh A, Horinouchi Y, Hamano H, Watanabe H, Imao M, et al. Iron accumulation causes impaired myogenesis correlated with MAPK signaling pathway inhibition by oxidative stress. *Faseb j*. 2019;33(8):9551-64.
216. Gao X, Qian M, Campian JL, Marshall J, Zhou Z, Roberts AM, et al. Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(3):401-7.
217. Zhao G. Is Iron Accumulation a Possible Risk Factor for Sarcopenia? *Biol Trace Elem Res*. 2018;186(2):379-83.
218. Gattermann N, Muckenthaler MU, Kulozik AE, Metzgeroth G, Hastka J. The Evaluation of Iron Deficiency and Iron Overload. *Dtsch Arztebl Int*. 2021;118(49):847-56.
219. Plays M, Müller S, Rodriguez R. Chemistry and biology of ferritin. *Metallomics*. 2021;13(5).
220. Abiri B, Vafa M. Vitamin D and Muscle Sarcopenia in Aging. *Methods Mol Biol*. 2020;2138:29-47.
221. Remelli F, Vitali A, Zurlo A, Volpato S. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Older Persons. *Nutrients*. 2019;11(12).
222. Snijder MB, van Schoor NM, Pluijm SM, van Dam RM, Visser M, Lips P. Vitamin D status in relation to one-year risk of recurrent falling in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2980-5.
223. Kotlarczyk MP, Perera S, Ferchak MA, Nace DA, Resnick NM, Greenspan SL. Vitamin D deficiency is associated with functional decline and falls in frail elderly women despite supplementation. *Osteoporos Int*. 2017;28(4):1347-53.
224. Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, Wang X, Lanza IR, Schaible NS, et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Dynamics in Human Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem*. 2016;291(3):1514-28.
225. Ashcroft SP, Bass JJ, Kazi AA, Atherton PJ, Philp A. The vitamin D receptor regulates mitochondrial function in C2C12 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;318(3):C536-c41.
226. Romeu Montenegro K, Carlessi R, Cruzat V, Newsholme P. Effects of vitamin D on primary human skeletal muscle cell proliferation, differentiation, protein synthesis and bioenergetics. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019;193:105423.
227. Olsson K, Saini A, Strömberg A, Alam S, Lilja M, Rullman E, et al. Evidence for Vitamin D Receptor Expression and Direct Effects of $1\alpha,25$ (OH)₂D₃ in Human Skeletal Muscle Precursor Cells. *Endocrinology*. 2016;157(1):98-111.

228. Ashcroft SP, Fletcher G, Philp AM, Jenkinson C, Das S, Hansbro PM, et al. Diet-induced vitamin D deficiency reduces skeletal muscle mitochondrial respiration. *J Endocrinol.* 2021;249(2):113-24.
229. Beaudart C, McCloskey E, Bruyère O, Cesari M, Rolland Y, Rizzoli R, et al. Sarcopenia in daily practice: assessment and management. *BMC Geriatr.* 2016;16(1):170.
230. Albano D, Messina C, Vitale J, Sconfienza LM. Imaging of sarcopenia: old evidence and new insights. *Eur Radiol.* 2020;30(4):2199-208.
231. Divakaruni AS, Jastroch M. A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nat Metab.* 2022;4(8):978-94.
232. Alves FM, Ayton S, Bush AI, Lynch GS, Koopman R. Age-Related Changes in Skeletal Muscle Iron Homeostasis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2023;78(1):16-24.
233. Dzik K, Skrobot W, Flis DJ, Karnia M, Libionka W, Kloc W, et al. Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. *Eur J Appl Physiol.* 2018;118(1):143-51.
234. Sinha A, Hollingsworth KG, Ball S, Cheetham T. Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E509-13.
235. Uchitomi R, Oyabu M, Kamei Y. Vitamin D and Sarcopenia: Potential of Vitamin D Supplementation in Sarcopenia Prevention and Treatment. *Nutrients.* 2020;12(10).
236. Alldritt I, Greenhaff PL, Wilkinson DJ. Metabolomics as an important tool for determining the mechanisms of human skeletal muscle deconditioning. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(24):13575.
237. Wilkinson DJ, Rodriguez-Blanco G, Dunn WB, Phillips BE, Williams JP, Greenhaff PL, et al. Untargeted metabolomics for uncovering biological markers of human skeletal muscle ageing. *Aging (Albany NY).* 2020;12(13):12517-33.

Anhang

Danksagung

Zunächst möchte ich mich aufrichtig bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Michael Drey, für die hervorragende Betreuung bedanken. Das mir entgegengebrachte Vertrauen, der sehr regelmäßige Austausch und die freundliche und effektive Kommunikation waren für die Bearbeitung dieses interessanten Themas unverzichtbar.

Gleichfalls gilt mein Dank Herrn PD. Dr. rer. med. Peter Meinke und Herrn Dr. rer. nat. Stefan Hinze. Ihre außergewöhnliche Betreuung und Unterstützung bei den Laborversuchen, sowie bei der Datenauswertung waren entscheidend für die Umsetzung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Myologischen Labors des Friedrich-Baur-Institutes der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Benedikt Schoser bedanken für die hervorragende fachliche Unterstützung, die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Bereitschaft zur Durchführung notwendiger Versuche. Außerdem danke ich dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, dem Endokrinologischen Labor der Medizinischen Klinik IV unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Martin Bidlingmaier und der Abteilung für Stoffwechsel und Ernährung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals für die Durchführung der Serumanalysen als auch dem chirurgischen Team der LMU München für die sorgfältige Beschaffung der Proben.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Team des Projekts NEUSARC für die kollegiale Zusammenarbeit, insbesondere Frau Dr. med. Stefanie Jarmusch, Herrn Fabian Hofmeister und Frau Dr. rer. nat. Fabiana Tanganelli. Ebenso möchten wir gemeinsam allen Probanden unseren Dank aussprechen, deren Teilnahme die Durchführung dieser Studie erst ermöglicht hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Gregory und Ulrike Baber und auch meinen Brüdern Gregor und Robert bedanken. Ohne die unermüdliche Unterstützung meiner Familie und das tiefe Vertrauen in mich wäre ich nicht dort, wo ich heute stehe. Ebenso gebührt ein besonderer Dank meinem Freund Philipp für seine stetige Unterstützung, Ermutigung und treue Begleitung durch alle Höhen und Tiefen des Studiums, der Promotion und weit darüber hinaus.

Meiner Familie und Philipp gilt mein größter Dank. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Lisa Anna Baber, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Komplex-I-Aktivität und mitochondriale Dysfunktion:
Zusammenhänge mit der Muskelfunktion bei Sarkopenie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung einer Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zu Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.02.2025

Ort, Datum

Lisa Anna Baber

Unterschrift der Doktorandin

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wissenschaftliche Kongressbeiträge:

- **Vortrag:**

Lisa Baber, Fabiana Tanganelli, Stefanie Jarmusch, Fabian Hofmeister, Carl Neuerburg, Stefan Mehaffey, Stefan Hintze, Peter Meinke, Benedikt Schoser, Michael Drey

Metabolisch-energetische Profile in Myoblastenkulturen von Sarkopenen Patienten

Deutsche Gesellschaft für Geriatrie e.V. (DGG) 31. Jahreskongress in Frankfurt am Main 05. - 07.09.2019

- **Poster:**

Lisa Baber, Fabiana Tanganelli, Stefanie Jarmusch, Fabian Hofmeister, Carl Neuerburg, Stefan Mehaffey, Stefan Hintze, Peter Meinke, Uta Ferrari, Benedikt Schoser, Michael Drey

Metabolic-energetic profiles in myoblast cultures of patients with sarcopenia

European Geriatric Medicine Society (EUGMS) in Krakau 25. – 27.09.2019

Publikation:

Stefan Hintze¹, Lisa Baber¹, Fabian Hofmeister, Stefanie Jarmusch, Vanessa Todorow, Stefan Mehaffey, Fabiana Tanganelli, Uta Ferrari, Carl Neuerburg, Daniel Teupser, Martin Bidlingmaier, Jair Gonzalez Marques, Berthold Koletzko, Benedikt Schoser, Michael Drey, Peter Meinke

Exploration of mitochondrial defects in sarcopenic hip fracture patients

Heliyon, 8, (2022), e11143

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11143>

Weitere Ergebnisse der NEUSARC Studie wurden veröffentlicht in:

- Tanganelli F, Meinke P, Hofmeister F, Jarmusch S, Baber L, Mehaffey S, Hintze S, Ferrari U, Neuerburg C, Kammerlander C, Schoser B, Drey M.

Type 2 muscle fiber atrophy is associated with sarcopenia in elderly men with hip fracture.

Experimental Gerontology Volume 144, February 2021, 111171

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111171>

- Hofmeister F; Baber L; Ferrari U; Hintze S; Jarmusch S; Krause S; Meinke P; Mehaffey S; Neuerburg C; Tanganelli F; Schoser B; Drey M.
Late-onset neuromuscular disorders in the differential diagnosis of sarcopenia
BMC Neurology, 21, 241 (2021).
<https://doi.org/10.1186/s12883-021-02264-y>
- Jarmusch Stefanie; Baber L; Bidlingmaier M; Ferrari U; Hofmeister F; Hintze S; Mehaffey S; Meinke P; Neuerburg C; Schoser B; Tanganelli F; Drey M.
Influence of IGF-I serum concentration on muscular regeneration capacity in sarcopenic patients
BMC Musculoskeletal Disorders 22, 807 (2021).
<https://doi.org/10.1186/s12891-021-04699-3>
- Jair Marques, Engy Shokry, Olaf Uhl, Lisa Baber, Fabian Hofmeister, Stefanie Jarmusch, Martin Bidlingmaier, Uta Ferrari, Berthold Koletzko, Michael Drey
Sarcopenia: investigation of metabolic changes and its associated mechanisms
Skeletal Muscle (2023) 13:2
<https://doi.org/10.1186/s13395-022-00312-w>