

A. Schneider, F. Graber, H. Hoppeler

Anatomisches Institut der Universität Bern

Lipofuszin: «Alterspigment» in der Muskelzelle

Zusammenfassung

Ein mehrwöchiger Aufenthalt von Bergsteigern in Höhen über 5000m verursacht eine Abnahme der Muskelmasse, einen Mitochondrienschwund und eine Akkumulation von Lipofuszin (Lf) in quergestreiften Muskelzellen. Lf ist ein ubiquitäres intrazelluläres Pigment, das schon seit langem als Mass für die Zellalterung gilt und aktuell als Folgeprodukt von Sauerstoffradikalen angesehen wird, die unter oxidativem Stress und Hypoxie vermehrt gebildet werden. Wir haben die Muskelbiopsien tibetanischer Sherpas auf deren Lf-Gehalt untersucht und dabei festgestellt, dass die Lf-Mengen trotz ähnlicher Höhenexposition signifikant niedriger sind als bei westlichen Extrembergsteigern. Diese Befunde, zusammen mit den Resultaten einer Analyse des Muskelproteoms von Tibetanern und Nepali [9], deuten darauf hin, dass die Tibetaner intrinsische, möglicherweise genetisch determinierte Detoxifikationsmechanismen besitzen, die diese hypoxischen Gewebeschäden vermindern könnten.

Schlüsselwörter:

Lipofuszin, Muskel, Sherpas, Hypoxie, HIF-1 α , Sauerstoffradikale, Lipidperoxidation

Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie» 52 (4), 162–165, 2004

Abstract

In lowlanders a sojourn above 5000m for several weeks induces muscle wasting, a loss of mitochondria and an accumulation of lipofuscin (lf) in skeletal muscle fibres. Lf is an ubiquitous intracellular pigment and a generally recognised hallmark of aging. It is currently considered to be the product of reactive oxygen species, which are formed under oxidative stress and hypoxia. While investigating the muscle biopsies of Tibetan Sherpas with a history of high altitude exposure, we found that there is a much smaller amount of Lf in their muscle fibres compared to those of caucasian mountaineers. These facts, as well as the results of a new analysis of the muscle proteome of Tibetan Sherpas and Nepali [9], let us conclude that Sherpas may possess an intrinsic and possibly genetically determined detoxification system to diminish tissue damage induced by hypoxia.

Key words:

lipofuscin, muscle, Sherpas, hypoxia, HIF- α , reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation

Was ist Lipofuszin?

Lipofuszin (Lf)-Akkumulation ist eine der auffälligsten altersabhängigen zytologischen Veränderungen in einer Vielzahl von postmitotischen Zellen in Nerven, Leber, Herz- und Skelettmuskel. Zum ersten Mal wurde dieses Pigment vor mehr als 150 Jahren in Neuronen beschrieben [11] und später «Lipofuszin» genannt [19]. Der Begriff setzt sich zusammen aus dem griechischen «lipo» für Fett und dem lateinischen «fuscus» für dunkel. Schon früh wurde erkannt, dass einerseits die Menge dieses Zellpigmentes praktisch linear mit dem Alter des betroffenen Individuums zunimmt [21] und dass andererseits die Akkumulationsrate negativ mit der Langlebigkeit korreliert. Aus diesen Gründen nannte man es Alterspigment [25, 26]. Erst viel später, durch die Entdeckung der Lysosomen und durch das Verständnis der Histochemie der lysosomalen Enzyme, wurde im Zusammenhang mit diesen Organellen die Entstehung von Lf besser verstanden [6, 8, 28].

Einige pathologische Zustände wie lysosomale Speicherkrankheiten, Malnutrition, Tumoren und strahleninduzierte Schäden können ebenfalls lysosomale Pigmentablagerungen verursachen, die ähnliche Eigenschaften haben wie Lf, sich jedoch in der Ätiologie unterscheiden [2]. Diese Pigmente werden häufig «Ceroide» genannt. Lf und Ceroide haben zwar zahlreiche gemeinsame physikochemikalische Eigenschaften und werden deshalb oftmals mit-

einander verwechselt, sie haben jedoch eine andere Gewebsverteilung sowie verschiedene Akkumulationsraten und Vorläufer [10].

Lipofuszin-Bildung

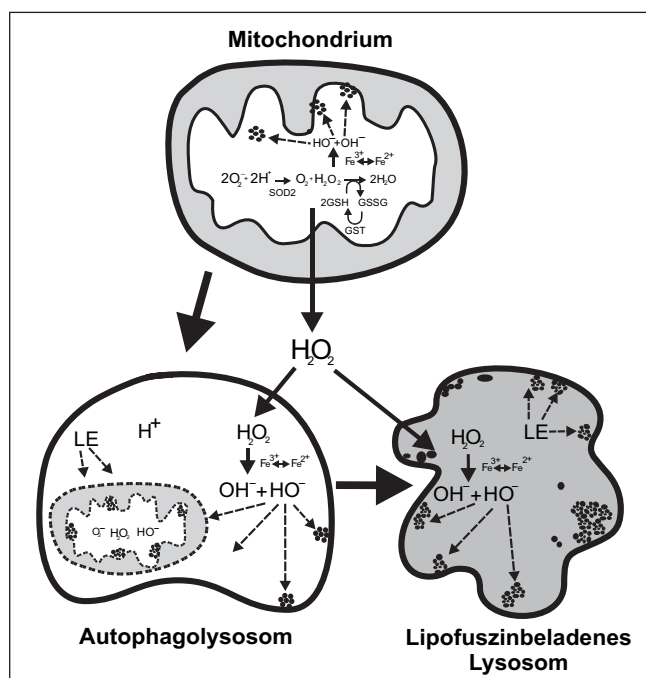
Lf ist ein chemisch und morphologisch polymorphes Material, das durch den Abbau einer Vielzahl intrazellulärer Strukturen entsteht und das primär in den lytischen Kompartimenten der Zellen, in den sogenannten Lysosomen, abgelagert wird. Die Zelle verfügt über verschiedene Mechanismen, um defekte Makromoleküle und Organellen in niedermolekulare Substanzen zu zerlegen, die entweder als solche ausgeschieden oder aber wiederverwertet werden: Einige Proteine, vor allem die kurzlebigen, werden durch zytosolische Cystein-Proteasen (Calpaine) zerkleinert, während andere durch spezielle Mini-Organellen, die sogenannten Proteasomen, degradiert werden. Die meisten langlebigen Proteine, aber speziell Makromoleküle und Organellen, werden in den Lysosomen degradiert, die verschiedene lytische Enzyme mit einem pH-Optimum im sauren Bereich enthalten.

Trotz intakter Proteasomen und Lysosomen gibt es aber immer wieder oxidativ veränderte Proteine, andere Makromoleküle oder Zellorganellen, deren Abbau unvollständig ist und die sich dadurch in den postmitotischen Zellen als «biologischer Abfall» in

Form von Lf niederlassen. Weil diese Ablagerungen bereits zum Zeitpunkt der Geburt einsetzen und sich mehr oder weniger linear fortsetzen, wird angenommen, dass die Recyclingmechanismen der Zellen unvollkommen sind, was ein wichtiger Grund für die Zellalterung darstellen könnte.

Obwohl die Zellen kontinuierlich gealterte oder beschädigte Bestandteile ersetzen, steigt mit dem Alter der Prozentsatz der schlecht funktionierenden oder wertlosen Strukturen. In den postmitotischen Zellen beginnen sich diese im Laufe des Lebens zu akkumulieren, weil sie einerseits nicht weiter abgebaut, andererseits auch nicht via Exozytose entfernt oder durch Zellteilungen verdünnt werden können, wie dies bei proliferativen Zellen möglich ist. Zellen im Knochenmark, intestinale Epithelien und andere proliferative Zellpopulationen zeigen damit keine oder nur sehr geringe Ablagerungen im Alter [10, 29]

Grundsätzlich gilt, dass sich das Material intrazellulär zu akkumulieren beginnt, sobald die Geschwindigkeit der Autophagie überschritten wird oder aber wenn das membranöse Material chemisch alteriert bzw. denaturiert wurde, z.B. durch Lipidperoxidation. Für das genaue Verständnis der Lf-Bildung müssen wir einige biochemische Überlegungen anstellen. Brunk et al. [4] postulieren ein Szenario für die Lf-Bildung unter oxidativem Stress (Sauerstoffpartialdruck von 40%) wie es in *Figur 1* dargestellt ist. Dasselbe gilt auch für die Hypoxie. Diese äusserst reaktiven HO•-Moleküle greifen die Makromoleküle in der unmittelbaren Umgebung an und verursachen deren oxidativen Veränderungen.



Figur 1: Hauptmechanismen der Lipofuszinbildung (adaptiert aus [4]): Superoxide (O_2^-) entstehen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmung. Durch die mitochondrialen Superoxiddismutasen (SOD2) werden sie weiter in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dann, in Gegenwart von Eisenionen (Fe^{2+}), in Hydroxyl-Radikale umgewandelt (OH^\bullet). Dies entspricht der sogenannten Fenton-Reaktion. Während die äusserst reaktiven HO^\bullet -Moleküle die umliegenden Makromoleküle angreifen und lokal oxidative Modifikationen verursachen, diffundiert H_2O_2 problemlos durch die ganze Zelle. Durch Autophagozytose werden oxidativ veränderte Makromoleküle (Mitochondrienteile und andere zelluläre Strukturen) in Lysosomen aufgenommen, wo ein gutes Milieu herrscht für die Bildung von HO^\bullet -Molekülen via oben genannten Mechanismus. HO^\bullet -Radikale verursachen hier weiteren oxidativen Schaden am autophagozytierten Material. Dabei werden Moleküle miteinander verknüpft, so dass als Endprodukt das nicht mehr weiter abbaubare Lipofuszin entsteht.

Beachte die Glutathion-S-Transferase (GST), die den zytoprotektiven Effekt von reduziertem Glutathion (GSH) katalysiert. Die GST ist bei den Sherpas im Vergleich zur Kontrollgruppe um einen Faktor vier überexprimiert. LE = lysosomale Enzyme.

Oxidativ beschädigte Makromoleküle, vor allem Mitochondrienteile und andere zelluläre Strukturen, werden von den Lysosomen durch Autophagozytose aufgenommen, wo sie ebenfalls durch die HO^\bullet -Radikale beschädigt und miteinander verknüpft werden (cross linking), so dass daraus das nicht mehr weiter abbaubare Lf entsteht [5, 21, 29, 31].

Zumindest in vitro vermindern Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin E, Selenium usw. die Lf-Genese, weil damit die Radikale effizient abgefangen werden können [3]. Oxidativer Stress mit einer gleichzeitigen Hemmung der lysosomalen Proteasen hingegen erhöht die Lf-Genese drastisch [4]. Diese Tatsachen scheinen obige Theorie zu bestätigen. Die Autophagozytose der Mitochondrien scheint dabei die Hauptursache der Lf-Bildung zu sein, denn die Mitochondrien sind der wichtigste Ort der Bildung von Sauerstoffradikalen und somit auch das Hauptziel ihrer Attacken.

Aspekt, Inhalt, Eigenschaften

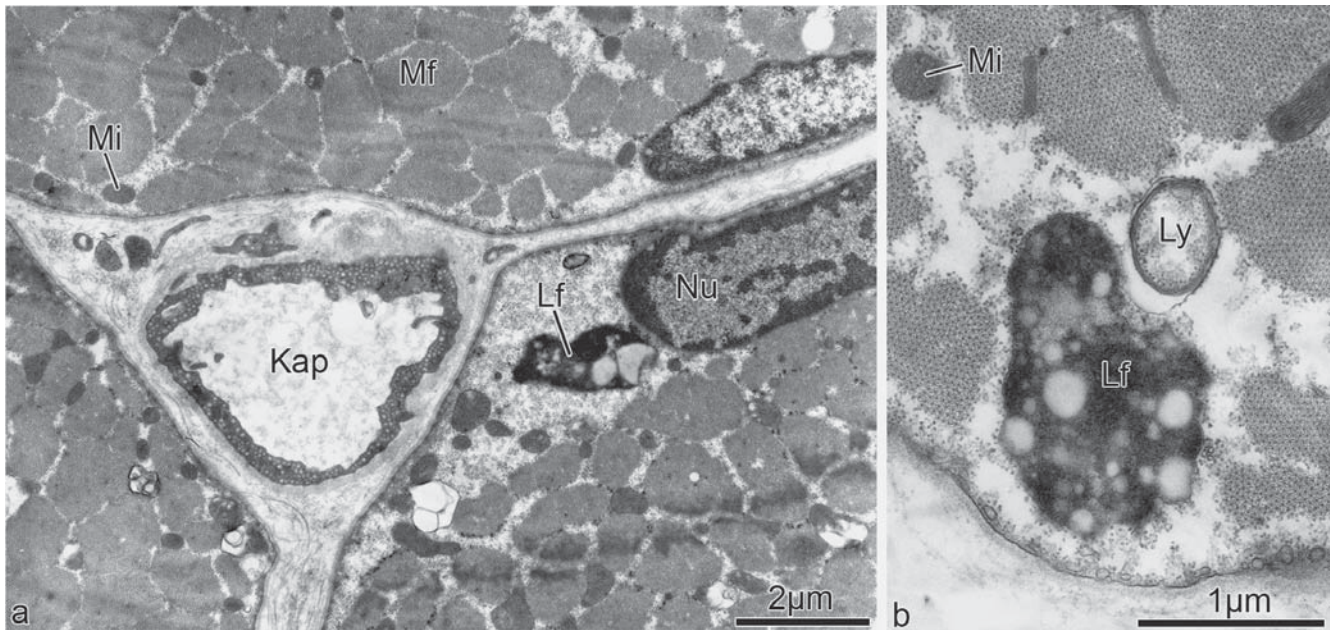
Lichtmikroskopisch sind die Lf-Körperchen gelblich-braune Pigmentflecken unterschiedlicher Farbintensität mit sehr unspezifischer Verteilung innerhalb der Zelle. Im Elektronenmikroskop imponieren sie als elektronendichte, meist runde oder unregelmässig geformte und von einer Membran umschlossenen Granula, die häufig kleine Lipidtröpfchen enthalten (*Figur 2*). Manchmal sind auch Reste von Zellorganellen erkennbar. Lf besteht zum grössten Teil aus Proteinen und Lipiden, zu einem geringen Prozentsatz enthält es aber auch Kohlenhydrate sowie Kupfer- und Eisenionen, die als Abfallprodukte des oxidativen Metabolismus angesehen werden müssen [5]. Histochemisch können diverse lysosomale Enzyme nachgewiesen werden. Eine sehr wichtige Eigenschaft des Pigmentes ist seine typische Autofluoreszenz zwischen 440 und 600 nm. Ausserdem ist es ein Fluorochrom, d.h. es kann Lysosomen auf sichtbares Licht sensibilisieren und spielt über diesen Mechanismus eine entscheidende Rolle bei der Maculadegeneration.

Heutzutage ist noch nicht ganz klar, inwieweit Lf die Zellfunktionen beeinflusst. Weil Lf-Akkumulationen mit verschiedenen anderen Veränderungen des Alters einhergehen (z.B. Proteinmodifikationen), ist es schwierig, die spezifische Rolle in altersabhängigen Erkrankungen zu identifizieren. Bei den lysosomalen Speicherkrankheiten hingegen, wo die Akkumulation von Ceroid-Pigment schnell und ausgeprägt ist, werden zahlreiche funktionelle Störungen beobachtet. Möglicherweise verursacht Lf im hohen Alter ebenfalls lysosomale Störungen.

Lipofuszin in der Muskelzelle

Dieser Übersichtsartikel beschäftigt sich speziell mit dem Lf in der Skelettmuskulatur und geht nicht weiter auf die andern Gewebe ein, in denen ebenfalls Lf gefunden werden kann. Wie erwähnt, sind Lf-Ablagerungen in einer Zelle per se nichts Pathologisches, sondern eine natürliche Nebenerscheinung des ständigen Um- und Abbaus der Zellen. Neuerdings sind jedoch Situationen erkannt worden mit grösseren Lf-Akkumulationen, die das Mass des Normalen weit übersteigen. In der Skelettmuskulatur ist dies einerseits der Fall bei einer Langzeithypoxie, wie sie beispielsweise auf mehrtägigen Bergexpeditionen in den Himalaya auftritt, andererseits auch bei chronisch pulmonalen Erkrankungen (COPD), die mit einer protrahierten Hypoxämie einhergehen. Auch in Muskeln der Rotatorenmanschetten nach Sehnenrupturen und Atrophie werden eindruckliche Lf-Mengen gefunden [persönliche Beobachtung].

Während langer Zeit wurde angenommen, dass eine hypoxische Umgebung die oxidativen Fähigkeiten der Muskeln erhöhen würde, um den Sauerstoffmangel in der Atmosphäre zu kompensieren [27, 30]. In der Zwischenzeit weiss man jedoch, dass durch chronische Hypoxie ein Mitochondrienschwund und eine Reduktion der Muskelfasergrösse stattfindet [15, 16, 18], die auch trotz Gegenregulationen durch einen hypoxieinduzierten Faktor (HIF-1 α), einem Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie eine Vielzahl von Genen induziert, nicht kompensiert wird. HIF-1 α wirkt als Haupt-



Figur 2: EM-Bilder Lipofuszin: a und b zeigen Lipofuszinakkumulationen (Lf) in Muskelbiopsien von Sherpas, die typischerweise nur eine geringe Anzahl solcher Läsionen zeigen. Das Lf liegt zumeist subsarkolemmal und in der Nähe von Myonuklei. Nu = Nukleus, Kap = Kapillare, Mi = Mitochondrium, Mf = Myofibrille, Ly = Lysosom

regulator für die Proteinexpression, die in der Hypoxieantwort des hämatopoetischen, pulmonalen, vaskulären und muskulären Systems von Bedeutung ist [17]. Das kapilläre Netzwerk bleibt von diesem Katabolismus verschont, was die Sauerstoffversorgung der Muskeln verbessert, weil die Kapillaren weniger Muskelgewebe zu versorgen haben. Eine kapilläre Neubildung, wie dies früher postuliert worden war, tritt unter Hypoxie nicht ein [14, 22].

Eine weitere bedeutende Erkenntnis war die Tatsache, dass in Muskelbiopsien von kaukasischen Expeditionsteilnehmern nach einer mehrwöchigen Höhenexposition mehr als doppelt so hohe Werte von Lf-Einschlüssen gefunden wurden als vor der Expedition [23, 24]. Wie bereits erwähnt, geht man heute davon aus, dass Lf ein Abbauprodukt vor allem der Mitochondrien darstellt und vermehrt unter Bedingungen gebildet wird, wo Sauerstoffradikale vorherrschen [5]. Die erhöhten Lf-Werte und die erniedrigten Mitochondrienwerte nach der Expedition – beides vor allem in der subsarkolemmalen Region der Muskelfasern – sprechen demnach dafür, dass während der Expedition die Mitochondrien durch Sauerstoffradikale zerstört und unvollständig zu Lf abgebaut werden.

Tiefe Mitochondrienwerte wurden 1991 auch in Biopsien von Muskeln bei Sherpas gefunden [20]. Als Sherpas bezeichnet man eine Population von etwa 30000 bis 40000 Bewohnern des himalayischen Hochgebirges, die vor allem wegen ihrer anekdotischen Ausdauer als Träger bei Expeditionen im Himalaya bekannt wurden. Es wurde postuliert, dass Sherpas und Quechuas genetische Spezialisierungen zum Leben in grosser Höhe aufweisen könnten [12, 13].

Im Laufe des letzten Jahres untersuchten wir elektronenmikroskopisch erneut die Muskelschnitte der Sherpas und studierten sie unter dem Gesichtspunkt des Lf. Die Morphometriemethoden waren dieselben, wie sie zuvor angewandt worden waren [23] und lieferten uns folgende Ergebnisse [9]: Die Lf-Dichte in der Sherpamuskelatur betrug 0,3 Promille der Faserfläche, während sie bei kaukasischen Bergsteigern vor der Expedition bei 0,2 Promille und nach der Expedition bei 0,7 Promille lag. Sie war also unsignifikant höher als bei den westlichen Bergsteigern vor der Höhenexposition und signifikant tiefer als in den Vergleichspräparaten der Expeditionsteilnehmer nach der Expedition! Damit stellte sich die Frage, ob die nativen Himalayabewohner möglicherweise mittels eines Schutzmechanismus weniger empfindlich auf die Sauer-

stoffradikale reagieren, die unter hypoxischen Bedingungen vermehrt produziert werden.

Gelfi et al. [9] untersuchten kürzlich das Muskelproteom dreier Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlichen Genomen und phänotypischen Charakteristika. Tibetaner schienen für diese Art von Studie sehr geeignet zu sein, weil sie mit rund 25000 Jahren wie sonst keine andere Volksgruppe auf eine sehr lange Expositionsgeschichte in grossen Höhen zurückblicken können.

Die erste Gruppe bestand aus tibetanischen Flüchtlingen, die wie schon ihre Vorfahren auf Höhen über 3500m lebten (Tib 1), und deren Proteinexpression 5–30 Tage nach Abstieg auf 1300m studiert wurde. In der zweiten Gruppe befanden sich native Tibetaner zweiter Generation, die permanent auf 1300m wohnhaft waren (Tib 2), während in der dritten Gruppe nepalesische Kontrollpersonen (Kon) zu finden waren, die ebenfalls in niedrigen Höhen wohnten, aber im Gegensatz zu den vorherigen Gruppen über keine evolutionsgeschichtliche Höhenexposition verfügen. In dieser Studie wurden sieben verschieden exprimierte Moleküle separiert und mittels Massenspektromie analysiert. Proteomische Versuche ergeben Informationen über die funktionelle Proteinexpression der spezifischen Gewebe unabhängig von den post-transkriptionalen Mechanismen, der Syntheserate oder der Halbwertszeit der betreffenden Moleküle. Die Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein Enzym, das den protektiven Effekt von reduziertem Glutathion katalysiert (Figur 1) und somit eine wichtige detoxifizierende und zytoprotektive Stellung einnimmt. Erstaunlicherweise war die GST in Tib 1 um 380% und in Tib 2 um 50% überexprimiert im Vergleich zu Kon. Dieses Ergebnis ist möglicherweise ein Grund, wieso in den Tibetanern die Sauerstoffradikale viel besser abgefangen werden können! Wir spekulieren, dass ohne die markante Aufregulierung dieses Enzyms die muskulären Vorräte an antioxidativem Glutathion wohl allzu schnell aufgebraucht wären und die Sauerstoffradikale auch hier grösseren Schaden anrichten würden.

Wie oben erwähnt, leiden COPD-Patienten oftmals unter erhöhter muskulärer Ermüdbarkeit, deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist, die aber mit dem bewegungsinduzierten oxidativen Stress in Zusammenhang stehen könnte: Couillard et al. [7] zeigten in einem Knieextensionstest, dass die Ausdauer der Quadrizepsmuskulatur in Patienten mit COPD signifikant reduziert ist im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen. Ausserdem wurden 48

Stunden nach der Übung bei COPD, nicht aber bei gesunden Probanden eine deutliche Erhöhung der Lipidperoxidation und oxidierten Proteine festgestellt. Die ebenfalls untersuchte antioxidative Peroxidaseglutathion-Aktivität konnte in gesunden Personen aufreguliert werden, nicht aber bei COPD. Diese Befunde decken sich mit den Untersuchungen von COPD-Patienten, in denen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöhte Lf-Werte gefunden wurden [1]. Heute gilt deshalb als gesichert, dass COPD mit einer Muskeldysfunktion und einem Muskelabbau einhergehen kann, der auf den erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen ist.

Schlussfolgerungen

Permanente Hypoxie schadet der Muskulatur. Selbst Kompensationsmechanismen wie zum Beispiel die Aufregulierung von HIF-1 α reichen offenbar nicht aus, um den muskulären Mitochondriengehalt zu erhalten. Die Zerstörung der Mitochondrien durch Sauerstoffradikale scheint die Ursache zu sein für eine vermehrte Lf-Akkumulation in der quergestreiften Muskulatur von westlichen Höhenbergsteigern während Expeditionen. Sherpas scheinen durch genetisch fixierte Schutzmechanismen von dieser Form von Katabolismus weitgehend verschont zu bleiben.

Verdankungen

Unser Dank gilt Ch. Lehmann und B. Krieger vom Anatomischen Institut Bern, die uns bei der Elektronenmikroskopie und der Fotografie tatkräftig zur Seite gestanden sind, sowie Prof. Dr. med. H. Howald für die Überarbeitung des Artikels.

Korrespondenzadresse:

Adrian Schneider, Schulhausstrasse 11, 8307 Ottikon
adimail@bluewin.ch

Literaturverzeichnis

- 1 Allaire J., Maltais F., LeBlanc P., Simard P.M., Whittom F., Doyon J.F., Simard C., Jobin J. (2003): Lipofuscin accumulation in the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Muscle Nerve* 25: 383–389.
- 2 Armstrong D., Koppang N. (1981): Ceroid-lipofuscinosis, a model for aging. In: *Age pigments*. Sohal, R.S., (ed.), Elsevier, Amsterdam, 355–382.
- 3 Ballmer P.E., Reinhart W.H., Gey K.F. (1994): Antioxidant vitamins and disease – risk of a suboptimal supply. *Therap. Umschau* 51: 467–474.
- 4 Brunk U.T., Terman A. (2002): Lipofuszin – mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biol. Med.* 33: 611–619.
- 5 Brunk U.T., Terman A. (2002): The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 269: 1996–2002.
- 6 Brunk U.T., Ericsson J.L.E. (1972): Electron microscopical studies on rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. *J. Ultrastruct. Res.* 38: 1–15.
- 7 Couillard A., Maltais F., Saey D., Debigare R., Michaud A., Koechlin C., LeBlanc P., Prefaut C. (2003): Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 1664–1669.
- 8 De Duve C., Wattiaux T. (1966): Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28: 435–492.
- 9 Gelfi C., De Palma S., Ripamonti M., Wait R., Eberini I., Bajracharya A., Marconi C., Schneider A., Hoppeler H., Cerretelli P. (2004): New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. *FASEB J.*, 18: 612–614.
- 10 Grune T., Shringarpure R., Sitte N., Davies K. (2001): Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56: 459–467.
- 11 Hannover A. (1842): Mikroskopische untersögelser af nevesystemet. *Kgl. Danbke Bidensk. Kabernes Selkobs Naturv. Math. Afh. Copenhagen* 10: 131–138.
- 12 Hochachka P.W. (1992): Muscle enzymatic composition and metabolic regulation in high altitude adapted natives. *Int. J. Sports Med.* 13: 89–91.
- 13 Hochachka P.W. (1998): Our ancestral physiological phenotype: an adaptation for hypoxia tolerance and for endurance performance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1915–1920.
- 14 Hoppeler H., Flück M. (2003): Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35: 95–104.
- 15 Hoppeler H., Howald H., Cerretelli P. (1990): Human muscle structure after exposure to extreme altitude. *Experientia* 46: 1185–1187.
- 16 Hoppeler H., Kleinert E., Schlegel C., Claassen H., Howald H., Kayar S.R., Cerretelli P. (1990): Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *Int. J. Sports Med.* 11 (Suppl. 1): 3–9.
- 17 Hoppeler H., Vogt M., Weibel E., Flück M. (2003): Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp. Physiol.* 88: 109–119.
- 18 Howald H., Hoppeler H. (2003): Performing at extreme altitude: muscle cellular and subcellular adaptations. *Eur. J. Appl. Physiol.* 90: 360–364.
- 19 Hueck W. (1912): Pigmentstudien. *Beitrag Path. Anat.* 54: 68–232.
- 20 Kayser B., Hoppeler H., Claassen H., Cerretelli P. (1991): Muscle structure and performance capacity of Himalayan Sherpas. *J. Appl. Physiol.* 79: 1938–1942.
- 21 Koneff H. (1886): Beiträge zur Kenntnis der Nervenzellen der peripheren Ganglien. *Mitt. Naturforsch. Gesell. Bern* 44: 13–14.
- 22 MacDougall J.D., Green H.J., Sutton J.R., Coates G., Cymerman A., Young P., Houston C.S. (1991): Operation Everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude. *Acta Physiol. Scand.* 142: 421–427.
- 23 Martinelli M., Winterhalder R., Cerretelli P., Howald H., Hoppeler H. (1990): Muscle lipofuscin content and satellite cell volume is increased after high altitude exposure in humans. *Experientia* 46: 672–676.
- 24 Oelz O., Howald H., Prampero P., Hoppeler H., Claassen H., Jenni R., Bühlmann A., Ferretti G., Brückner J.-C., Veicsteinas A., Gussioni M., Cerretelli P. (1986): Physiological profile of world-class high-altitude climbers. *J. Appl. Physiol.* 60: 1734–1742.
- 25 Porta E.A. (2002): Pigments in aging: An overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959: 57–65.
- 26 Porta E.A. (1991): Advances in age pigment research. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 303–320.
- 27 Reynafarie B. (1962): Myoglobin content and enzymatic activity of muscle and altitude adaptation. *J. Appl. Physiol.* 17: 301–305.
- 28 Tappel A.L. (1973): Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 32: 1870–1874.
- 29 Terman A., Brunk U.T. (1998): Lipofuscin – mechanisms of formation and increase with age. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 106: 265–276.
- 30 Valdivia E. (1958): Total capillary bed in striated muscle of guinea pigs native to the Peruvian mountains. *Am. J. Physiol. (lond.)* 194: 585–589.
- 31 Von Zglinicki T., Brunk U.T. (1993): Intracellular interactions under oxidative stress and aging: a hypothesis. *Z. Gerontol.* 26: 215–220.