

Aus dem Institut für Vegetative  
Anatomie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Reaktive Sprünge als Maßnahme gegen inaktivitätsbedingten  
Muskelabbau während Langzeitbettruhe

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Hans Weber  
aus Berlin

Datum der Promotion: 07.12.2018

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BDC	base data collection; Ausgangsdatenerhebung
BR	Bettruhe
C:F	Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis
CD	cluster of differentiation; Zelloberflächenmolekül
CFD	Kapillaren-Faser-Dichte
CTRL	Kontrollgruppe
DAF	Kapillardomänenanzahl
DLR	Deutsches Institut für Luft-und Raumfahrtmedizin
DMF	Dimethylformamid
ESA	European Space Agency; Europäische Weltraumorganisation
(F)CSA	(Fibre) cross-sectional area; Querschnittsoberfläche (der Muskelfaser)
HDT	Head-Down-Tilt; Kopftieflage
Jump	Trainingsgruppe
LCFR	Lokales Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis
M.O.M.	mouse on mouse
MyHC	Myosin Heavy Chain; schwere Kette des Myosins
PECAM	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
post	Zeitpunkt nach Bettruhe
pre	Zeitpunkt vor Bettruhe
rec	Zeitpunkt der Regeneration 10 Tage nach Ende der Bettruhe
RSL	<b>Reactive Jumps on a Sledge Jump System as a countermeasure during Longterm bed rest</b>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
SJS	Sledge-Jump-System; Schlitten-Sprung-System
SOL	musculus soleus
TBS	Tris-buffered saline
TNBT	Tetranitroblautetrazoliumsals
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Puffersubstanz
VL	musculus quadriceps femoris vastus lateralis
VO <sub>2</sub>	V – volume, O <sub>2</sub> – oxygen; Sauerstoffverbrauch

# Inhaltsverzeichnis

1. Abstract .....	4
2. Kurzzusammenfassung .....	5
3. Einleitung .....	6
3.1 Langzeit-Betruhestudien .....	7
3.2 Sprungtraining .....	8
3.3 Muskelschwund .....	8
4 Methoden .....	10
4.1 Allgemeiner Studienaufbau .....	10
4.2 Trainingsprogramm .....	11
4.3 Muskelbiopsie .....	13
4.4 Immunohistochemie .....	14
4.5 Enzymhistochemie .....	15
4.6 Auswertung der Schnittbilder .....	16
4.7 Statistische Auswertung .....	19
5 Ergebnisse .....	20
5.1 Muskelfaserquerschnittsoberfläche (CSA) .....	20
5.2 Muskelfaserkomposition .....	24
5.3 Kapillarisation .....	25
5.3.1 Kapillarendichte (CD) & Kapillaren-Faser-Dichte (CFD) .....	25
5.3.2 Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (C:F) .....	26
5.3.3 Kapillardomänenanzahl (DAF) .....	27
5.3.4 Lokales Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (LCFR) .....	27
5.3.5 Sauerstoffaustauschkapazität (LCFR/Perimeter) .....	28
5.4 Sauerstoffverbrauch .....	28
6 Diskussion .....	30
7 Literatur .....	35
8 Eidesstattliche Versicherung .....	38
Lebenslauf .....	39
Danksagung .....	40

## 1. Abstract

**Background** Extended skeletal muscle inactivity (disuse) in bed rest results in considerable loss in muscle histomorphology with functional impairments that can be alleviated by physical exercise as countermeasure.

**Objectives** To test the outcome of reactive jumps at supine position on human thigh and calf muscle histomorphology (myofibre size and type distribution) and other functional parameters (capillarity and oxygen consumption) in bed rest participants (60 days RSL study).

**Methods** The RSL study was organized by the European Space Agency (ESA) and hosted by the DLR at the :envihab human physiology facility, Cologne, Germany in 2015-2016. The study ran in two campaigns, one bed rest (BR) control (BR-CTRL) and one exercise (BR-Jump) group, each (n=12), finally resulting in total n=22 study participants subjected to muscle biopsies (VL, n=21; SOL, n=22). In both groups, muscle biopsies (approximated 150 mg wet weight) were taken from the thigh and calf muscle before (pre), at the end (post), and during 10 days of recovery (rec), frozen in liquid nitrogen and further analyzed according to routine histomorphometry (myofibre size and type distribution), histochemistry (SDH stain), and immunohistochemistry (anti-myosin heavy chain, MyHC I and II, PECAM) using conventional and confocal laser microscopy.

**Results:** 60 days of bed rest induced significant reductions in muscle cross sectional area (VL,  $p < 0,0001$ ; SOL,  $p < 0,0001$ ) and myofibre type transition with increased amount of hybrids (VL,  $p = 0,0131$ ; SOL,  $p < 0,0001$ ). Several parameters for capillarity, such as capillary-to-fibre ratio (VL,  $p = 0.0065$ ), and fibre-specific oxygen consumption of type II fibres, measured indirectly by SDH-activity, ( $p = 0.0432$ ) were reduced. Fibre size changes were attenuated, muscle-specific myofibre type distribution, capillarity and oxygen consumption rate were preserved in both VL and SOL by exercise in form of reactive jumps.

**Conclusion:** Reactive jumps are an appropriate countermeasure to prevent muscle loss following disuse during long-term bed rest.

## 2. Kurzzusammenfassung

**Hintergrund** Eine Entlastung der Skelettmuskulatur, zum Beispiel durch Bettruhe, führt zu einem ausgeprägten Verlust der Muskelhistomorphometrie und –funktionalität, der durch Muskelaufbautraining als Gegenmaßnahme verhindert oder abgeschwächt werden kann.

**Ziele** Ziel ist, den Einfluss von reaktiven Sprüngen in Rückenlage auf die Muskelhistomorphometrie und –funktionalität der Ober- und Unterschenkelmuskulatur von Probanden einer 60-tägigen Bettruhestudie zu quantifizieren.

**Methoden** Die RSL-Studie wurde von der European Space Agency (ESA) organisiert und vom DLR in der Forschungseinrichtung :envihab in Köln von 2015 bis 2016 veranstaltet. Sie wurde in zwei Kampagnen, mit jeweils 12 Teilnehmern in einer Kontrollgruppe (BR-CTRL) und einer Trainingsgruppe (BR-Jump) durchgeführt, aus denen letztlich 22 Probanden zu den Muskelbiopsaten (VL, n=21; SOL, n=22) beigetragen haben. Die Muskelbiopsate (jeweils etwa 150 mg Feuchtgewicht) wurden aus dem VL und SOL beider Muskeln vor (pre), am Ende (post) und zehn Tage nach (rec) Bettruhe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, zur weiteren Analyse histomorphometrisch (Muskelfasergröße und –typenverteilung), enzymhistochemisch (Succinat-Dehydrogenase-Aktivitätsfärbung) und immunohistochemisch (Antikörper gegen schwere Ketten des Myosins I & II, PECAM) aufgearbeitet sowie mittels konventioneller und konfokaler Lasermikroskopie ausgewertet.

**Ergebnisse** 60-tägige Bettruhe führt zu einer Verringerung der Querschnittsoberfläche der Muskelfasern (VL,  $p < 0,0001$ ; SOL,  $p < 0,0001$ ) und einer Muskelzelltypenverschiebung über einen Anstieg hybrider Zellen (VL,  $p=0,0131$ ; SOL,  $p < 0,0001$ ). Zusätzlich werden verschiedene Kapillarisierungsparameter, wie das Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis ( $p= 0.0065$ ), und der indirekt ermittelte oxidative Sauerstoffverbrauch der Typ II Fasern reduziert ( $p= 0.0432$ ). Dieser Rückgang der Muskelfasergröße, der Kapillarisierungsparameter, des Sauerstoffverbrauchs und die Muskelfasertypenverschiebung werden durch ein Training bestehend aus reaktiven Sprüngen im VL und SOL aufgehalten.

**Schlussfolgerung** Reaktive Sprünge sind eine geeignete Maßnahme, einer Muskelatrophie durch Langzeitbettruhe entgegen zu wirken.

### 3. Einleitung

Inaktivitätsbedingte Erkrankungen gewinnen durch eine fortschreitende Alterung der Gesellschaft und einen zunehmend bewegungsärmeren Lebensstil stetig an Bedeutung. So sind Adipositas, Osteoporose, Diabetes und die koronare Herzkrankheit Volkskrankheiten und zählen vor allem in der westlichen Welt zu den wahrscheinlichsten Todesursachen. Somit stellen uns die Folgen von Inaktivität vor eine enorme gesundheitliche sowie ökonomische Herausforderung, die es möglichst früh anzugehen erfordert. Dabei kommt vor allem dem muskuloskeletalen Apparat eine besondere Bedeutung zu. Vor allem ältere Menschen klagen bereits nach kurzen Phasen der Inaktivität über einen merklichen Kraftverlust durch Muskelschwund und ein sich daraus ergebendes deutliches Gefühl der Bewegungsunsicherheit. Hierin besteht nicht selten ein Teufelskreis, da Unsicherheit und gefühlte hohe Anstrengung zur Vermeidung körperlicher Aktivität führen und somit weiteren Muskelabbau fördern, was häufig im Verlust der gesellschaftlichen Teilhabe und der Selbstversorgungsfähigkeit mündet (1, 2). Doch neben der vorwiegend sitzend arbeitenden Bevölkerung und den Menschen fortgeschrittenen Alters stehen auch Menschen unter Extrembedingungen wie der Schwerelosigkeit außerhalb der Erdatmosphäre vor dem Problem des sukzessiven Muskelschwunds. Astronauten unterliegen mannigfaltigen physiologischen Veränderungen, die sich negativ auf ihre Leistungsfähigkeit und Muskelkraft ausüben (3). Aus diesem Grund müssen diese bereits mehr als zwei Stunden eines Tages dafür verwenden, mit verschiedenen Trainingsmethoden ihre Leistungsfähigkeit zu erhalten, was trotz dieses zeitaufwendigen Trainingsprotokolls nicht vollständig gelingt (4, 5). Daher beschäftigt sich die Weltraummedizin verstärkt mit der Problematik der schwerelosigkeitsbedingten physiologischen Veränderungen und inwieweit sich diese verhindern lassen, indem in wiederholten Simulationsmodellen, sogenannten Betruhestudien, die Auswirkungen der Schwerelosigkeit auf den Menschen untersucht wird (6).

Die vorliegende Dissertation aus der Arbeitsgemeinschaft Neuromuskuläres System des Zentrums für Weltraummedizin an der Charité analysiert Muskelbiopsien der groß angelegten RSL-Studie (**R**eactive Jumps on a **S**ledge Jump System as a countermeasure during **L**ongterm bed rest) aus den Jahren 2015 und 2016, einer Kooperation des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin (DLR) als Veranstalter der Studie sowie der European Space Agency (ESA) als Organisator, hinsichtlich der Muskelmorphologie und –funktionalität, sowie insbesondere den Einfluss der durchgeführten Trainingsmethode als Gegenmaßnahme zum Muskelabbau.

### 3.1 Langzeit-Bettruhestudien

In regelmäßigen Abständen organisiert die ESA Bettruhestudien in Kooperation mit dem DLR in Köln oder dem French Institute for Space Medicine and Physiology MEDES in Toulouse. Hierbei werden zusätzlich zu den physiologischen Auswirkungen auf die Muskulatur der Probanden mitunter auch die Effekte auf den Skelettstoffwechsel, das Herz-Kreislaufsystem, das Gleichgewichtssystem, die kognitive Leistungsfähigkeit, die Thermoregulation sowie das autonome Nervensystem untersucht. Hierfür werden Simulationsmodelle geschaffen, um die Begebenheiten in der Schwerelosigkeit auch auf der Erde annäherungsweise untersuchen zu können. Als beste Annäherung hat sich das Modell der Bettruhe in 6°-Kopftieflage (Head Down Tilt - HDT) etabliert. Die Idee für die Kopftieflage ist durch Langzeitastronauten selbst angestoßen worden, als sie sich nach Rückkehr zur Erde über das Gefühl beklagt haben, fußwärts aus dem Bett zu fallen. Die Kopftieflage hat diese Angst behoben und scheint daher den tatsächlichen Bedingungen in der Schwerelosigkeit eher zu entsprechen. Durch die Tieflage wird eine Flüssigkeitsverschiebung in die obere Körperhälfte und durch die Bettruhe ein kataboler Stoffwechsel auf das muskuloskeletale System bewirkt. Da Stoffwechselprozesse jedoch vielen Aspekten des täglichen Lebens unterliegen, wird streng auf interindividuell genormte Flüssigkeits- und Nährstoffaufnahme sowie einen konstanten Tag-Nacht-Rhythmus geachtet. Um saisonale Einflüsse auszuschließen, wird jede Studie in zwei separate Kampagnen unterteilt, die durch ein mehrmonatiges Intervall getrennt werden.

Zusätzlich zur Beobachtung der allgemeinen physiologischen Veränderungen wird dabei auch stets eine Trainingsmethode als mögliche Gegenmaßnahme durchgeführt und auf ihre Wirksamkeit sowie Effizienz, den Normalzustand zu erhalten, geprüft. Dazu befindet sich eine Hälfte der Probanden in einer Interventionsgruppe, um mittels eines gezielten Trainingsverfahrens die negativen physiologischen Auswirkungen, je nach Wirkungsgrad des Verfahrens, zu verhindern. Im Wechsel der Studien werden stets weitere Trainingsmethoden auf ihre Wirksamkeit untersucht, wobei sich die hier untersuchte RSL-Studie von 2015/16 mit Sprüngen auf einem Schlittensystem beschäftigt.

### **3.2 Sprungtraining**

Die Sprünge auf dem Schlittensystem stellen ein sehr intensives plyometrisches Training dar, mit der Möglichkeit zeiteffizient Muskulatur aufzubauen beziehungsweise zu erhalten (7, 8). Nicht minder werden jedoch Knochen gestärkt (9) und auch ein positiver Einfluss auf Bänder, Sehnen sowie ein vermindertes Verletzungsrisiko wird diskutiert (10). Plyometrisches Training basiert auf dem explosionsartigen Wechsel zwischen exzentrischen (Dehnung der Muskulatur) und konzentrischen (Verkürzung der Muskulatur) Bewegungsphasen. Durch möglichst schnelle Dehnung wird hierbei eine Vorspannung des Muskel-Sehnen-Band-Apparates geschaffen, mit deren Auflösung in Kombination mit simultaner konzentrischer Muskelkontraktion weitaus mehr Kraft freigesetzt werden kann als durch isolierte konzentrische Muskelarbeit (7).

### **3.3 Muskelschwund**

Die Muskulatur unterliegt permanenten Umbauprozessen, die je nach Beanspruchung entweder anabol oder katabol gerichtet sind, sich jedoch im Alltag nahezu ausgleichen (11). Durch ein verstärktes Muskeltraining kann ein anaboler Zustand erreicht werden, wodurch sich Muskelmasse, Muskelvolumen sowie die Muskelleistung sukzessiv erhöhen (12). Eine Verminderung der mechanischen Beanspruchung, sei es durch Inaktivität oder Wegfall der Schwerkraft, führt hingegen zu einem katabolen Status und somit zu konträren Muskelveränderungen (13-15). Um diesen Muskelabbau zu quantifizieren, werden verschiedene Verfahren angewandt, wobei die Untersuchung des Muskels durch ein Muskelbiopsat den wahrscheinlich wichtigsten Aspekt darstellt. Hierbei können unter anderem 1. Größenänderungen der Muskelzellen, 2. eine Umwandlung der Muskelfasertypen, 3. ein Umbau der kapillären Versorgung sowie 4. intrazelluläre Proteinveränderungen beobachtet und bewertet werden. Diese Anpassungen werden über molekulare Signalprozesse auf zellulärer Ebene vermittelt und stellen eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung der Adaptation der Muskulatur dar (16).

Zu 1. Da die Anzahl der Muskelfaserzellen mit der Geburt feststeht, wird ein Muskelwachstum nicht durch eine Vermehrung der Muskelzellzahl (Hyperplasie), sondern durch Hypertrophie gewährleistet. Myogene Stammzellen, sogenannte Satellitenzellen, die zwischen der Basalmembran und dem Sarkolemm der Muskelfasern liegen, können sich bei Bedarf teilen und somit ihre Kerne mit den bestehenden umliegenden Muskelfasern verschmelzen (15, 17). So wird eine annähernd konstante Kern-Plasma-Relation und folglich eine hinreichende Versorgung mit m-RNA zur Proteinbiosynthese gewährleistet, wodurch der Muskel beziehungsweise die Muskelfasern wachsen, ohne jedoch ihre Anzahl zu ändern.

Zu 2. Neben den verschiedenen Muskeltypen der quergestreiften, glatten und Herz-Muskulatur, findet sich auch noch eine Unterteilung nach Muskelfasertypen. Da die quergestreifte Skelettmuskulatur je nach Lage am Körper teils sehr unterschiedliche Funktionen zu erfüllen hat, ist die Existenz verschiedener Muskelfasertypen sinnvoll. Prinzipiell wird in den roten Muskelfasertyp I und den weißen Typ II unterschieden, die wiederum in weitere Subtypen eingeteilt werden können. Der Typ I kann im Vergleich nur wenig Maximalkraft aufbringen, hält dafür aber lange Zeit ohne Ermüdungserscheinungen seine Funktion aufrecht. Daher findet sich dieser Muskelfasertyp vorwiegend in Muskeln mit Haltefunktion, wie dem Rückenstrecker oder der Wadenmuskulatur (z.B. musculus soleus). Gewährleistet wird seine Ausdauer vorwiegend durch hohe Myoglobinkonzentrationen zur besseren Sauerstoffversorgung und hohen Mitochondriengehalt zur effizienteren aeroben Energiegewinnung. Die rote Farbe des Myoglobins verleiht dem roten Muskelfasertyp I seinen Namen. Der weiße Muskelfasertyp II hingegen verfügt über eine hohe Maximalkraft bei geringer Ausdauer und findet sich bevorzugt in Muskeln mit zielmotorischer Funktion wie der Oberarm- oder Oberschenkelmuskulatur (z.B. musculus quadriceps femoris vastus lateralis). Er enthält dafür weit mehr Myofibrillen zur Kontraktion, wobei ihm jedoch die große Anzahl an Mitochondrien und Myoglobin fehlt. Daher arbeitet dieser Muskeltyp eher ineffizienter anaerob durch Glykolyse, ermüdet somit schneller und erhält nicht die tiefe Färbung.

Diese Muskelfasertypen können nun je nach Beanspruchung ineinander übergehen, wobei bei Immobilisation eine Verschiebung von der sonst dauerhaft stimulierten Typ I-Faser über den Zwischenschritt der Hybridfasern in einen Typ II erwartet wird (14, 18).

Zu 3. Zur effizienten Energiegewinnung benötigt die Muskulatur ausreichend Sauerstoff, um im Zitratzyklus in den Mitochondrien genügend Adenosintriphosphat (ATP) für die Kontraktion der Muskeln bereitzustellen. Daher sollte ein trainierter Muskel sehr gut durchblutet und somit durch massenhaft Kapillaren versorgt sein (19, 20). Die Angiogenese wird durch Hypoxie, Dehnung und Scherkräfte stimuliert, die allgemein während des Muskeltrainings auftreten (21). Die Kapillarisation könnte folglich Rückschlüsse auf den Trainingszustand des Muskels ermöglichen (22, 23).

Zu 4. Intrazelluläre Proteine sind in ihrer enzymatischen Funktion maßgeblich an der Muskelarbeit beteiligt. Veränderte Anforderungen an die Muskulatur sollten daher eine Adaptation der Enzymkonzentrationen zur Folge haben (11, 24, 25). Der Enzymkomplex Succinat-Dehydrogenase (SDH) katalysiert in der Mitochondrienmembran die Oxidation von Succinat zu Fumarat unter gleichzeitiger Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol und ist damit essenzieller Bestandteil des Zitratzyklus, der den einzigen Weg zur oxidativen Energiegewinnung der Zelle darstellt. Van der Laarse et al. (26) haben bereits eine Proportionalität zwischen der SDH-Aktivität und dem maximalen zellulären Sauerstoffverbrauch nachgewiesen. Es wird daher angenommen, dass ein gesteigerter Energiebedarf der Muskelfaserzellen durch Training beziehungsweise ein verringerter Bedarf durch Nichtbenutzung in hohem Maße die Kapazität der Succinat-Dehydrogenase beeinflussen wird (27).

## **4 Methoden**

### **4.1 Allgemeiner Studienaufbau**

Da die Studie eine Untersuchung von Stoffwechselprozessen beinhaltet, mussten im Probandenauswahlverfahren strenge Kriterien vorherrschen. Auch der hohe zeitliche Aufwand sowie die sowohl physisch als auch psychisch fordernde 60-tägige Bettruhe würden ohne präzise Auswahl der Probanden zu Abbrüchen seitens der Teilnehmer führen. Als Ausschlusskriterien in der Probandenakquirierung galten unter anderem eingeschränkte Essgewohnheiten (z.B. Vegetarismus), Leistungssport sowie jegliche Stoffwechselerkrankung, um mögliche Fehlereinflüsse zu vermeiden. Vor Studienbeginn wurde das Studiendesign von der Ärztekammer Nordrhein in Düsseldorf und dem Bundesamt für Strahlenschutz genehmigt, sowie von jedem Probanden das schriftliche Einverständnis eingeholt.

Nach mehreren Voruntersuchungen wurden den Kriterien entsprechend 24 gesunde Probanden im Durchschnittsalter von  $29\pm 6$  Jahren, einer Körpergröße von  $181\pm 6$  cm und einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $77\pm 7$  kg in zwei Kampagnen eingeschlossen. Jede der Kampagnen bestand aus einer 15-tägigen Eingewöhnungsphase zur Basisdatenerfassung (baseline data collection, BDC-Phase), der 60-tägigen Betruhephase in Kopftieflage (HDT-Phase) und einer sich anschließenden 15-tägigen Erholungsphase (Rec-Phase, Recovery), so dass jeder Proband stationär für 90 Untersuchungstage in Einzelzimmern der humanphysiologischen Forschungsanlage :envihab in Köln untergebracht wurde. Zur Messung des Effektes der Gegenmaßnahme befand sich eine Hälfte jeder Kampagne in einer Interventionsgruppe (Jump) mit regelmäßigen Trainingseinheiten und die andere Hälfte in einer Kontrollgruppe (CTRL) ohne sportliche Betätigung. Die Zuteilung zu einer dieser Gruppen erfolgte randomisiert durch Münzwurf nach Durchlaufen der BDC-Phase, in der jeder Proband das Trainingsprogramm durchlief und die korrekte Ausführung kennenlernte. Nach einem Probandenausfall aus gesundheitlichen Gründen, der nicht in Bezug zur Studie stand, schlossen 23 Probanden, davon 12 in der Interventionsgruppe, die Untersuchung erfolgreich ab.

Die während des Aufenthalts in der Forschungseinrichtung von uns durchgeführten Analysen an den Gewebeproben der Skelettmuskulatur sind Teil einer groß angelegten Untersuchung unter Beteiligung von bis zu zwölf weiteren interdisziplinären Arbeitsgruppen internationaler Wissenschaftlerteams, die aufgrund fehlender Relevanz für diese Arbeit nicht namentlich genannt werden.

## **4.2 Trainingsprogramm**

Das angewandte Training bestand aus Sprüngen auf einem Schlittensystem (SJS-Sledge Jump System) der Firma Novotec Medical GmbH (Pforzheim, Deutschland). In Auftrag gegeben wurde die Entwicklung von der ESA mit dem Ziel, eine wirksame Gegenmaßnahme gegen die negativen Folgen der Schwerelosigkeit zu entwickeln. Das Schlittensystem soll dabei normale Sprünge in aufrechter Haltung auf der Erde möglichst genau nachstellen. Das Gerät besteht aus einem Rahmen

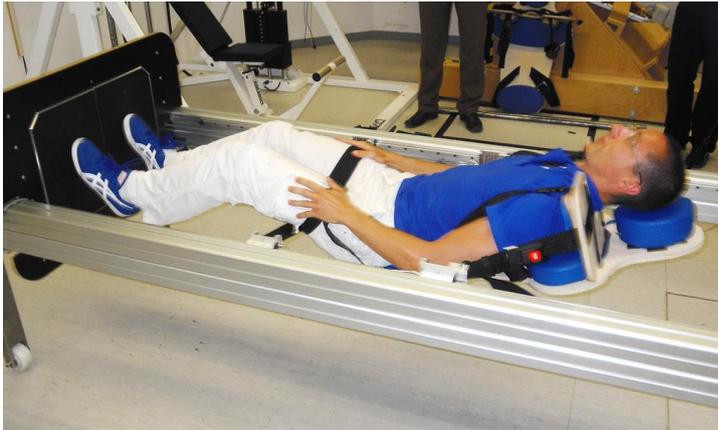


Abbildung 1 - Schlittenleitsystem zur Absolvierung reaktiver Sprünge

Quelle: Probandenaufklärung der RSL-Studie des DLR

mit inwärts gerichteten Schienen an denen ein Schlitten eindimensional senkrecht zur Bodenplatte entlanggleiten kann. Liegt der Durchführende auf dem Schlitten, wird er mit Bändern an dem Schlitten und dieser wiederum mit Bändern an den Schienen befestigt, was durch eine gewisse Restbeweglichkeit eine natürliche Sprungausführung gewährleistet. Über Schulterplatten und

die Bandbefestigung wird nun je nach Trainingseinheit die gewünschte Belastung auf den Körper ausgeübt. Um die regelrechte Ausführung sicherzustellen, wurden in der BDC-Phase alle Probanden mit der Trainingsmethode familiarisiert. Dafür wurden unter Anleitung in einem Zeitraum von 14 Tagen insgesamt 12 Trainingseinheiten zu je 10 Minuten, bestehend aus 3x20 Sprüngen absolviert.

Nach Beendigung der BDC-Phase wurde die Hälfte der Probanden in die Interventionsgruppe eingeteilt und hatte von nun an in den ersten zwei Wochen fünfmalig, später sechsmalig pro Woche alternierend zwei verschiedene Trainingseinheiten zu durchlaufen.

Typ 1 – Trainingseinheit	Typ 2 – Trainingseinheit
Aufwärmprogramm: 3 langsame Sprünge 20 Submaximalsprünge bei 0,7 g 15 Submaximalsprünge bei 1 g	Aufwärmprogramm: 3 langsame Sprünge 20 Submaximalsprünge bei 0,7 g 15 Submaximalsprünge bei 1 g
15 Maximalsprünge bei 1 g	15 Maximalsprünge bei 1 g
15 Maximalsprünge bei 1 g	15 Maximalsprünge bei 1,2 g
15 Maximalsprünge bei 1 g, aber jeder 3. Sprung einbeinig	15 Maximalsprünge bei 1,2 g

Tabelle 1 - Aufbau der alternierenden Trainingseinheiten

### 4.3 Muskelbiopsie

In der RSL-Studie wurden den Teilnehmern beider Gruppen an drei unterschiedlichen Terminen jeweils von einem Oberschenkel- (musculus quadriceps femoris vastus lateralis, VL) und einem Unterschenkelmuskel (musculus soleus, SOL) Biopsate entnommen. Entnahmezeitpunkte waren der 10. Tag der BDC-Phase zur Aufzeichnung des Ausgangszustands 5 Tage vor Beginn der Bettruhephase, der 59. Tag der HDT-Phase und der 10. Tag der Rec-Phase, so dass nun sowohl für die Kontrollgruppe als auch die Interventionsgruppe zum Zeitpunkt vor Bettruhe (pre), nach Bettruhe (post) und in der Erholungsphase (rec) jeweils Ober- und Unterschenkelbiopsate vorliegen.



Abbildung 2 - Chronik des Studienaufbaus

Die Biopsien wurden stets von zwei ärztlichen Fachkollegen des DLR Köln unter sterilen Bedingungen nach Hautinzision und Faszieneröffnung mit einem Rongeur durchgeführt. Die so gewonnenen Biopsate wurden über ein kryogenes Verfahren mit flüssigem Stickstoff Zellstruktur erhaltend schockgefroren, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zum weiterverarbeitenden Labor der Charité, AG Neuromuskuläres System der Vegetativen Anatomie, transportiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4 Immunohistochemie

Die insgesamt 138 entnommenen Biopsate wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einem Kryotom (CM 1860, LEICA Microsystems) in möglichst transverser Schnittführung von  $8\mu\text{m}$  Dicke auf Objektträgern (SuperFrost® Plus, 631-0108, VWR International) aufgebracht und wiederum bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Färbung wurden die Schnitte langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und je nach Untersuchungsschwerpunkt unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Aufgrund fehlender Muskelzellen im Biopsat eines Probanden, wurde dieser in der folgenden Untersuchung des Oberschenkelmuskels nicht berücksichtigt.

Begonnen wurde stets mit einer 10-minütigen Fixierung in phosphatgepufferter, 4%iger Formaldehydlösung und anschließendem viermaligen Spülen in Abständen von fünf Minuten mit einfacher TBS-Pufferlösung (aus 10facher TBS-Stammlösung, pH 7,4, Bestandteile: TRIS, NaCl, Reinstwasser). Hiernach wurden die Kryostatschnitte stets eine Stunde mit einem Blockpuffer, bestehend aus 0,3% Triton-X (Octoxinol 9), 2% Normalserum der Spezies Ziege (S-1000, Vector) und TBS, bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifische Bindungen durch unsere sekundären Antikörper der Spezies Ziege zu vermeiden, war die Verwendung des Normalserums hierbei obligat. Danach folgten die Inkubationen mit den jeweiligen primären Antikörpern, die folgend beschrieben werden.

In einer Dreifachfärbung sollte (1.) die Querschnittsoberfläche der Muskelzellen gemessen und (2.) der Muskelfasertyp bestimmt werden. Hierfür verwendeten wir monoklonale IgG-Antikörper gegen die schwere Kette des Myosins der Firma Sigma; M8421 (zur Bindung an MyHC-I) und M4276 (Bindung an MyHC-IIa, -IIb und -IIx). Zusätzlich wurde ein polyklonaler Dystrophin-Antikörper (SC-15376, Santa Cruz Inc.) als sarkolemmaler Immunmarker verwendet, um die Muskelzellen deutlich voneinander abzugrenzen. In Abbildung 7 sind die beschriebenen Färbungen einzeln und übereinandergelegt exemplarisch dargestellt.

Für die Muskelproben des VL wurde ein weiterer Durchlauf vorgenommen, der sich derselben Antikörper gegen die schweren Ketten des Myosins bediente. Anstelle des Dystrophin-Antikörpers wurde jedoch mit einem monoklonalen CD31-Antikörper (Dako M0823) gearbeitet. Dieser bindet an ein Glykoprotein des Endothels (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) und stellt somit (3.) die Gefäßarchitektur des Gewebes dar (siehe Abbildung 11).

In jedem Durchlauf wurden dieselben fluoreszierenden sekundären Antikörper Alexa-488 (A11029), Alexa-555 (A21424) und Alexa-635 (A31575; A31577) zur Markierung der primären Antikörperbindung verwendet. Nach Inkubation mit einem sekundären Antikörper und vor Verwendung des nächsten primären monoklonalen Antikörpers wurden dabei stets spezifische Bindungsstellen 70 Minuten mit 15% M.O.M.-Reagenz (mouse on mouse, Vector MKB-2213) geblockt. Zwischen jeder Inkubation wurden die Schnitte viermal für fünf Minuten mit TBS-Puffer gespült. Zum Schutz vor lichtbedingtem Ausbleichen wurden die Schnitte mit einem Kunstharz (Vectashield, Vector VEC-H-1500) eingedeckt und in einem Kühlschrank bei +4°C gelagert.

#### **4.5 Enzymhistochemie**

(4.) Bei der Succinat-Dehydrogenase-Aktivitätsfärbung handelt es sich um eine Routinedarstellung der Aktivität des Enzyms der Atmungskette. Hierbei wird das Substrat Succinat durch die Succinat-Dehydrogenase im Gewebe enzymhistochemisch umgesetzt, wodurch Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Tetranitroblautetrazoliumsalz (TNBT) übertragen werden, der dabei einen blaugrauen unlöslichen Niederschlag bildet. Je höher die Aktivität der SDH in den Mitochondrien einer Muskelfaser, desto mehr graublauer Niederschlag setzt sich ab und desto dunkler erscheint die Zelle (siehe Abbildung 12). Hierfür wurden aus Gründen der Auswertbarkeit Gefrierschnitte des VL gewählt, die an die immunhistochemisch markierten PECAM-Schnitte (3.) direkt angrenzen (siehe Abbildung 5). Diese wurden unfixiert für 45 Minuten lichtarm bei 37°C in einem Inkubationsmedium bestehend aus 1 mg/ml Tetranitroblautetrazoliumsalz (TNBT – Fa. abcam ab146263) in 100 µl/mg DMF (Dimethylformamid), 15 mg/ml Natrium-Succinat (Bernsteinsäure Dinatriumsalz Hexahydrat, Fa. Roth 3195.1) und 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,6 inkubiert. Hiernach wurde die Inkubationslösung bei Raumtemperatur mit Leitungswasser abgespült und nach mehrmaliger Spülung in destilliertem Wasser mit Aquatex (Fa Merck 1.08562) eingedeckt.

## 4.6 Auswertung der Schnittbilder

Mittels eines 3-Kanal-Scans wurden unter Zuhilfenahme eines Helium-Neon-Lasers für die Wellenlängen 543 nm und 633 nm sowie eines Argon-Lasers der Wellenlänge 453 nm über ein konfokales Lasermikroskop (TCS SP-2, LEICA) die zuvor fluoreszenzmarkierten Muskelbiopsate angeregt, zur Bildanalyse digitalisiert und unter Verwendung der aktuellsten Version der hauseigenen Software (LEICA Confocal Software 2.7) quantifiziert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Objektiv 20facher Vergrößerung im Format 1024x1024. Hiermit wurden 1. die Querschnittsoberfläche der einzelnen Muskelfasern und 2. die prozentuale Verteilung der Muskelfasertypen erhoben.

Zusätzlich wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (ZEISS Axioplan) unter Verwendung der Software MetaVue (Vers. 7.6.0.0.) digitale Schnittbilder mit den verschiedenen Sperrfiltersets 38 (BP 470/40, FT495), 43 (BP 545/25, FT 570) und 50 (BP 640/30, FT 660) zur Erfassung der Emission der sekundären Antikörper (488 nm, 555 nm, 635 nm) erstellt und für die Kapillarisationsanalyse 3. übereinandergelegt.

### 1. Querschnittsoberfläche der Muskelfasern

Für jede Muskelprobe wurde eine Serie aus Mikrophotographien, bestehend aus mindestens drei bis maximal vier unterschiedlichen Gesichtsfeldern unter 20facher Vergrößerung, erstellt und, durch manuelle Umrandung des Dystrophin-immunopositiven Sarkolemmes von einem geblindeten Durchführer, die Querschnittsoberfläche der Muskelfasern gemessen. Insgesamt wurden so 13.013 Muskelfasern des SOL und 15.013 des VL analysiert. Die Anzahl der gemessenen Muskelfasern pro Muskelbiopsat reichte dabei von einem Minimum von 49 bis 445 bei einem Mittelwert von 197 im SOL und 73 bis 427 bei einem Mittelwert von 242 im VL. Die manuelle Messung wurde von zwei unterschiedlichen Durchführern ausgeführt, wobei jeder eine komplette Muskelreihe (SOL oder VL) bearbeitete.

## 2. Muskelfasertypen

Durch denselben geblindeten Durchführer wurde an derselben Mikrophotographieserie durch Zählung der immunopositiven MyHC-I, MyHC-II oder beidseits positiver Hybridzellen das Vorkommen jedes einzelnen Muskelfasertyps sowie, in Kombination mit der Querschnittsoberfläche zuvor, die jeweilige Größenänderung jedes einzelnen Muskelfasertyps ermittelt.

## 3. Kapillarisation

In den PECAM-gefärbten Schnittbildern wurde im Programm BTablet (BaLoH Software, <http://www.baloh.nl>) jede PECAM-positive Kapillare manuell markiert sowie jede MyHC-I- und jede MyHC-II-positive Muskelfaser umrandet.

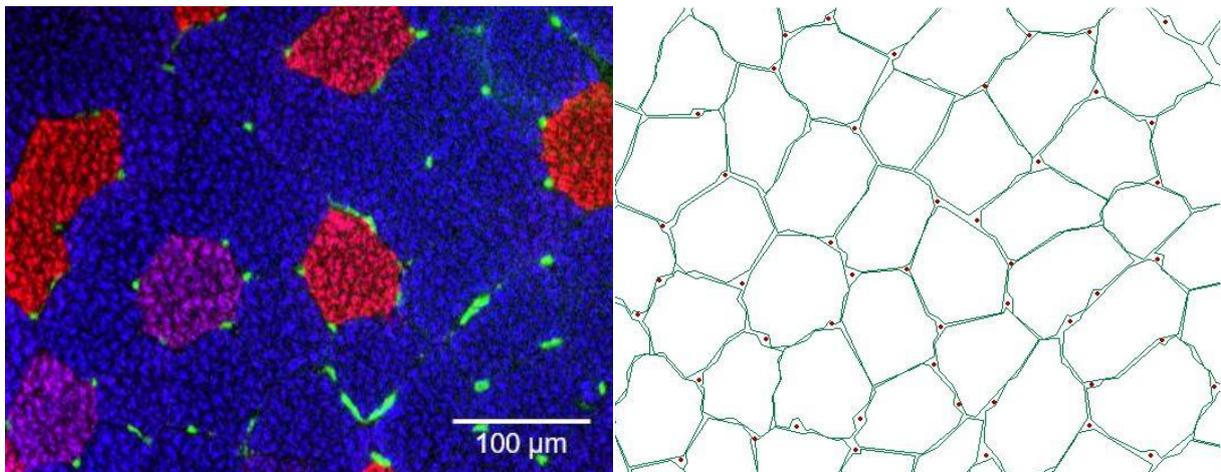


Abbildung 3 - links: Muskelquerschnitt in MyHC-I- (rot), MyHC-II- (blau) und PECAM- (grün) Färbung; rechts: manuelle Markierung der Kapillaren und Umrandung der Muskelzellen desselben Muskelquerschnitts

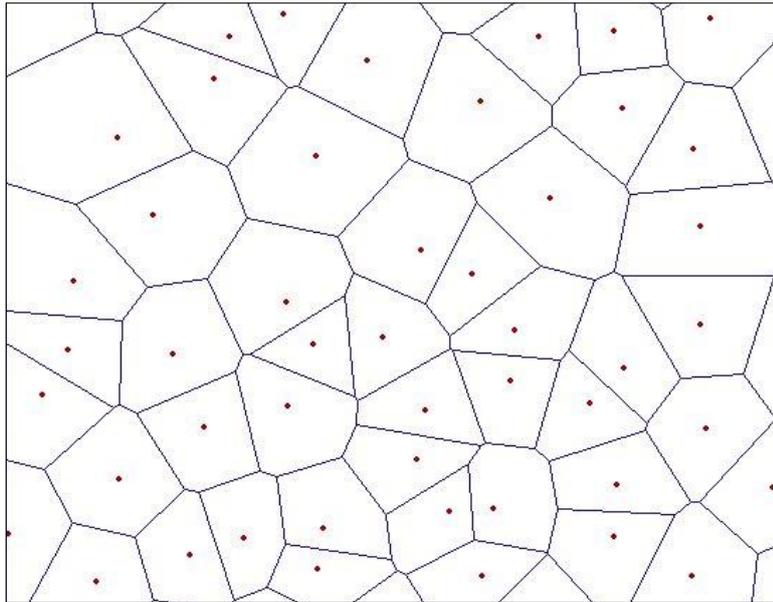


Abbildung 4 – Kapillardomänen; Kapillaren (rote Punkte), Domänen (blaue Vielecke)

In einem weiteren Programm mit Namen AnaTis (BaLoH Software, <http://www.baloh.nl>) wurden die so erhaltenen Daten in einen morphometrischen Bezug gebracht und automatisch ausgewertet. Neben den weitläufig erhobenen Werten wie der Kapillarisdichte (CD), der Anzahl der Kapillaren pro Quadratmillimeter des untersuchten Gewebes, und dem Verhältnis von Kapillaren- zu Muskelfaseranzahl (C:F) liegen durch Nutzung des

Kapillardomänenmodells weitere Werte vor. Eine Kapillardomäne stellt den Bereich um eine Kapillare dar, der von dieser Kapillare versorgt wird. Die Größe der Domäne wird durch die Nähe zu umliegenden Kapillaren bestimmt, da zwischen benachbarten Kapillaren in gleichem Abstand die Domänentrennlinie gezogen wird. So konnten zusätzliche Werte erhoben werden wie die Anzahl der Kapillaren, die eine Muskelfaser versorgen (DAF), das lokale Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (LCFR) einer bestimmten Muskelfaser als Summe aller Domänenanteile, die diese Muskelfaser überschneiden, und die Kapillaren-Faser-Dichte (CFD), berechnet als Kapillarenanzahl durch FCSA (Anzahl/mm<sup>2</sup>). Mit Hilfe des LCFR-zu-Umfang-Verhältnisses konnte außerdem ein Wert für die Sauerstoffaustauschkapazität für eine Muskelfaser gefunden werden. Diese zusätzlichen Werte berücksichtigen die unterschiedlichen Zelltypen des Gewebes und geben somit zusätzliche Information, die durch die weit geläufigeren Werte CD und C:F allein nicht erkannt werden können (28).

#### 4. Succinatdehydrogenase

Für die SDH-Aktivitätsanalyse wurden weitere Mikrophotografien angefertigt und mittels Messung der Absorbierungsrate eines Interferenzfilters von 660nm die optische Dichte des NBT-Präzipitats bestimmt. Zur Vermeidung möglicher Bias, wie wechselnde Beleuchtungsintensität, wurde für jede Mikrophotografie eine Kalibrierungskurve mit einer Filterserie bekannter optischer Dichte erstellt. So wurde für jede Muskelfaser, die zuvor in der PECAM-Analyse gemessen wurde, zusätzlich die SDH-Aktivität (OD660nm) bestimmt. Hieraus wurde abhängig von der Schichtdicke des Kryostatschnittes und der Inkubationszeit während der Färbung der masseabhängige maximale Sauerstoffverbrauch des Muskelgewebes erhoben ( $VO_2\text{max}$ ). Ausgehend von diesem Wert lässt sich durch Multiplikation mit der FCSA der maximale Sauerstoffverbrauch einer bestimmten Muskelfaser bestimmen ( $VO_2\text{fibre}$ ).

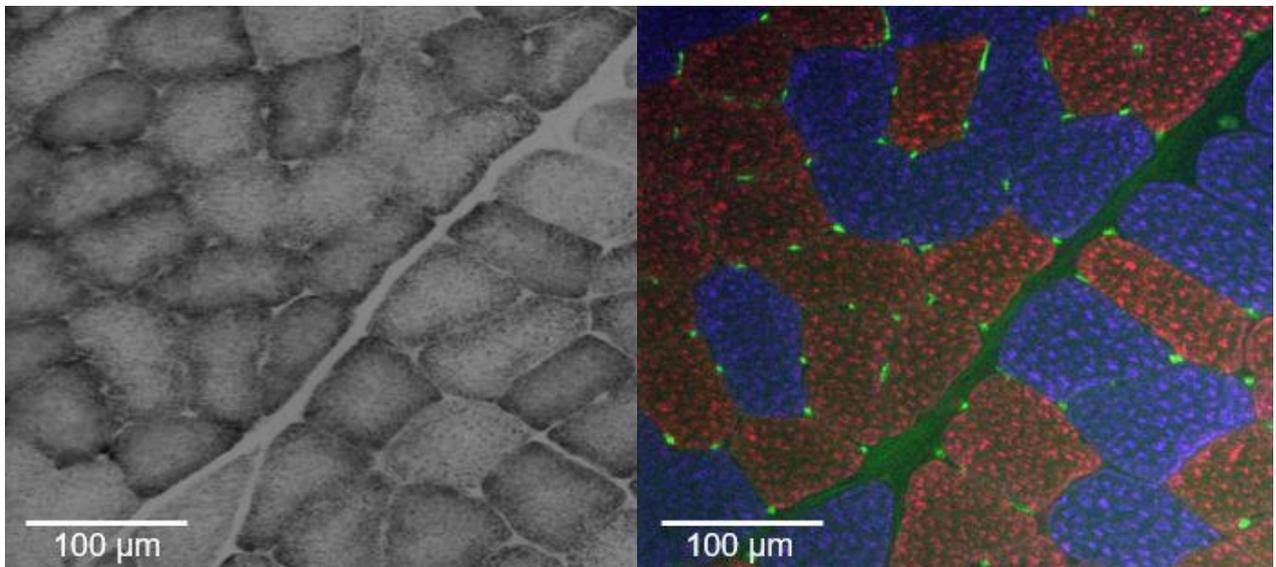


Abbildung 5 – Links: Kryostatschnitt eines Muskelbiopsats in SDH-Färbung; Rechts: Identischer Gewebeausschnitt des angrenzenden Kryostatschnitts in immunhistochemischer Färbung mit PECAM-Antikörper

#### 4.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten in IBM® SPSS Statistics 23. Zusätzlich wurden mit Graphpad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California) Grafiken für die bessere visuelle Darstellung der Ergebnisse erstellt. Zur Erhebung des Trainingserfolgs wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit *Zeitpunkt* (pre, post, rec) als Innersubjektfaktor und *Muskel* (VL, SOL) sowie *Intervention* (CTRL, Jump) als Intersubjektfaktoren für die Daten CSA und Muskelfaserkomposition durchgeführt. Für die CSA-Analyse wurden Mittelwerte für jeden

Probanden erhoben, während die Muskelfaserkomposition als prozentuale Verteilung der einzelnen Muskelfasertypen analysiert wurde. Da Daten zur Kapillarisation (CD, CFD, C:F, DAF, LCFR, LCFR/Perimeter) und zum zellulären Sauerstoffverbrauch (SDH, VO<sub>2</sub>max, VO<sub>2</sub>fibre) nur für den musculus vastus lateralis erhoben wurden, wurden weitere Varianzanalysen mit Messwiederholungen mit *Zeitpunkt* (pre, post, rec) und, wenn möglich, *Muskelfasertyp* (Typ I, Typ II, Typ I+II) als Innersubjektfaktoren und *Intervention* (CTRL, Jump) als einzigem Intersubjektfaktor durchgeführt. Für den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Zeitpunkten wurden die Daten mittels multipler Post-hoc-*t*-Tests analysiert. Um Verzerrungen durch Niveauunterschiede der Ausgangswerte zwischen den Gruppen zu vermeiden, wurde eine Baseline-Korrektur durchgeführt, indem die Daten durch den Ausgangswert dividiert wurden. Ergebnisse erscheinen folgend als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq .05$  gewählt. (Grafikdarstellung des *p*-Werts: \*  $\leq 0,05$  ; \*\*  $\leq 0,01$  ; \*\*\*  $\leq 0,001$  ; \*\*\*\*  $\leq 0,0001$ )

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Muskelfaserquerschnittsoberfläche (CSA)

Der SOL weist deutlich größere Muskelfaserquerschnitte ( $5829 \mu\text{m}^2 \pm 2059 \mu\text{m}^2$ ) als der VL ( $4757 \mu\text{m}^2 \pm 1974 \mu\text{m}^2$ ) auf ( $p < 0.0001$ ). Dieser Größenunterschied zeigt sich für jeden Muskelfasertypen. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Muskelfasertypen auch zueinander in ihrer Größe signifikant ( $p < 0.0001$ ).

In der Varianzanalyse zeigt sich ein signifikanter Effekt des Faktors *Zeitpunkt* auf den SOL- ( $p = 0.001$ ), nicht jedoch den VL-Muskel. Auch findet sich eine Interaktion mit der *Intervention* ( $p = 0.010$ ).

In den darauffolgenden Mehrfachvergleichstests der gepoolten Daten verringert sich in der Kontrollgruppe ohne Trainingsintervention durchweg der Querschnittsdurchmesser der Muskelfasern zwischen der pre- und post-Probe in beiden Muskeln sowie separat für jeden Muskelfasertypen. Im SOL findet sich zudem für beide Muskelfasertypen eine signifikante Zunahme der CSA von post zu rec ( $p < 0.0001$ ), während die CSA in den Typ II Fasern des VL entweder nicht zunimmt oder für die Typ I Fasern sogar signifikant abnimmt ( $p = 0.0045$ ). Trotz der teilweise erhöhten Querschnittsdurchmesser in den rec-Proben, zeigt sich der

Querschnittsdurchmesser stets signifikant niedriger als die CSA zum pre-Zustand. In der Trainingsgruppe dagegen erscheinen, bis auf einen Abfall der CSA vom pre- zum post-Zustand ( $p < 0.0001$ ) und einer nachfolgenden Zunahme der Typ I Fasern in der rec-Probe ( $p = 0.0008$ ), keine Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten.

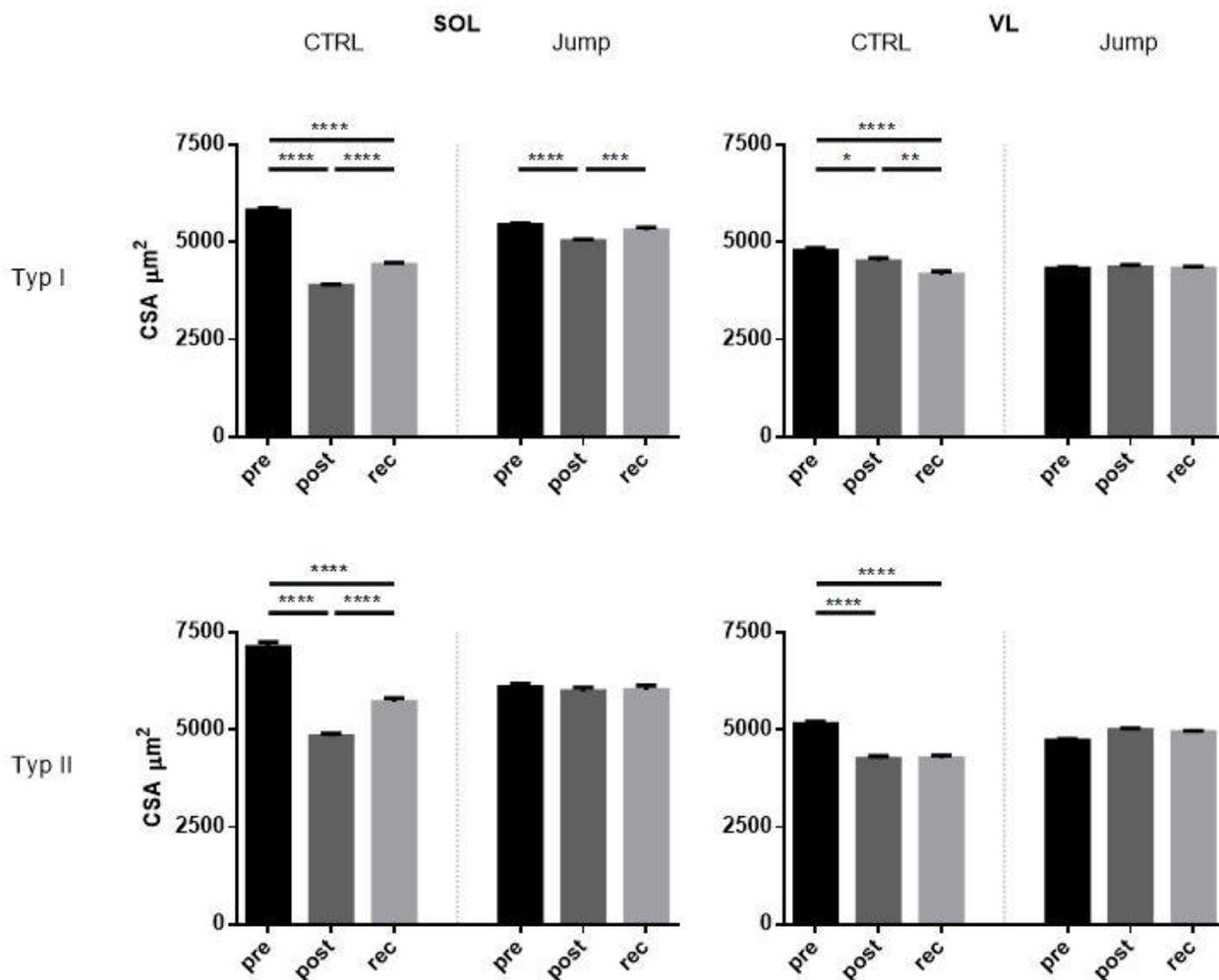


Abbildung 6 - gepoolte Datensätze zur Zellquerschnittsoberfläche beider Muskeln (links: SOL; rechts: VL) und beider Zelltypen (oben: Typ I; unten: Typ II), sowohl für die Kontroll- (CTRL) als auch die Trainingsgruppe (Jump)

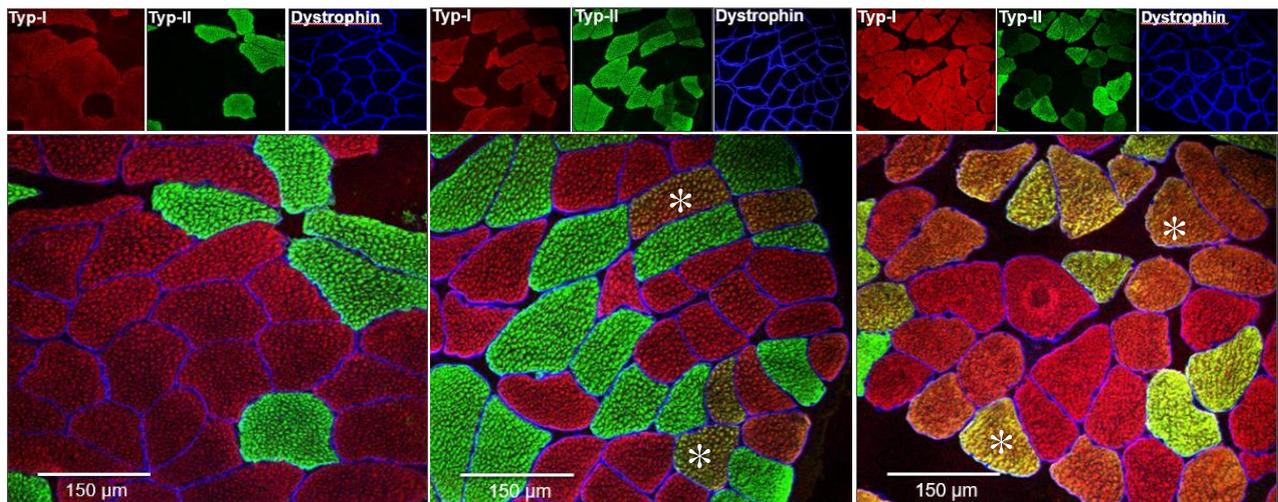


Abbildung 7 – Repräsentative Muskelquerschnitte des SOL der Kontrollgruppe desselben Probanden (von links nach rechts: pre-post-rec); Typ-I Muskelfasern (rot), Typ-II Muskelfasern (grün), Dystrophin (blau), hybride Muskelfasern in Farbzwischenstufen (rot – grün; exemplarisch durch \* markiert)

	SOL				VL			
	CSA gesamt	CSA Typ I	CSA Typ II	CSA Hybrid	CSA gesamt	CSA Typ I	CSA Typ II	CSA Hybrid
CTRL pre	6121 ± 54	5820 ± 56	7120 ± 130	5448 ± 358	5013 ± 52	4782 ± 68	5141 ± 71	4462 ± 235
CTRL post	4102 ± 30	3890 ± 33	4825 ± 78	3829 ± 75	4385 ± 49	4512 ± 82	4253 ± 68	4632 ± 132
CTRL rec	4920 ± 50	4422 ± 57	5714 ± 105	5310 ± 133	4212 ± 52	4165 ± 87	4127 ± 72	4046 ± 123
Jump pre	5632 ± 41	5445 ± 44	6090 ± 93	6285 ± 365	4594 ± 32	4325 ± 49	4716 ± 41	4355 ± 144
Jump post	5424 ± 45	5033 ± 46	5987 ± 97	5918 ± 156	4800 ± 37	4360 ± 64	4993 ± 45	4446 ± 204
Jump rec	5511 ± 59	5312 ± 71	6018 ± 116	4849 ± 180	4737 ± 32	4320 ± 61	4933 ± 37	4367 ± 201

Tabelle 2 - Zellquerschnittsoberfläche der Muskelfasern des SOL und VL; gepoolte Mittelwerte ± SEM in  $\mu\text{m}^2$  beider Gruppen (CTRL vs. Jump) zu den drei Zeitpunkten (pre, post, rec)

Die CSA-Mittelwerte zum Zeitpunkt post und zum Zeitpunkt rec sind jeweils für jeden Probanden durch den Ausgangswert zum Zeitpunkt pre dividiert worden, um eine Baseline-Korrektur durchzuführen und die Zellgrößenentwicklung zwischen den Gruppen zu vergleichen. Auch hier findet sich ein deutlicher Einfluss der Trainingsintervention auf die Zellgröße nach 60-tägiger Bettruhe im SOL, nicht jedoch im VL.

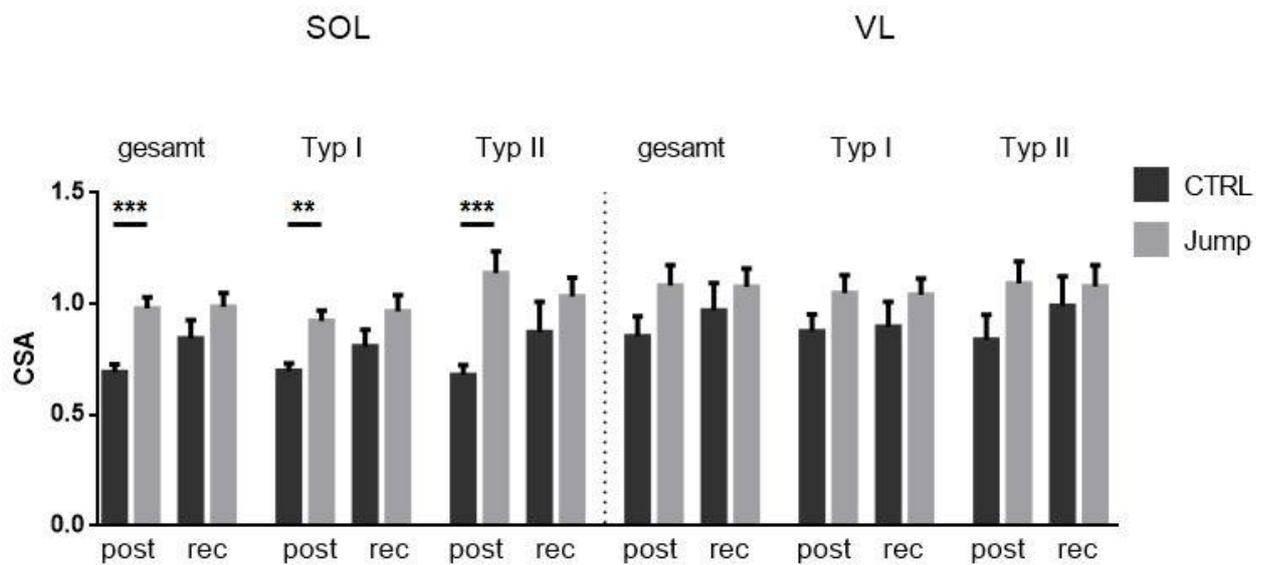


Abbildung 8 - Zellgrößenentwicklung beider Muskeln (links: SOL; rechts: VL) getrennt nach Muskelfasertypen (I + II, I, II) für beide Gruppen (CTRL vs. Jump); post-Wert (Mittelwert BR59 / Mittelwert BDC-5), rec-Wert (Mittelwert rec+10 / Mittelwert BDC-5); y=1.0 entspricht dem pre-Wert

	SOL				VL			
	CSA gesamt	CSA Typ I	CSA Typ II	CSA Hybrid	CSA gesamt	CSA Typ I	CSA Typ II	CSA Hybrid
CTRL pre	6522 ± 390	6205 ± 413	7626 ± 608	5055 ± 744	5402 ± 586	5039 ± 417	5714 ± 741	4660 ± 331
CTRL post	4486 ± 322	4295 ± 300	5103 ± 402	4133 ± 243	4479 ± 498	4347 ± 430	4573 ± 614	4579 ± 355
CTRL rec	5336 ± 446	4879 ± 386	6190 ± 731	4937 ± 561	5028 ± 676	4388 ± 504	5330 ± 793	4676 ± 633
Jump pre	5923 ± 375	5693 ± 374	6659 ± 615	5736 ± 529	4816 ± 281	4420 ± 204	5063 ± 354	3800 ± 462
Jump post	5700 ± 321	5149 ± 278	7365 ± 700	5443 ± 480	5075 ± 406	4587 ± 367	5301 ± 453	4871 ± 492
Jump rec	5834 ± 491	5493 ± 531	6603 ± 577	4955 ± 350	5017 ± 284	4594 ± 389	5175 ± 307	5768 ± 835
Zeitpunkt	p= 0.001	p< 0.0001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Intervention	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion	p= 0.010	p= 0.034	p= 0.014	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3 - Zellquerschnittsfläche der Muskelfasern des SOL und VL; Durchschnittswerte der Probanden als Mittelwert der Gruppe ± SEM in  $\mu\text{m}^2$  dargestellt; getrennt nach den Gruppen (CTRL vs. Jump) zu den drei Zeitpunkten (pre, post, rec)

## 5.2 Muskelfaserkomposition

In den Muskelbiopsien des SOL finden sich sowohl in der Kontrollgruppe ( $p < 0.0001$ ) (75,62%) als auch der Trainingsgruppe ( $p < 0.0001$ ) (70,13%) hoch signifikant mehr Typ I Fasern als Typ II Fasern (23,06% / 26,82%). Der VL hingegen besitzt deutlich mehr Typ II Fasern als Typ I Fasern; sowohl in der Kontrollgruppe ( $p < 0.0001$ ) (63,66% / 35,80%) als auch der Trainingsgruppe ( $p < 0.0001$ ) (67,76% / 28,66%).

Hier gibt es nach der Bettruhe in der Kontrollgruppe jedoch signifikante Änderungen. Im SOL ( $p < 0.0001$ ) ebenso wie im VL ( $p = 0.0131$ ) zeigt sich ein Anstieg der hybriden Muskelfasern; von 1,33% auf 12,63% im SOL beziehungsweise von 0,55% auf 10,92% im VL. Zusätzlich verringert sich die Anzahl der Typ I Fasern im SOL signifikant von 75,62% auf 61,3% ( $p = 0.0054$ ). In der Trainingsgruppe hingegen gibt es in keinem der Muskeln eine signifikante Verschiebung im Vergleich zum Ausgangswert.

Zehn Tage nach erneuter Bewegungsaufnahme weisen die Muskelproben in beiden Muskeln keine deutlichen Änderungen zur post-Probe auf. Es zeigt sich jedoch ein fortschreitender Prozess der Muskelfaserverschiebung, der bereits von pre zu post auftritt. So ist die Differenz zwischen pre- und rec-Zustand stets größer als von pre- zu post-Zustand.

Erwartungsgemäß bestätigt daher auch die Varianzanalyse eine Veränderung der Muskelfaserkomposition im zeitlichen Verlauf ( $p < 0.0001$ ) und einen Einfluss der *Intervention* auf diese Muskelfaserverschiebung ( $p = 0.004$ ).

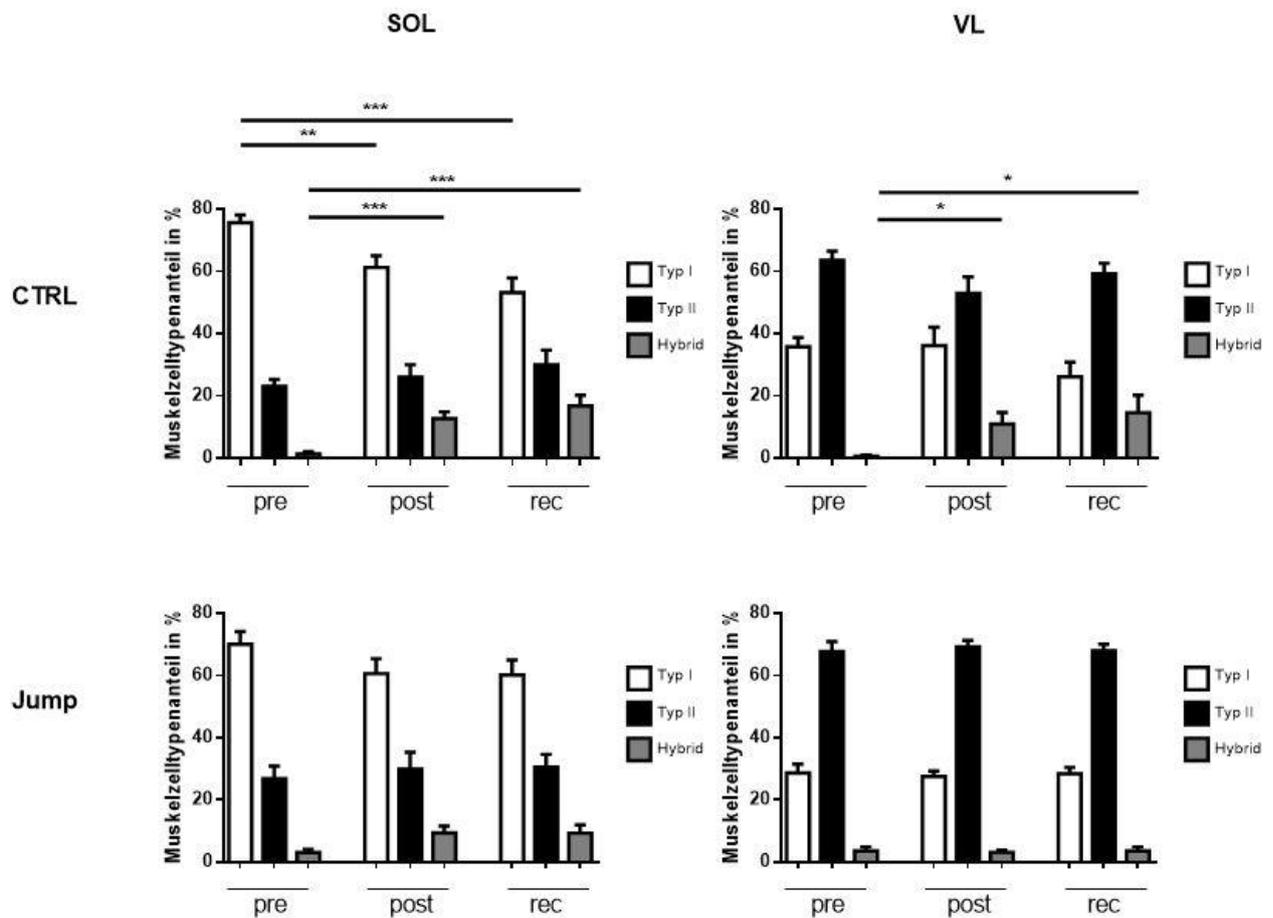


Abbildung 9 – Prozentuale Verteilung der Muskelfasertypen beider Muskeln (links: SOL; rechts: VL) und beider Gruppen (oben: CTRL; unten: Jump) zu den drei Zeitpunkten (pre, post, rec)

### 5.3 Kapillarisation

#### 5.3.1 Kapillarendichte (CD) & Kapillaren-Faser-Dichte (CFD)

Sowohl die CD als auch die CFD zeigen im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen weder in der Kontroll- noch in der Trainingsgruppe. So finden sich auch zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Die CFD variiert hoch signifikant zwischen den Muskelfasertypen ( $p < 0.0001$ ).

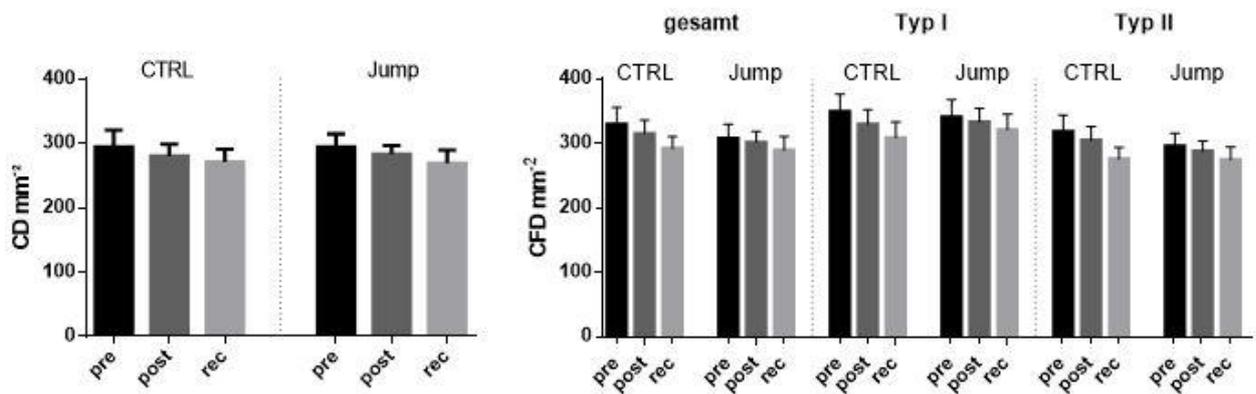


Abbildung 10 - links: Kapillarendichte (CD) in mm<sup>2</sup>, getrennt nach Gruppen (CTRL vs. Jump) zu den Zeitpunkten (pre, post, rec); rechts: Kapillaren-Muskelfaser-Dichte (CFD) in mm<sup>2</sup>, getrennt nach den Gruppen (CTRL vs. Jump) für die Muskelfasertypen (I + II, I, II) zu den Zeitpunkten (pre, post, rec)

### 5.3.2 Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (C:F)

In der Varianzanalyse weist der zeitliche Verlauf einen marginal signifikanten Effekt auf das Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis auf ( $p=0.057$ ) und wird durch die Intervention beeinflusst ( $p=0.046$ ). In der Kontrollgruppe kommt es zu einem Abfall des C:F ( $p=0.0065$ ), der in der Trainingsgruppe nicht auftritt.

So zeigt die C:F-Entwicklung im direkten Vergleich zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede sowohl zum post- ( $p=0.0196$ ) als auch zum rec-Zeitpunkt ( $p=0.0157$ ).

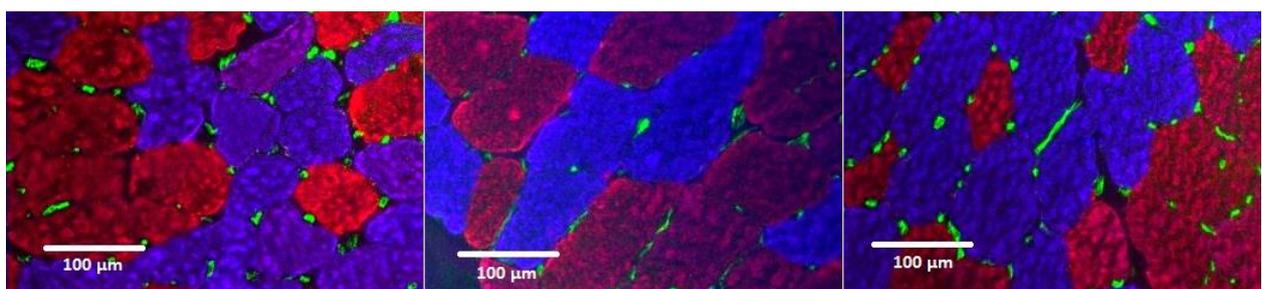


Abbildung 11 – Repräsentative Muskelquerschnitte des VL der Kontrollgruppe desselben Probanden (von links nach rechts: pre-post-rec); Typ-I Muskelfasern (rot), Typ-2 Muskelfasern (blau), Endothel (grün), hybride Muskelfasern in Farbzwischenstufen (rot – blau)

### 5.3.3 Kapillardomänenanzahl (DAF)

Auch die Anzahl der Kapillaren, die eine Muskelfaser versorgen, wird über den beobachteten Zeitraum reduziert ( $p= 0.023$ ). Dieser Effekt ist abhängig von der durchgeführten Intervention ( $p= 0.011$ ), obwohl die Intervention selbst nur marginale Signifikanz zeigt ( $p= 0.053$ ). Diese Reduktion ist abhängig vom Zelltyp ( $p < 0.0001$ ). Während die DAF in der Trainingsgruppe für die Typ I Fasern eher sinkt, steigt sie für die Typ II Fasern. In den Post-hoc-Tests zeigt sich in der Kontrollgruppe eine Reduktion der DAF von pre zu rec ( $p= 0.0163$ ), sowohl für die Typ I Fasern ( $p= 0.0067$ ) als auch die Typ II Fasern ( $p= 0.0217$ ). Für die Typ II Fasern findet sich diese Reduktion bereits zum Zeitpunkt post ( $p= 0.0456$ ). Dieser Rückgang findet sich nicht in der Trainingsgruppe.

Auch im direkten Vergleich zwischen den Gruppen nach Baseline-Korrektur gibt es ausgeprägte Unterschiede nach Bettruhe ( $p= 0.0386$ ), die zum Zeitpunkt rec noch bestehen ( $p= 0.0058$ ). Diese Unterschiede zeigen sich, bis auf für die Typ I Muskelfasern zum Zeitpunkt post, in allen Muskelfasertypen signifikant.

### 5.3.4 Lokales Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (LCFR)

Das LCFR verringert sich von pre zu post in der Kontrollgruppe ( $p= 0.0461$ ). Dieser Rückgang wird maßgeblich durch die Kapillaren um die Typ II Muskelfasern angetrieben ( $p= 0.0079$ ), findet sich jedoch auch angedeutet in den Typ I Muskelfasern. In der Trainingsgruppe ist kein Effekt zu sehen. Die durchgeführte Varianzanalyse weist einen signifikanten Einfluss des Innersubjektfaktors *Zeitpunkt* auf ( $p= 0.003$ ), der sowohl gruppenabhängig ist ( $p= 0.006$ ), als auch eine Korrelation mit den *Zelltypen* aufweist ( $p= 0.001$ ). Der Intersubjektfaktor *Intervention* ist jedoch nur marginal signifikant ( $p= 0.064$ ). Post-hoc durchgeführte Mehrfachvergleichstests zeigen eine Verringerung des LCFR von pre zu rec ( $p= 0.0108$ ), sowohl um die Typ I Fasern ( $p= 0.0028$ ) als auch die Typ II Fasern ( $p= 0.0206$ ). Der Rückgang ist bereits nach 60-tägiger Bettruhe ersichtlich ( $p= 0.0461$ ) und wird hauptsächlich durch Änderungen um die Typ II Fasern bewirkt ( $p= 0.0079$ ). In der Trainingsgruppe finden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf.

So findet sich auch im direkten Vergleich der LCFR-Entwicklung zwischen den Gruppen ein deutlicher Unterschied nach der Bettruhe ( $p= 0.0093$ ) und in der Regenerationsphase ( $p= 0.0093$ ).

Auch getrennt nach Muskelzelltypen entsprechen die Unterschiede dieser Entwicklung. Nur um die Typ I-Fasern zum post-Zeitpunkt unterscheiden sich die Werte nicht signifikant.

### 5.3.5 Sauerstoffaustauschkapazität (LCFR/Perimeter)

Die Sauerstoffaustauschkapazität unterscheidet sich signifikant zwischen den *Muskelfasertypen* ( $p < 0.0001$ ). Zudem findet sich eine Interaktion zwischen den Faktoren *Muskelfasertyp* und der *Intervention* über die *Zeit* ( $p = 0.006$ ). So kommt es zu einer gegenläufigen Entwicklung der Kapazität in den verschiedenen Zelltypen (Typ I: Anstieg vs. Typ II: Abfall). Der *Zeitpunkt* weist jedoch nur einen marginalen Effekt auf ( $p = 0.065$ ).

Vergleicht man die Sauerstoffaustauschkapazität der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, so findet sich eine Reduktion von pre zu rec ( $p = 0.0393$ ), sowohl in den Typ I ( $p = 0.0363$ ) als auch den Typ II Fasern ( $p = 0.0380$ ). Diese Reduktion zeigt sich in den Typ II Fasern bereits zum Zeitpunkt post ( $p = 0.0181$ ). Auch diese Veränderungen sind nicht in der Trainingsgruppe vorzufinden.

Aufgrund fehlender Signifikanz des Intersubjektfaktors *Intervention* findet sich in der Analyse zwischen den Gruppen nur in der Entwicklung der Typ II Fasern zum Zeitpunkt post ein ausgeprägter Unterschied ( $p = 0.0375$ ).

## 5.4 Sauerstoffverbrauch

Über die Messung der optischen Dichte bei 660nm beabsichtigen wir die SDH-Aktivität der Muskelfasern und somit indirekt ihren maximalen Sauerstoffverbrauch zu messen. Hier zeigt sich die OD660nm der Typ I Muskelfasern ( $0,1579 \pm 0.03487$ ) signifikant ( $p < 0.0001$ ) höher als die der Typ II Muskelfasern ( $0.1271 \pm 0.03768$ ), was sich somit auch in  $VO_2\text{max}$  widerspiegelt. Auch vom *Zeitpunkt* hängt die  $VO_2\text{max}$  ab ( $p = 0.035$ ), wird jedoch nicht durch die *Intervention* maßgeblich beeinflusst. Die  $VO_2\text{fibre}$  hingegen zeigt zusätzlich eine Interaktion zwischen *Zeitpunkt* und *Intervention* ( $p = 0.042$ ).

Post-hoc ist in der Kontrollgruppe die  $VO_2\text{fibre}$  der Typ II Fasern von pre zu post reduziert ( $p = 0.0432$ ), nicht jedoch in der Trainingsgruppe. Obwohl der Intersubjektfaktor *Intervention* in der

Varianzanalyse keine Signifikanz aufweist, unterscheidet sich die Reduktion der VO<sub>2</sub>fibre im direkten Vergleich der Gruppen vom pre- zum rec-Zustand deutlich ( $p= 0.0216$ ), sowohl der Typ I ( $p= 0.0306$ ) als auch der Typ II Fasern ( $p= 0.0485$ ). Für die Typ II Fasern ist die Reduktion bereits zwischen den Zeitpunkten pre und post signifikant ( $p= 0.0048$ ).

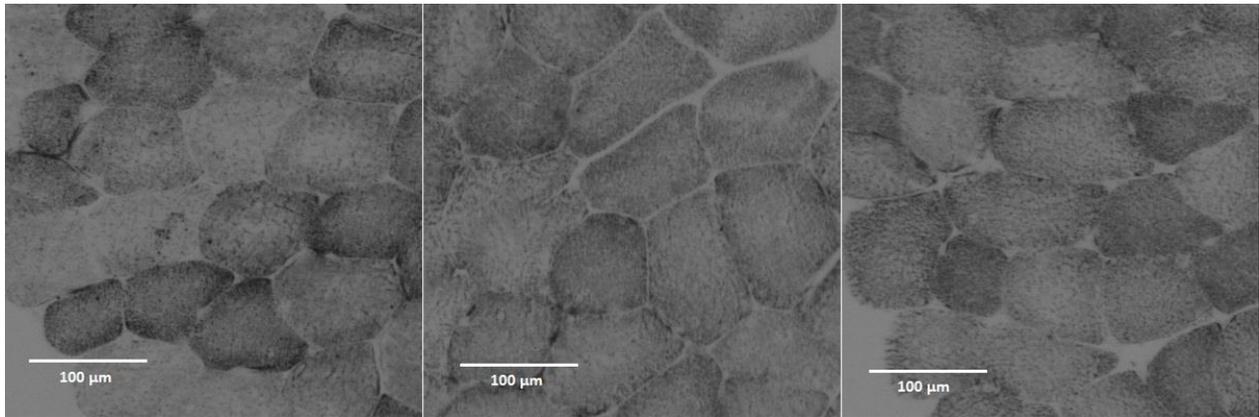


Abbildung 12 - Repräsentative Skelettmuskelquerschnitte des VL der Kontrollgruppe desselben Probanden in SDH-Färbung (von links nach rechts: pre-post-rec)

VL	CD, mm <sup>2</sup>	CFD, mm <sup>2</sup>	C:F	DAF	LCFR	(LCFR/Perimeter) x1000, mm <sup>-1</sup>	VO <sub>2</sub> max x100, l·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	VO <sub>2</sub> fibre, pl·mm <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
CTRL pre	294 ± 26	330 ± 26	2.1 ± 0.1	6.3 ± 0.3	1.9 ± 0.1	5.8 ± 0.3	5.4 ± 0.5	390 ± 91
CTRL post	281 ± 18	315 ± 21	1.7 ± 0.2	5.5 ± 0.3	1.5 ± 0.1	5.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2	232 ± 23
CTRL rec	271 ± 20	292 ± 18	1.6 ± 0.2	5.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.2	231 ± 27
Jump pre	294 ± 20	308 ± 22	1.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2	1.3 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.1	221 ± 23
Jump post	284 ± 14	302 ± 17	1.6 ± 0.1	5.1 ± 0.2	1.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	237 ± 29
Jump rec	269 ± 21	289 ± 22	1.5 ± 0.1	5.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	4.7 ± 0.3	4.5 ± 0.1	218 ± 18
Zeitpunkt	n.s.	n.s.	p=.057	p=.023	p=.003	p=.065	p=.035	p=.041
Intervention	n.s.	n.s.	n.s.	p=.053	p=.064	n.s.	n.s.	n.s.
Interaktion	n.s.	n.s.	p=.046	p=.011	p=.006	n.s.	n.s.	p=.042

Tabelle 4 - Kapillarierungs- und Sauerstoffverbrauchswerte für den musculus vastus lateralis; Werte dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Kapillarendichte (CD), Kapillaren-Faser-Dichte (CFD), Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (C:F), Kapillardomänenanzahl (DAF), Lokales Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnis (LCFR), Sauerstoffaustauschkapazität (LCFR/Perimeter), massespezifischer maximaler Sauerstoffverbrauch (VO<sub>2</sub>max) und faserintegrierter Sauerstoffverbrauch (VO<sub>2</sub>fibre) des VL beider Gruppen (CTRL vs. Jump) zu den drei Zeitpunkten (pre, post, rec). Ergebnisse der Varianzanalyse des Innersubjektors Zeitpunkt und des Intersubjektors Intervention, sowie deren Interaktion als p-Werte; nicht signifikant als n.s. gekennzeichnet

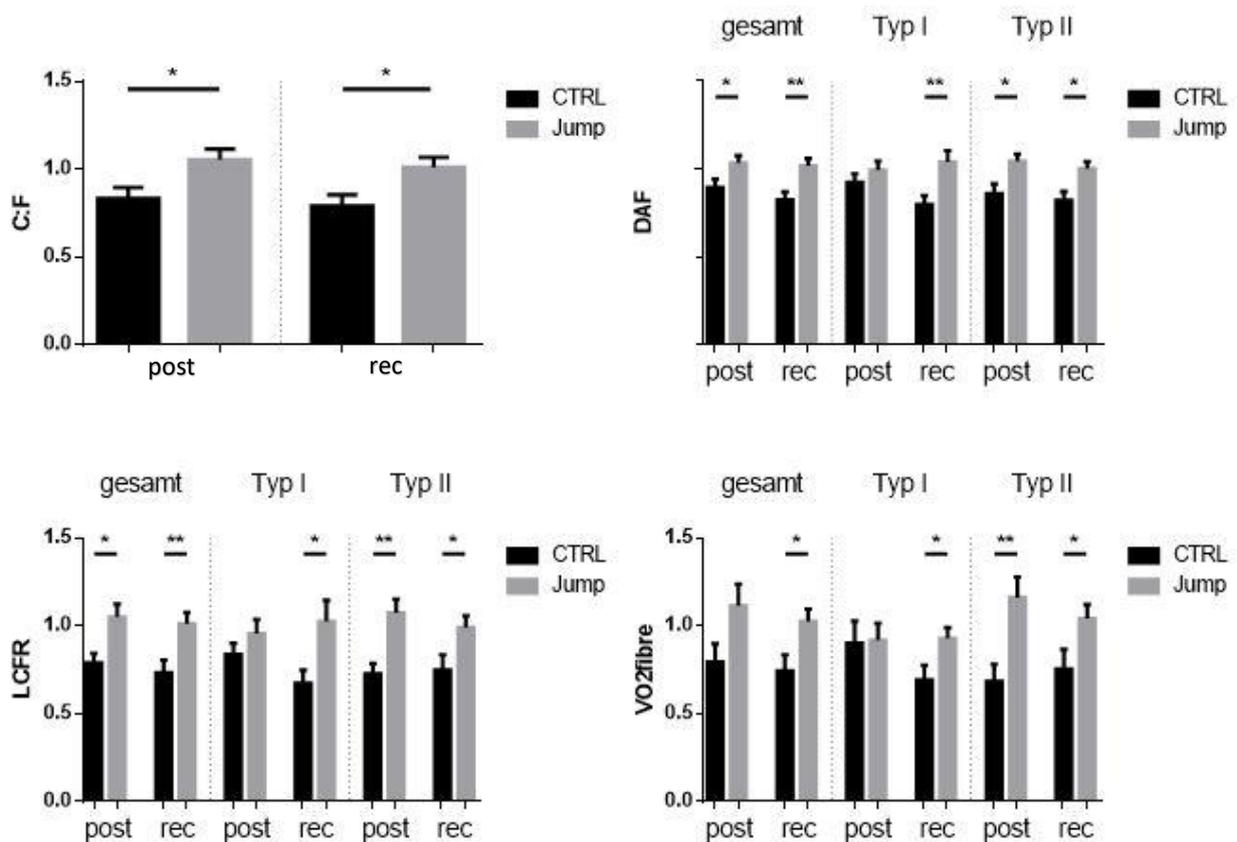


Abbildung 13 - Entwicklung des Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnisses (C:F), der Kapillardomänenanzahl (DAF), des lokalen Kapillaren-Muskelfaser-Verhältnisses (LCFR) und des faserintegrierten Sauerstoffverbrauchs ( $VO_2$ fibre) des VL getrennt nach Muskelfasertypen (I + II, I, II; in C:F nicht inbegriffen) für beide Gruppen (CTRL vs. Jump); post-Wert (Mittelwert BR59 / Mittelwert BDC-5), rec-Wert (Mittelwert rec+10 / Mittelwert BDC-5);  $y=1.0$  entspricht dem pre-Wert

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde nach möglichen negativen Einflüssen der Langzeitbettruhe auf die Muskelmorphometrie und -funktionalität gesucht sowie nach einer Möglichkeit, diese zu verhindern. In diesem Sinne wurden Daten aus den Hauptbereichen der Zellgröße, Zelltypenverteilung, Gewebskapillarisation und oxidativen Kapazität erhoben und miteinander verglichen. Zusätzlich ist von unserer Arbeitsgruppe mit der Biopsie zehn Tage nach Wiederaufnahme der Bewegung erstmals auch eine Verlaufskontrolle durchgeführt worden und somit eine Aussage zu Regenerationsprozessen der Muskulatur möglich. In jedem einzelnen dieser Bereiche zeigten sich teils deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und den Gruppen, was zum einen das verwendete Modell als effektives Werkzeug zum Induzieren von Muskelschwund bestätigt und zum anderen den Nutzen des Trainingsprotokolls mit reaktiven Sprüngen aufzeigt.

Kritisch zu hinterfragen sind die relativ hohen Werte der Kontrollgruppe vor Beginn der Studie im Großteil unserer erhobenen Datensätze verglichen mit der Trainingsgruppe. Jedoch ist dieser Unterschied aufgrund seiner Konsistenz in unseren Ergebnissen letztlich höchst wahrscheinlich nur auf die Intervariabilität der Probanden zurückzuführen. Die CSA und Muskelfaserkomposition wurden von zwei unterschiedlichen Untersuchern gemessen und analysiert, waren beide geblendet während der Untersuchung und fanden dennoch übereinstimmend sowohl höhere CSA-Werte der Kontrollgruppe als auch eine Muskelfaserkomposition, die für einen besser trainierten Muskel spricht. Auch in den weiteren Analysen des VL zeigte sich die Muskulatur der Kontrollgruppe besser kapillarisiert und wies eine höhere SDH-Aktivität auf. Zudem war trotz des Abfalls der Werte vom pre- zum post-Zustand in der Kontrollgruppe, der in der Trainingsgruppe zuweilen als Anstieg auftrat, der post-Wert der Kontrollgruppe meist dennoch höher als der der Trainingsgruppe. Die Konsistenz und Plausibilität der Ergebnisse lässt Verzerrungen durch relativ hohe Ausgangswerte der Kontrollgruppe unwahrscheinlich erscheinen.

### *Morphologie*

Die erhobenen Ergebnisse zur Zellgrößenentwicklung unserer Arbeit stimmen größtenteils mit denen anderer, ähnlicher Arbeiten überein und erfüllen somit unsere Erwartungen (14, 15). Eine Muskelentlastung von 60 Tagen führt in unseren Beobachtungen zu deutlichen Rückgängen der Faserdurchmesser der untersuchten Muskeln. Bereits zehn Tage nach Bettruhe zeigt sich dagegen im musculus soleus wieder eine Umkehr des Abbaus hin zu einem ausgeprägten Anstieg der Zellgröße, der jedoch nicht den zuvor entstandenen Rückgang ausgleichen kann. Möglich ist, dass der gesamte Anstieg der CSA oder Teile davon durch die vertikale Flüssigkeitsverschiebung zurück in die untere Körperhälfte zustande kommt. Zwar sorgt der hydrostatische Druck nicht für einen Anstieg des Intrazellvolumens, jedoch führt die Flüssigkeitsverschiebung zu einer veränderten Herzkreislaufbelastung, die wiederum zu einem veränderten Flüssigkeitshaushalt im Sinne einer gesamtkörperlich positiven Flüssigkeitsbilanz führt(29). Interessanter Weise findet sich dieses Zellwachstum nicht im musculus quadriceps vastus lateralis. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Kaschierung des Effekts durch den weitaus geringeren Volumenverlust durch Bettruhe.

Auch das verwendete Trainingsprotokoll mit reaktiven Sprüngen erwies sich als geeignet, den muskulären Zellgrößenverlust zu verhindern. Wie bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben, kann Muskelatrophie während Bettruhe in unterschiedlichem Ausmaß verhindert werden (16). Die von uns getesteten reaktiven Sprünge haben im VL die Zellgrößenverringering komplett verhindert und eher eine Tendenz zum Muskelaufbau geleistet, während dies im SOL nicht

komplett aufgehoben werden kann, da die Muskelfasern Typ I trotz des Trainings in ihrer Größe abgenommen haben. Dies kann zum einen bedeuten, dass die durchgeführten Sprünge den VL stärker beanspruchen als den, wie an der Muskelfaserzusammensetzung zu erkennen, eher der Haltemuskulatur zuzuordnenden SOL, oder zum anderen der VL schlichtweg weit weniger auf Entlastung reagiert hat, worauf die fehlende Signifikanz des Intersubjektfaktors *Intervention* in der Varianzanalyse des VL hinweist.

#### *Muskelfaserkomposition*

Es ist allgemein bekannt, dass eine Muskelentlastung zu einer Verschiebung der Muskelfasern von Typ I zu Typ II bewirkt und dabei vermehrt hybride Zelltypen auftreten, die im Verlauf ihrer Umwandlung positiv für beide schwere Ketten des Myosins sind (14, 18). Unsere Ergebnisse bestätigen den prozentualen Anstieg der hybriden Fasertypen in beiden Muskeln (SOL: 13,3%; VL: 10,4%) und den Abfall der Typ I Fasern im SOL (14,3%).

Durch die Effektivität des durchgeführten Trainingsverfahrens in Kopftieflage konnte die Muskelfaserzusammensetzung erhalten werden und die beobachtete Umwandlung der Zelltypen ist in der Trainingsgruppe nicht aufgetreten.

#### *Kapillarisierung*

Eine zuvor durchgeführte Studie (27) mit identischer Datenerhebung jedoch differentem Studienaufbau fand ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Zellgrößenentwicklung und oxidativer Kapazität, im Gegensatz zu dieser hier vorliegenden Arbeit jedoch keinen Einfluss auf die Kapillarisierung und nur leichte Muskeltypenverschiebung der Muskulatur. Wahrscheinlich beruht diese Differenz der Ergebnisse maßgeblich an dem beobachteten Zeitraum, der in der Studie von Bosutti et al. (27) mit 19 Tagen in etwa einem Drittel der vorliegenden Arbeit betrug. Dabei handelt es sich beim strukturellen Umbau der Muskulatur um einen trägen Prozess ist. So benötigt allein die typische Konversion des Muskelfasertyps I zum Muskelfasertypen II in der Muskulatur der Ratte durchschnittlich um die 14 Tage (30). Über die genaue Halbwertszeit der schweren Ketten des menschlichen Myosins ist dabei noch weit weniger bekannt (31) und, wenn man unsere Ergebnisse im Verlauf von post zu rec interpretiert, ist der Umbau entweder noch fortlaufend oder einige der bereits zum Zeitpunkt pre als Typ II bestehenden Muskelfasern bereits wieder in der Umwandlung in Typ I Muskelfasern, wodurch die wachsende Anzahl an Hybridzellen zum Zeitpunkt rec zu erklären wäre. Da sich jedoch die relative Anzahl der Typ I Muskelfasern von post zu rec weiterhin reduziert, ist der fortlaufende Prozess auch nach 60 Tagen als wahrscheinlicher anzusehen. Generell scheint der musculus soleus stärker oder zumindest

schneller seine Kapillarisation an eine verringerte Beanspruchung zu adaptieren (32). Wird nach 42-45 Tagen der Bettruhe kein Anhalt einer Anpassung der Kapillarisation in der C:F und CD des musculus vastus lateralis gefunden (33, 34), erscheint diese nach 90 Tagen der Bettruhe deutlich (32). Wir befinden uns mit einem Zeitraum von 60 Tagen mitten im Intervall zwischen dem genannten Studien und finden eine Verringerung des C:F wohingegen für die CD nur eine Tendenz beschrieben werden kann. Gemeinhin wird die Aussagekraft der CD jedoch angezweifelt, da durch Atrophie der Muskelzellen eine verstärkte Kapillarisation vorgetäuscht werden kann (20). Allerdings zeigen sich in den zusätzlichen Kapillarisationswerten, die von den zuvor genannten Studien nicht untersucht wurden, ebenso sowohl signifikante Adaptationen, als auch ein Ausbleiben eben dieser. Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass wir uns mit 60-tägiger Bettruhe genau im benötigten Zeitraum für erste aussagekräftige vollendete Kapillarisationsumbauprozesse befinden.

Vergleichen wir die Gruppen miteinander, um den Effekt der reaktiven Sprünge auf die Kapillarisation der Muskulatur zu messen, finden sich deutliche Unterschiede. Ist das C:F in der Kontrollgruppe im Verlauf der 60 Tage noch signifikant zurückgegangen, geschieht dies nicht in der Trainingsgruppe. So weicht die Änderung des C:F der Trainingsgruppe stets signifikant von der Kontrollgruppe ab. Auch die Auswirkungen des plyometrischen Trainings auf die anderen Messwerte zur Quantifizierung der kapillären Blutversorgung wie das LCFR und die DAF unterscheiden sich teilweise signifikant.

### *Sauerstoffverbrauch*

Unsere Ergebnisse zeigen eine deutlich höhere oxidative Kapazität der Typ I Fasern gegenüber der Typ II Fasern. Auch der signifikante Abfall der oxidativen Kapazität nach 60-tägiger Bettruhe fällt in den Typ I Fasern geringer beziehungsweise erst verzögert auf. Jedoch werden in der Analyse, aufgrund der Muskelfasertypenverschiebung von Typ I zu II, die besonders stark beeinflussten Typ I Fasern nicht miteinberechnet, da sie fortan als Hybridzellen gezählt werden. Hier liegt wahrscheinlich der Grund für den geringeren Effekt. Aufgrund der bekannten Richtung von Typ I zu II wäre hier ein Hinzurechnen der Hybridfasern zu den Typ I Fasern möglich gewesen, während wir sie wegen zu geringer Zahl nicht separat berechnet haben und sie daher nur im Datensatz der gesamten Zellen erscheinen. Im Gruppenvergleich zeigt sich durch den deutlichen Abfall der oxidativen Kapazität der Kontrollgruppe und durch eine eher steigende Enzymaktivität durch Training ein ausgeprägter Unterschied vor allem nach 70 Tagen. Dieser tritt jedoch bereits nach 60 Tagen auch in den Typ II Fasern auf.

Andere Studien zur oxidativen Kapazität der Muskulatur nach Bettruhe oder Immobilisation sind sehr uneinheitlich, sowohl in der Methodik zur Datenerhebung als auch in ihren Ergebnissen. Während einige ebenso die Enzymaktivität der SDH zur Quantifizierung der oxidativen Kapazität herangezogen haben (27, 35), haben andere gleich mehrere Enzyme der Atmungskette beziehungsweise bevorzugt die Citrat-Synthase betrachtet (36, 37). Da in unserem Fall die Entlastung länger angehalten hat als in der Studie von Bosutti et al. (27), fällt die durchschnittliche Reduktion der SDH-Aktivität prozentual höher, jedoch aufgrund einer höheren Standardabweichung, erst zum Zeitpunkt rec für alle Muskelfasertypen signifikant aus. Übereinstimmend zeigen sich der Ergebnisse von Berg et al. (36) zur Citrat-Synthase, deren Abfall durch Entlastung des VL auf eine verringerte oxidative Kapazität hindeuten. Und obwohl Fitts et al. (37) mit einem Anstieg der Citrat-Synthase-Aktivität einen gegenläufigen Effekt der Muskelentlastung gefunden haben, zeigte sich in den übrigen untersuchten Enzymaktivitäten eine Verschiebung vom oxidativen Typ I zum glykolytischem Typ II. Allen Studien gemein ist ein deutlich positiver relativer Effekt des Trainings auf die oxidative Kapazität, obgleich einige, wie in unserem Fall, einen Abfall in der Kontrollgruppe verhindert, andere dagegen durch Training eher einen Anstieg der oxidativen Kapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe herbeigeführt haben. Die Ergebnisse bestätigen somit einen Rückgang der Mitochondriendichte beziehungsweise der mitochondrialen Enzymaktivitäten durch Bettruhe (33).

### *Schlussfolgerung*

Langzeitbettruhe verursacht eine Atrophie der entlasteten Muskulatur, die sich in einer verringerten Zellgröße, Kapillarisation, oxidativen Kapazität und einer veränderten Muskelfasertypenverteilung widerspiegelt. Diese Änderungen sind erfolgreich durch ein Trainingsprotokoll, bestehend aus reaktiven Sprüngen während der permanenten 60 Tage andauernden Liegephase der RSL-Studie, aufgehalten worden, sodass unser Trainingsprotokoll als ein weiteres, möglicherweise effizienteres, Werkzeug genutzt werden kann, Muskelabbau in Folge von Schwerelosigkeit oder Bettlägerigkeit zu verhindern.

## 7 Literatur

1. Fisher SR, Kuo YF, Sharma G, Raji MA, Kumar A, Goodwin JS, Ostir GV, Ottenbacher KJ. Mobility after hospital discharge as a marker for 30-day readmission. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2013;68(7):805-10.
2. Fisher SR, Goodwin JS, Protas EJ, Kuo YF, Graham JE, Ottenbacher KJ, Ostir GV. Ambulatory activity of older adults hospitalized with acute medical illness. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2011;59(1):91-5.
3. Baldwin KM, White TP, Arnaud SB, Edgerton VR, Kraemer WJ, Kram R, Raab-Cullen D, Snow CM. Musculoskeletal adaptations to weightlessness and development of effective countermeasures. *Medicine and science in sports and exercise*. 1996;28(10):1247-53.
4. Trappe S, Costill D, Gallagher P, Creer A, Peters JR, Evans H, Riley DA, Fitts RH. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(4):1159-68.
5. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, Peters JR, Romatowski JG, Bain JL, Riley DA. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 18):3567-92.
6. Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(6):2185-201.
7. Saez-Saez de Villarreal E, Requena B, Newton RU. Does plyometric training improve strength performance? A meta-analysis. *Journal of science and medicine in sport*. 2010;13(5):513-22.
8. Kramer A, Kummel J, Mulder E, Gollhofer A, Frings-Meuthen P, Gruber M. High-Intensity Jump Training Is Tolerated during 60 Days of Bed Rest and Is Very Effective in Preserving Leg Power and Lean Body Mass: An Overview of the Cologne RSL Study. *PloS one*. 2017;12(1):e0169793.
9. Milgrom C, Finestone A, Levi Y, Simkin A, Ekenman I, Mendelson S, Millgram M, Nyska M, Benjuya N, Burr D. Do high impact exercises produce higher tibial strains than running? *British journal of sports medicine*. 2000;34(3):195-9.
10. Houghton LA, Dawson BT, Rubenson J. Effects of plyometric training on achilles tendon properties and shuttle running during a simulated cricket batting innings. *Journal of strength and conditioning research*. 2013;27(4):1036-46.
11. Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA. The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology*. 2012;590(20):5211-30.
12. Naczki M, Naczki A, Brzenczek-Owczarzak W, Arlet J, Adach Z. Impact of Inertial Training on Strength and Power Performance in Young Active Men. *Journal of strength and conditioning research*. 2016;30(8):2107-13.
13. 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):1772-4.
14. Blottner D, Bosutti A, Degens H, Schiffl G, Gutschmann M, Buehlmeier J, Rittweger J, Ganse B, Heer M, Salanova M. Whey protein plus bicarbonate supplement has little effects on structural atrophy and proteolysis marker immunopatterns in skeletal muscle disuse during 21 days of bed rest. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2014;14(4):432-44.
15. Arentson-Lantz EJ, English KL, Paddon-Jones D, Fry CS. Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J Appl Physiol* (1985). 2016;120(8):965-75.
16. Salanova M, Gambará G, Moriggi M, Vasso M, Ungethüem U, Belavy DL, Felsenberg D, Cerretelli P, Gelfi C, Blottner D. Vibration mechanosignals superimposed to resistive exercise result in baseline skeletal muscle transcriptome profiles following chronic disuse in bed rest. *Scientific reports*. 2015;5:17027.
17. Frese S, Ruebner M, Suhr F, Konou TM, Tappe KA, Toigo M, Jung HH, Henke C, Steigleder R, Strissel PL, Huebner H, Beckmann MW, van der Keylen P, Schoser B, Schiffer T, Frese L, Bloch W,

- Strick R. Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PloS one*. 2015;10(7):e0132099.
18. Borina E, Pellegrino MA, D'Antona G, Bottinelli R. Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2010;20(1):65-73.
  19. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(5):C1342-8.
  20. Tysl K, Mathieu-Costello O. Structural and functional changes in the microvasculature of disused skeletal muscle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2001;6:D45-52.
  21. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2009;457(5):963-77.
  22. Salanova M, Schiffel G, Puttmann B, Schoser BG, Blottner D. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. *Journal of anatomy*. 2008;212(3):306-18.
  23. Roudier E, Gineste C, Wazna A, Dehghan K, Desplanches D, Birot O. Angio-adaptation in unloaded skeletal muscle: new insights into an early and muscle type-specific dynamic process. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 22):4579-91.
  24. Tanner RE, Bruner LB, Agergaard J, Barrows KM, Briggs RA, Kwon OS, Young LM, Hopkins PN, Volpi E, Marcus RL, LaStayo PC, Drummond MJ. Age-related differences in lean mass, protein synthesis and skeletal muscle markers of proteolysis after bed rest and exercise rehabilitation. *The Journal of physiology*. 2015;593(18):4259-73.
  25. Ferrando AA, Paddon-Jones D, Wolfe RR. Alterations in protein metabolism during space flight and inactivity. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2002;18(10):837-41.
  26. van der Laarse WJ, Diegenbach PC, Elzinga G. Maximum rate of oxygen consumption and quantitative histochemistry of succinate dehydrogenase in single muscle fibres of *Xenopus laevis*. *Journal of muscle research and cell motility*. 1989;10(3):221-8.
  27. Bosutti A, Salanova M, Blottner D, Buehlmeier J, Mulder E, Rittweger J, Yap MH, Ganse B, Degens H. Whey protein with potassium bicarbonate supplement attenuates the reduction in muscle oxidative capacity during 19 days of bed rest. *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(4):838-48.
  28. Degens H, Turek Z, Hoofd LJ, Van't Hof MA, Binkhorst RA. The relationship between capillarisation and fibre types during compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in the rat. *Journal of anatomy*. 1992;180 ( Pt 3):455-63.
  29. Mailliet A, Pavy-Le Traon A, Allevard AM, Sigaud D, Hughson RL, Gharib C, Gauquelin G. Hormone changes induced by 37.5-h head-down tilt (-6 degrees) in humans. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1994;68(6):497-503.
  30. Termin A, Pette D. Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *European journal of biochemistry*. 1992;204(2):569-73.
  31. Andersen JL, Gruschy-Knudsen T, Sandri C, Larsson L, Schiaffino S. Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 1999;86(2):455-60.
  32. Rudnick J, Puttmann B, Tesch PA, Alkner B, Schoser BG, Salanova M, Kirsch K, Gunga HC, Schiffel G, Luck G, Blottner D. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(11):1228-30.
  33. Ferretti G, Antonutto G, Denis C, Hoppeler H, Minetti AE, Narici MV, Desplanches D. The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal O<sub>2</sub> consumption in man after prolonged bed rest. *The Journal of physiology*. 1997;501 ( Pt 3):677-86.
  34. Krainski F, Hastings JL, Heinicke K, Romain N, Pacini EL, Snell PG, Wyrick P, Palmer MD, Haller RG, Levine BD. The effect of rowing ergometry and resistive exercise on skeletal muscle structure and function during bed rest. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;116(12):1569-81.
  35. Bosutti A, Egginton S, Barnouin Y, Ganse B, Rittweger J, Degens H. Local capillary supply in muscle is not determined by local oxidative capacity. *The Journal of experimental biology*. 2015;218(Pt 21):3377-80.

36. Berg HE, Dudley GA, Hather B, Tesch PA. Work capacity and metabolic and morphologic characteristics of the human quadriceps muscle in response to unloading. *Clinical physiology (Oxford, England)*. 1993;13(4):337-47.
37. Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, Timmerman RJ. Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *The American journal of physiology*. 1989;256(5 Pt 1):C1082-91.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Weber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Reaktive Sprünge als Maßnahme gegen inaktivitätsbedingten Muskelabbau während Langzeitbettruhe“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

# **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Die erfolgreiche Fertigung dieser Arbeit ist nicht zuletzt auf die Unterstützung zahlreicher großartiger Menschen meines Umfelds zurückzuführen.

Allen voran selbstverständlich meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mir stets den Rückhalt gegeben haben, Herausforderungen anzugehen, meinen Stärken zu vertrauen, und somit Ziele zu erreichen, auf die ich heute stolz zurückschauen kann.

Dem gesamten Team der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Blottner: Dr. M. Salanova, G. Gambará, G. Schiffel, M. Gutsmann, die mir mit ihrem Wissen und vor allem einer freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre unentwegt zur Seite standen, so dass ich mir ein weiteres Arbeiten ohne sie kaum vorstellen kann.

Meinen Freunden, die mich auf meinem Lebensweg begleiten, meine Fehler nicht nur ertragen, sondern gar schätzen, und bittere Momente meines Lebens durchweg versüßen.

Und zu guter Letzt den freiwilligen Probanden der RSL-Studie, ohne deren Teilnahme nichts hiervon entstanden wäre.