

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Studie bestand darin, mit Hilfe von morphologischen und morphometrischen Untersuchungen die trainingsbedingten Skelettmuskelveränderungen in Abhängigkeit von den bei verschiedenen Blutlaktatkonzentrationen durchgeführten Trainingsarten festzustellen. Auf dieser Weise soll ein Beitrag zur Optimierung des Trainings und der Ausdauer von Pferden geleistet werden.

Es wurden insgesamt sechs zweijährige Pferde der Rasse Haflinger verwendet. Die Pferde wurden vor Versuchsbeginn auf der Weide gehalten. Keines der Pferde war vorher an Versuchen beteiligt. Die Testphase, die eine Trainings- und eine Ruhephase enthielt, war das eigentliche Kernstück des Versuchs. Sowohl Trainingsphase als auch Ruhephase hatten eine Dauer von 6 Wochen. Die Trainingsphasen bestanden aus 21 Trainingseinheiten, in denen die Pferde an jedem zweiten Tag bei der Geschwindigkeit und Dauer der vorgesehenen Trainingsart liefen. Die Pferde wurden während einer sechswöchigen Trainingsperiode ausschließlich mit einer von drei Trainingsarten belastet. Im Laufe des Versuchs durchlief jedes Pferd die drei zu prüfenden Trainingsarten.

Bei der Trainingsart $V_{1,24,0}$ liefen die Pferde bei einer Geschwindigkeit, die im Belastungstest eine Blutlaktatkonzentration von 4 mmol/l hervorrief, über eine Dauer von 25 Minuten. Bei den Belastungen $V_{1,21,5}$ bzw. $V_{1,22,5}$ liefen die Pferde bei einer Geschwindigkeit, die im Belastungstest 1.5 bzw. 2.5 mmol/l Blutlaktat hervorriefen. Der Trainingszeitraum hatte eine Dauer von 45 Minuten.

Die Reihenfolge der Trainingsarten für jedes Pferd wurde randomisiert, um den Effekt der Jahreszeit und des Wachstums auf die Ergebnisse zu verringern und eventuelle Einflüsse einer der Trainingsarten auf die Ergebnisse einer anderen Trainingsart zu vermeiden.

Zu Beginn und am Ende jeder Trainingsperiode wurde von den Pferden Muskelbiopsien aus dem *M. gluteus medius* in 6 cm Tiefe entnommen.

An den Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung. Von jeder Lokalisation wurden mindestens fünf elektronenmikroskopische Aufnahmen bei einer Grundvergrößerung von 6300 x für die Beurteilung der Kapillaren und bei 10.000-facher Grundvergrößerung für die morphometrische Auswertung der Mitochondrien und der Myofibrillen angefertigt. Die morphometrische Auswertung erfolgte am halbautomatischen Bildanalyseauswertungsgerät ASM 68 K.

Vor und nach dem gesamten Trainingsprogramm bestand zwischen den Probanden ein eindeutiger individueller Unterschied in Bezug auf den Gehalt an Mitochondrien und die mittlere Kapillarfläche. Im Gegensatz dazu streuten die Werte für die mittlere Fläche des Myofibrillenquerschnittes zwischen den Pferden nicht stark. Der durchschnittliche Wert der mittleren Myofibrillenquerschnittsfläche bei allen Probanden lag bei $0,71 \mu\text{m}^2$.

Die Gesamtmitochondrienfläche schwankte vor dem Trainingsprogramm zwischen $8,56 \mu\text{m}^2$ - $12,3 \mu\text{m}^2$ und nach dem gesamten Trainingsprogramm zwischen $13,14 \mu\text{m}^2$ und $15,94 \mu\text{m}^2$. Die vor dem Trainingsprogramm an den Kapillaren gemessenen Werte der mittleren Fläche schwankten zwischen $12,39 \mu\text{m}^2$ und $20,58 \mu\text{m}^2$. Nach dem Trainingsprogramm streuten deren Werte zwischen $17,09 \mu\text{m}^2$ und $37,97 \mu\text{m}^2$. Es war festzustellen, daß die Erhöhung der Gesamtfläche der Mitochondrien durch eine Vermehrung und / oder Vergrößerung der Mitochondrien zustande kam, die mit der durchgeführten Trainingsart zusammenhing.

Die an den Mitochondrien festgestellten Meßergebnisse spiegeln damit wieder, daß die durch das Training bedingten Veränderungen an den Mitochondrien nicht im gleichen Ausmaß und in der gleichen Weise zustande kamen. Anhand der an den Mitochondrien festgestellten Ergebnisse waren die Trainingsarten $V_{L_{1,5}}$ und $V_{L_{2,5}}$ mit einer Trainingszeit von 45 Minuten die effizientesten. Bei diesen vertief die mittlere Zuwachsrate der Gesamtmitochondrienfläche nahezu gleich. Es ist zu beobachten, daß die Erhöhung der gesamten Mitochondrienfläche bei diesen Trainingsarten nicht in gleicher Weise zustande kam. Die bei der Trainingsart von $V_{L_{1,5}}$ festgestellte Vergrößerung der mittleren Fläche der Mitochondrien führte zu einem Anstieg der Gesamtmitochondrienfläche, während bei den Trainingsarten $V_{L_{2,5}}$ und $V_{L_{4,0}}$ sowohl eine Vergrößerung als auch eine Vermehrung der Mitochondrien zu der Erhöhung der Gesamtmitochondrienfläche beitrugen. Bei der Trainingsart von $V_{L_{2,5}}$ war die Anzahlerhöhung der Mitochondrien am stärksten, gefolgt von der Trainingsart $V_{L_{4,0}}$.

Für die Beurteilung der oxidativen Kapazität und der Ausdauerleistungsfähigkeit ist die Zuwachsrate der Mitochondrien von größten Bedeutung. Demnach verbesserten die Pferde bei den Trainingsarten $V_{L_{1,5}}$ und $V_{L_{2,5}}$ ihre Ausdauerleistungsfähigkeit stärker, als bei der $V_{L_{4,0}}$.

Die morphometrischen Untersuchungen ergaben eine durch das Training induzierte Vergrößerung des Kapillarlumens. Außerdem konnten individuelle Unterschiede in den

Veränderungen der Kapillarfläche in Abhängigkeit von den untersuchten Trainingsarten festgestellt werden. Es ist zu beobachten, daß sich die Zuwachsraten der mittleren Kapillarfläche, die nach verschiedenen Trainingsarten berechnet worden sind, relativ stark unterscheiden. Die Zuwachsrate der mittleren Kapillarfläche war bei $V_{1a1,5}$ größer im Vergleich zu den anderen Trainingsarten.

Es ist zu sagen, daß die Versuchstiere ihre Kapillarfläche bei den Trainingsarten von $V_{1a1,5}$ und $V_{1a2,5}$ stärker vergrößerten, als bei der Trainingsart $V_{1a4,0}$, bei der die Veränderungen der Kapillarfläche geringfügig waren.

Die Rückbildungsraten der mittleren Kapillarfläche waren in Abhängigkeit von den Ruhephasen, die nach den verschiedenen Trainingsarten erfolgten, unterschiedlich. Die stärkste Abnahme der mittleren Kapillarfläche trat bei der Ruhephase nach der Trainingsart $V_{1a1,5}$ auf, gefolgt von der Ruhephase nach der Trainingsart $V_{1a4,0}$ mit einem Wert von $-2,88 \mu\text{m}^2$. Die mittlere Differenz der mittleren Kapillarfläche lag während der Ruhephase nach der Trainingsart $V_{1a2,5}$ bei durchschnittlich $2,65 \mu\text{m}^2$.

Die durchschnittliche Zuwachsrate der Myofibrillenquerschnittsfläche lag nach der Trainingsart $V_{1a1,5}$ bei $0,35 \mu\text{m}^2$, nach der Trainingsart von $V_{1a2,5}$ bei $0,16 \mu\text{m}^2$.

Im Einklang mit den Ergebnissen, die an den Mitochondrien und Kapillaren festgestellt wurden, fand man nach sechswöchiger Ruheperiode, die nach der Trainingsart $V_{1a1,5}$ durchgeführt wurde, die stärkste Rückbildung der mittleren Myofibrillenquerschnittsfläche im Vergleich zu den anderen Ruhephasen.

Die Trainingsarten $V_{1a1,5}$ und $V_{1a2,5}$ sind für eine Steigerung der Ausdauerleistung besser als die Trainingsart $V_{1a4,0}$.

Die morphologischen Ergebnisse sind doch nicht so eindeutig, daß sie ohne morphometrische Ergebnisse erfaßt werden können. Nur mit einer morphometrischen Untersuchung kann eine deutliche Differenzierung zwischen den einzelnen Trainingsarten vorgenommen werden.

Zusammenfassung der wiederholten Biopsieentnahme an gleicher Muskellokalisierung:

In einem zweiten Teil der Dissertation sollte geklärt werden, ob die wiederholte Entnahme von Muskelbiopsien an der gleichen Stelle Einfluß auf die Gewebemorphologie hat. Die Untersuchungen wurden an sieben englischen

Vollblutpferden durchgeführt. Die Biopsieentnahme erfolgte nach BERGSTRÖM (1962, 1975).

Es standen uns 52 Muskelbiopsieproben aus der linken und rechten Seite des *M. glutaeus medius* zur Verfügung. Die Biopsien wurden jeweils (im Juli) aus der linken und (im August) rechten Seite des *M. glutaeus medius* entnommen. Insgesamt wurden in der Nähe der Entnahmestelle vier Biopsien in einen zeitlichen Abstand zur vorherigen Biopsieentnahme von je 8 Wochen gewonnen. Zwischen den Stichkanälen betrug der Abstand jeweils 2 cm.

Bei den licht- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten sich durch die Entnahme bedingte Wundheilung an der Muskulatur. Sie war jedoch nicht stark ausgeprägt.

Weiterhin konnten bei unseren Untersuchungen nur in 14 von 52 Lokalisationen pathomorphologische, entzündliche Alterationen zur Darstellung gebracht werden.

Bei dem Teil der Tiere wurde Granulationsgewebe mit Kapillaren, Fibroblasten, Makrophagen und einzelne degenerierte Muskelzellen beobachtet. Die angrenzenden Muskelfasern zeigten weitgehend ein normales, morphologisches Bild, wobei vereinzelt geringgradige Druckatrophien nachweisbar waren.

Neun Proben ließen ein Narbengewebe erkennen, das vorwiegend aus Kollagenfibrillen bestand und wenige Zellen enthielt.

Nach unseren Untersuchungen kann gesagt werden, daß an gleicher Lokalisation eine Muskelprobe entnommen werden kann. Nur in 25 % der Biopsien war eine geringgradige entzündliche Reaktion im Bioplat nachweisbar. Werden diese Biopsien für biochemische Untersuchungen verwandt, so muß bei abweichenden Ergebnissen daran gedacht werden, daß zufällig Narbengewebe einer vorherigen Biopsie untersucht worden sein kann.

6. SUMMARY

Training abundant morphological findings in skeletal muscles of the horse

The present study focuses on the adaptative response and the effects of training induced ultrastructural changes in skeletal muscles depending on different forms of training in Thoroughbred horses (Haflinger). By the use of morphological and morphometrical investigations the study tries to demonstrate optimal training schedules to increase the equine endurance capability.

Six two-year old Haflinger horses were used in this study. None of them was used in tests before. The test period was composed of three alternating training and three periods of rest. The periods of training and following rests lasted 6 weeks. The horses were exposed to the 3 different forms of exercises each second day during the six weeks training period. The duration of each training unit lasted 45 minutes for the exercise $V_{La 1.5}$ and $V_{La 2.5}$ and 25 minutes for the $V_{La 4.0}$ training mode. The training modes were of three different intensities $V_{La 1.5} / V_{La 2.5} / V_{La 4.0}$. Where $V_{La(x)}$ meant a specific speed, that induced a blood lactate concentration of 1.5 / 2.5 respectively 4.0 mmol/l. The sequence of different training forms of each horse was randomized, in order to reduce the effect of time span of the year and growth factors on the results as well as the effect of one training form on the other.

The biopsies for ultrastructural morphometry of the M. gluteus medius were obtained before and after each period of training and six weeks after the last period of training at a depth of six centimeters. Semithin sections of these muscle samples, stained with toluidin blue, were examined under the light microscope. The light microscopic examination was used to choose and localise areas of the samples containing cross-sectional areas, from which ultra-thin slices prepared for further electron microscopic examination.

Five electron microscopic pictures of each muscle localization were taken with a 6300 X objective lens for the determination of the capillaries and 10 000 X enlargement for the assessment of the mitochondria and the myofibrils. Five different muscle fibres were chosen for each electron microscopic picture. The morphometric assessments were done with a semi automatic frame measuring instrument LEITZ ASM 68K.

Interfibrillar mitochondria and capillaries, as well as myofibrils in each EM- section were counted, their surface areas, minimal and maximal diameters were estimated.

The mean difference of the parameters depending on the training forms and the following rest periods for every horse have been calculated to compare the effects of the three different training forms and of the following rest periods on skeletal muscle. Analysis of the parameters of the biopsies from horses demonstrated: Training abundant effects of gluteal muscle tissue resulting from an endurance training program with a nine month duration. A great inter-individual variation in the total area and the number of the mitochondria and in the mean area of the capillary was seen in the horses before the beginning of the training program. This variability reflects the different individual endurance capacity of haflinger horses. In opposite the measured individual variability of the mean myofibrillar area was relatively low. The mean average of the mean myofibrillar area of all tested animals was bei $0,71 \mu\text{m}^2$, the total mitochondrial area varied between $8,56 \mu\text{m}^2$ and $12,3 \mu\text{m}^2$ before the training program measured and between $13,14 \mu\text{m}^2$ and $15,94 \mu\text{m}^2$ after the training program. The mean kapillary area before the training program varied between $12,39 \mu\text{m}^2$ and $20,58 \mu\text{m}^2$, after the program between $17,09 \mu\text{m}^2$ and $37,97 \mu\text{m}^2$.

The increase of the total mitochondria area was due to an increase of mitochondrial numbers and or to mitochondrial size, depending on the mode of training. Concerning the mitochondrial measurements, $V_{L_{a1,5}}$ and $V_{L_{a2,5}}$ over 45 minutes were the most efficient forms of training. Here the mean increase of mitochondrial area was nearly identical. In $V_{L_{a1,5}}$ the increase of the mean mitochondrial area, whereas in $V_{L_{a2,5}}$ and $V_{L_{a4,0}}$ an increase as well of mean mitochondrial area and mean mitochondrial number caused an increase of the total mitochondrial area. In $V_{L_{a2,5}}$ the increase of the mitochondrial number was highest, followed by $V_{L_{a4,0}}$. The mitochondrial increase is of importance of the oxydative capacity, in $V_{L_{a1,5}}$ and $V_{L_{a2,5}}$ horses improved their endurance capacity more than in $V_{L_{a4,0}}$. The morphometric investigations revealed an training abundant increase of the capillary luminal and interindividual differences depending on the mode of training. The increase of the mean capillary area varied depending on the mode of training. Compared to $V_{L_{a4,0}}$, in $V_{L_{a1,5}}$ and $V_{L_{a2,5}}$ a higher increase was measured. The highest decrease was measured during resp. after phases of rest after odc of training of

$V_{L_{a1,5}}$, followed by $V_{L_{a0,0}}$ ($-2,88 \mu\text{m}^2$). The mean difference of the mean capillary area during the rest phase after $V_{L_{a2,5}}$ was $2,65 \mu\text{m}^2$. The mean increase of the myofibrillar area after $V_{L_{a1,5}}$ was $0,35 \mu\text{m}^2$, after $V_{L_{a2,5}}$ $0,16 \mu\text{m}^2$.

Similar to the results of mitochondria and capillaries, after six weeks of rest after $V_{L_{a1,5}}$ the highest decrease of the mean myofibrillar area was measured. This means, that the modes $V_{L_{a1,5}}$ and $V_{L_{a2,5}}$ are better for the increase of the endurance capacity than $V_{L_{a0,0}}$. By morphometric investigations a differentiation of training abundant effects on the muscle parameters are possible.

Effect of repeated biopsying on muscle tissue in horses:

In a second part of this work, the effects of repeated biopsying on the morphology of muscle tissues was investigated. The investigations were done on seven English thoroughbred horses. The technique of biopsying was the technique of BERGSTRÖM (1962, 1975).

52 muscle biopsies from the left and right *M. gluteus medius* were investigated.

Samples from the left were taken in July, samples from the right were taken in August from the *M. gluteus medius*. Totally four samples were taken of one localization were taken after each eight weeks. The distance between the samples was two centimeters.

The light and transmission electron microscopical investigations showed a minimal to moderate wound healing due to the sampling method. Fourteen of 52 localisations investigated revealed inflammatory alterations.

In some cases granulation tissue with capillaries, fibroblasts, macrophages and few degenerated muscle cells were seen. The surrounding muscle fibres were normal. In cases a minimal pressure atrophy was visible. Most of the biopsies showed a scar tissue, mainly composed of collagen fibres few cells.

Our investigations show, that a repeated biopsy sampling in nearly identical localisation of the *M. gluteus medius* is possible. The only 25 % of the biopsies a minimal inflammatory reaction was seen. The use of these biopsies for biochemical investigations should take this into account.