



universität
wien

DISSERTATION / DOCTORAL THESIS

Titel der Dissertation / Title of the Doctoral Thesis

Investigation of the human muscle metabolism
via 7Tesla Magnetic resonance spectroscopy

verfasst von / submitted by

Mag.rer.nat. Thomas-Hochwartner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

Wien, 2017, Vienna 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on the student rec-
ord sheet:

A 091 481

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt /
field of study as it appears on the student record sheet:

Dr.-Studium d. Naturwissenschaften
Sportwissenschaft

Betreut von / Supervisor:

Emer. o. Univ.-Prof. Dr. Norbert Bachl

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Harald Tschan

Vorwort:

Die hier vorliegende Dissertation versteht sich als Sammlung von Publikationen, und entspricht damit den Publikationsgrundlagen einer kumulativen Dissertation.

Aufgrund der Veröffentlichungen der Artikel dieser kumulativen Dissertation in verschiedenen Zeitschriften, finden sich die veröffentlichten Artikel in englischer Sprache wieder.

Danksagung:

Dem Institut für Sportwissenschaften der Universität Wien, Insbesondere Herrn Prof. Norbert Bachl und Herrn Prof. Harald Tschan für Ihr Wissen, Ihre Ratsschläge und hilfreichen Tipps, Mag. Christoph Triska und dem Team des ÖISM für die Durchführung und Hilfestellung bei den Spiroergometrien.

Dem Hochfeld MR Zentrum Wien am Standort Holzhaus auf dem Gelände des AKH, insbesondere Prof. Martin Krssak, Radka Klepochova, und Ladislav Valkovic durch die ich Zugang zum 7 Tesla und den damit verbundenen Technologien hatte.

Meinen Eltern, ohne die ich nicht die Chance gehabt hätte alles zu erreichen was ich möchte.

Meiner Frau Marie-Therese

Für Niki, Nini & Ani - Meine Geschwister im Geiste...

Ich bestätige, dass ich die Dissertation selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfe bedient habe, sowie dass ich diese Dissertation bisher weder im In- noch im Ausland in irgendeiner Form als Prüfungsarbeit vorgelegt habe. Weiteres bestätige ich, die „Formvorschriften für wissenschaftliche Arbeiten“ (veröffentlicht im Mitteilungsblatt der Universität Wien am 24.09.2015, 39 Stück Nr. 260) eingehalten zu haben.

Inhalt

1. Einleitung	4
2. Hintergrund	6
2.1 Hintergrund der verwendeten Magnetresonanzmessverfahren.....	6
2.2 Bestimmung des Acetylcarnetin, Carnosin und der Lipide via ^1H MRS	7
2.3 Untersuchungen der energiereichen Metaboliten ATP & PCr in Bewegung via ^{31}P MRS.....	8
3. Hintergrund muskelphysiologische Mechanismen.....	10
3.1 Oxidative Phosphorylierung und Kohlenhydratstoffwechsel.....	11
3.2 Acetylcarnetin und Fettstoffwechsel	14
3.3 Metabolische Flexibilität	17
3.4 Weitere Metaboliten (Carnosine).....	19
4. Material und Methodik.....	20
4.1 Datenverarbeitung, Berechnungen und statistische Auswertung.....	22
4.3 Spiroergometrie.....	24
5. Beschreibungen der einzelnen Studien	24
5.1 Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight to obese sedentary	24
subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content.....	24
5.2 ^1H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at	
rest at 7T.....	38
5.3 Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal Muscles by ^1H MRS at	
7 T	42
5.4 Non-invasive proton and phosphorous magnetic resonance spectroscopy suggests	
multifactorial differences in the skeletal muscle energy metabolism between triathletes and	
normally active volunteers.....	52
6. Ergebnisse und Diskussion	71
7. Literaturverzeichnis	77
8. Abbildungsverzeichnis	83

1. Einleitung

Die nachfolgenden Arbeiten und Veröffentlichungen widmen sich gänzlich den „In Vivo“ Untersuchungsmethoden zum menschlichen Energiestoffwechsels unter MR Kontrolle.

In der hier vorliegenden kumulativen Zusammenstellung finden sich drei Studien die gemeinsam mit dem Exzellenzzentrum für Hochfeld-MR der Universitätsklinik Wien für Radiologie und Nuklearmedizin und dem Institut für Sportwissenschaft der Universität Wien durchgeführt wurden.

Der Fokus aller Untersuchungen widmete sich der Erforschung und Untersuchung des menschlichen Energiestoffwechsels.

Untersuchungen insbesondere der menschlichen Muskulatur durch die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine der am schnellsten vorrückenden Techniken im Bereich der medizinischen Bildgebung und hat sich zu einer interessanten nicht invasiven Alternative zu invasiven Methoden wie z.B. Muskelbiopsien entwickelt.

Die Techniken der Magnetresonanzspektroskopie (MRSI) oder Magnetresonanzspektroskopie (MRS) ermöglicht die Quantifizierung verschiedener Metaboliten im menschlichen Körper und in den nachfolgenden Studien insbesondere der Skelettmuskulatur. Untersuchungen durch ein MRT bzw. MRS sind dahingehend einzigartige Werkzeuge für in vivo Untersuchungen der verschiedensten Eigenschaften menschlicher Organe und Gewebe ohne das Risiko ionisierender Strahlung.

Mittlerweile ist die Datenqualität seit der ersten klinischen Anwendung erheblich gesteigert worden. Datenqualität bedeutet in diesem Zusammenhang eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Messungen durch die Erhöhung der Magnetfeldstärke und dadurch eine Effizienzsteigerung der Signaldetektion durch verbesserte HF-Spulen und die Entwicklung eines effizienteren Sequenzpulses.

Speziell die Bildgebung bei 7 Tesla erlauben eine hohe Erfassungsempfindlichkeit und eine hohe räumliche Auflösung, verbunden mit einer höheren Quantifizierungsgenauigkeit der erfassten metabolischen Bilder, weshalb ein breites Anwendungsspektrum mit hoher Auflösung möglich wird.

Eine der vielversprechendsten Anwendungen eines 7 T MRS ist die Erforschung des Muskelenergie-Metabolismus einschließlich Phosphor (^{31}P) -MRS und Proton (^1H) -MRS, welche in den nachfolgenden Kapiteln genauer erklärt und beschrieben wird.

Der Energiestoffwechsel der energiereichen Substrate hat insbesondere in den Sportwissenschaften eine grundlegende und fast selbständige Fachrichtung geschaffen und widmet sich seit geraumer Zeit nicht nur der Erforschung und Quantifizierungen zur sportlichen Leistungssteigerung, sondern insbesondere den Wirkmechanismen auf gesundheitsrelevanten Anpassungsmechanismen zur Prävention der sogenannten Zivilisationskrankheiten. Gerade bei den Entstehungsmechanismen der Zivilisationskrankheiten, welche durch Bewegungsmangel und Übergewicht zu Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Typ II Diabetes führen - ist letztendlich fast immer - eine basale Störung in der Funktionskette des Energiestoffwechsels zu finden.

Dabei teilen sich die Untersuchungen in zwei Teilgebiete der Energiebereitstellung auf. Einerseits wurde die mitochondriale Kapazität und die Re-Syntheserate von ATP zu Kreatinphosphat untersucht, andererseits die Rolle des Acetylcarnetin, welches bei der Verstoffwechselung von Fetten in der Muskelzelle eine entscheidende Rolle spielt.

Die nachfolgenden Arbeiten sind unterteilt in mehrere Bereiche, und werden nachfolgend mit den dazugehörigen Artikeln kurz vorgestellt.¹

1. Untersuchungen des ATP / Kreatin Phosphat Re-Synthese Zyklus im Vergleich zwischen übergewichtigen und normalgewichtigen Personen unter Berücksichtigung der mitochondrialen Kapazität.

Studie I: publiziert 2016 in Nature Scientific Reports

Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. Scientific Reports. Valkovič, L., Chmelík, M., Ukropcová, B., Heckmann, T., Bogner, W., Frollo, Tschan, H., Krebs, M., Bachl N., Ukropec, J., Trattinig, S. & Krššák, M. (2016).

2. Die Möglichkeit der Quantifizierung von Acetylcarnetin in der Muskelzelle durch angepasste MR Untersuchungsmethoden, und die Unterschiede und Reaktion des Acetylcarnetin auf physische Belastung im M. vastus lateralis und M. soleus.

Studie II: publiziert am ISMRM Annual Meeting in Singapore 2016

1H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7T. Tušková, R., Valkovič, L., Gajdošík, M., Heckmann, T., N.Bachl, Tschan, H., Krššák, M. (2016). ISMRM Annual Meeting & Exhibition (S. Abstract No. 4521). Singapore: ISMRM.ORG.

Studie IIa: publiziert im Journal of Investigative Radiology 2017

Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal Muscles by 1H MRS at 7 T. ***Investigative Radiology:*** Klepochová, R., Valkovic, L., Gajdošík, M., Hochwartner, T., Tschan, H., Krebs, M., Krššák M. (2017).

3. Messungen der ATP / PCr Re-Syntheserate (unter Belastung) und das Verhalten des Acetylcarnetinspiegels, der Lipide und des Carnosinspiegels im M. vastus lateralis bei Menschen mit normalem Bewegungsverhalten im Vergleich zu Ausdauertrainierten (Triathleten)

Studie III: noch nicht publiziert - Einreichung geplant im Juni 2017

Non-invasive proton and phosphorous magnetic resonance spectroscopy suggests multifactorial differences in the skeletal muscle energy metabolism between triathletes and normally active volunteers Klepochová, R., Hochwartner, T., Bachl, N., Tschan, H., Triska, C., Trattinig, S., Valkovič, L., Krššák, M. (2017)

¹ Durch Eheschließung änderten sich die Namen Heckmann zu Hochwartner / und Tuskova zu Klepochova

2. Hintergrund

2.1 Hintergrund der verwendeten Magnetresonanzmessverfahren

Während bei niedrigeren Magnetfeldstärken (1,5 -3 T) insbesondere MRI und MRS durch mehrere methodische Einschränkungen darunter geringe Ortsauflösung, Messgenauigkeit, lange Messzeiten und geringe Spezifität lagen, bietet des 7T MRS eine spezifische Untersuchung der einzelnen Muskeln (Bogner, et al., 2011; Meyerspeer, et al., 2011), eine verbesserte Trennung von intramyozellulären / extrazellulären Lipiden (Ren, Sherry, & Malloy, 2010), eine verbesserte Erfassungsgeschwindigkeit (Bogner, et al., 2011) und eine signifikant verbesserte Messgenauigkeit mehrerer physiologisch relevanter Parameter (Bogner, et al., 2009). Vor diesem Hintergrund ist es möglich umfassendere Untersuchung des menschlichen Muskelstoffwechsels in reduzierten Messzeiten durchzuführen.

Die niedrigeren Magnetfeldstärken waren aufgrund ihrer geringen räumlichen Auflösung und Messgenauigkeit, ganz abgesehen von den sehr langen Messzeiten nur eingeschränkt für unsere Idee der speziellen Muskeluntersuchung geeignet.

Die neuen methodischen Entwicklungen in 7T MRS ermöglichen eine spezifische Untersuchung der einzelnen Muskeln, eine verbesserte Trennung von intramyozellulären / extrazellulären Lipiden (Ren, Sherry, & Malloy, 2010), eine verbesserte Erfassungsgeschwindigkeit (Bogner, et al., 2011) und eine signifikant verbesserte Messgenauigkeit mehrerer physiologisch relevanter Parameter (Meyerspeer, et al., 2011)

Dadurch wurde eine umfassendere Untersuchung des menschlichen Muskelstoffwechsels in reduzierten Messzeiten ermöglicht. Zwar lag das Hauptaugenmerk auf der klinischen Untersuchung durch den 7T auf klinisch relevanten Protokollen zur Beurteilung von neuromuskulären Erkrankungen und diabetesbedingten Muskelveränderungen, (Valkovič, et al., 2016) eignet sich aber selbstverständlich auch zur Untersuchung und zum Vergleich trainierter vs. untrainierter Muskulatur. Somit war eine der ersten Untersuchungen im Bereich der Unterschiede zwischen übergewichtigen Prä-Diabetes Patienten und durchschnittlich trainierten Personen angesiedelt.

Während lange Zeit bei Computertomographien ausschließlich statische Messungen durchgeführt werden konnten, und eine ruhige Positionierung des Probanden erforderlich war konnten nicht alle physiologischen Parameter erfasst werden. Insbesondere dann, wenn das Ziel der Untersuchung die Reaktion des Organismus auf physischen Stress darstellen sollte.

Die Firma Ergospect (Ergospect GmbH, Innsbruck, Österreich) entwickelt Diagnosepedale welche aufgrund ihrer Bauform und Materialeigenschaften mit dem Probanden innerhalb der MR-Bohrung genutzt werden können. Somit ist es möglich eine körperliche Belastung zu erzeugen während parallel dazu Messungen durchgeführt werden konnten.

Die Basis eines Diagnosepedals ist die Steuereinheit, die die Fernbedienung der Geräte ermöglicht. Die Ansteuerung erfolgt über Glasfaserkabel und der Widerstand wird pneumatisch erzeugt.

Dadurch eröffnen sich Untersuchungsmethoden welche den Energie-Metabolismus unter Belastung, in-vivo, erfassen können. Für die, dieser Dissertation zugrundeliegenden Untersuchungen waren folgende Eigenschaften Erfolg versprechend:

- metabolische Untersuchungen via ^{31}P MRS, ^{13}C MR zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion, anaerobe und aerobe Kapazität und des Glykogenstoffwechsels.
- Lipid-Metabolismus und Deoxymyoglobin: ^1H -MRS, Verfolgung von intra- und extra-myozellulären Lipiden.

2.2 Bestimmung des Acetylcarnetin, Carnosin und der Lipide via ^1H MRS

Die Untersuchung findet in Rückenlage statt, wobei der linke Oberschenkel / bzw. Wade in einer 28 Kanal Spule liegt (QED, Mayfield Village, OH, USA). Zuerst werden T1-gewichtete Mehrschichtbilder erfasst und für die VOI-Positionierung (Volume of Interest) verwendet (Abb.1). Die räumliche Selektion innerhalb des M. vastus lateralis bzw. M. soleus wurde mit einer STEAM-Lokalisierungssequenz erreicht und der VOI (40 x 35 x 15 mm³) dabei sorgfältig in den fettfreien Anteil der (VL/SOL) Muskel platziert.



Abbildung 1: Axial Aufnahmen der Voxelplatzierung im m. vastus lateralis und m. Soleus, (Grafik aus eigenem Bildmaterial der Messungen erstellt)

Ein lokalisiertes Shimming (Feinjustierung des Voxels im Messbereich des Muskels) erfolgte nach der automatischen Felddiagramm-Erfassung auf der Basis einer Gradienten-rückgewonnenen, doppelten Echofeldkartenerfassung (GRE-SHIM, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) manuell auf das dem VOI entsprechende Anpassungsvolumen. Dabei wird das Messspektrum individuell bestimmt und der Bereich der maximalen Amplituden des Frequenzbandes gesucht.

Die endgültige Linienbreite des Wassers lag im Größenbereich von 28-38 Hz. Acetylcarnitine wurde mit folgenden Parametern gemessen: TR / TE = 2000/350 ms; Spektrale Bandbreite = 3 kHz; Anzahl der Mittel = 128; Delta-Frequenz = -2,5 ppm relativ zur Wasserresonanz; Anzahl der Präparations-Scans = 4, wie beschrieben in (Klepočová, et al., 2017).

Carnosin wurde mit folgenden Parametern gemessen: TR / TE = 9000/20 ms; Spektrale Bandbreite = 3 kHz; Anzahl der Mittel = 1; Messungen = 64, Delta-Frequenz = 2,8 ppm bezogen auf Wasserresonanz; Anzahl der Präparations-Scans = 0, wie beschrieben in (Just-Kukurová, 2016).

Die Lipide wurden mit folgenden Parametern gemessen: TR / TE = 6000/20 ms bzw. 2000/350; Spektrale Bandbreite = 3 kHz; Anzahl der Mittel = 1 bzw. 128; Messungen = 16, bzw. 128 Delta-Frequenz = -3,4 ppm bzw. -2,5 bezogen auf Wasserresonanz; Anzahl der Vorbereitungs-Scans = 4. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Wassersignal separat mit TR gemessen wie die TRs der gemessenen Metaboliten und andere Parameter waren: TE = 20 ms; Anzahl der Mittel = 1; Delta-Frequenz = 0 ppm. (Klepočová, et al., 2017)

Um die Reliabilität und Validität zu gewährleisten wurden alle Messungen in den Morgenstunden durchgeführt und Messungen für die Beurteilung der Relaxationszeiten wurden am Nachmittag durchgeführt (zwei bis drei Stunden nach dem Mittagessen), da die Serums-Carnitin- und Acetylcarnitinkonzentrationen sich im Laufe des Tages als Reaktion auf plasmafettige Fettsäurekonzentrationen signifikant verändern (De Palo, Gatti, Crivellaro, & et.al., 1987). Auch die Untersuchungen von (Groop, Bonadonna, & Del Prato, 1990) und (Bahr, Hostmark, & Newsholme, 1991) zeigten, dass die freien Fettsäurekonzentrationen im nüchternen Zustand und akut nach dem Training erhöht bzw. nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit hingegen verringert sind. Ebenso wurde darauf geachtet, dass am Vortag der Untersuchungen keine exzessive körperliche Aktivität stattgefunden hat, und dass das Ernährungsverhalten keinen Schwankungen unterlag, bzw. keine Supplementation verschiedener Nahrungsergänzungsmittel erfolgte.

2.3 Untersuchungen der energiereichen Metaboliten ATP & PCr in Bewegung via 31P MRS

Zur Bestimmung der Konzentrationen der energiereichen Metaboliten (γ -ATP und Pi) befindet sich der Proband in Bauchlage, wobei der linke Unterschenkel im Ergometer (Quadspect, Ergospect GmbH Innsbruck, Österreich) befestigt wurde, um die Belastungen für den Oberschenkel via Knieextension zu erreichen (Abb.2). Vor Beginn der Messungen wurde das individuelle Kraftmaximum bestimmt, um für den Zeitraum der Belastung (6min) ein Äquivalent von 30% der max. Kraft zu erreichen, um den Muskel über die gesamte Dauer submaximal bis maximal zu belasten.



Abbildung 2: Verwendung Quadspect Ergometer der FA Ergospect in Bauchlage zur Messungen 31P MRS, (Bildmaterial mit Genehmigung der Fa Ergospect).

Die Oberschenkelmuskulatur des linken Beines wurde über der Oberflächenspule positioniert, so dass wie bei den Messungen des Acetylcarnetin der VOI im Oberschenkelmuskel individuell festgelegt werden konnte. Die Freiwilligen wurden durch ein Audiosignal zur Zeit der Kontraktionsentspannungsperioden (2sec.) instruiert, so dass die Spektren immer im entspannten Zustand des Muskels erhoben werden konnten.

Die HF-Leistung wurde für das Maximum des lokalisierten PCr-Signals eingestellt, indem die HF-Sendespannung variiert, welches durch manuelles Shimmen (vgl. Kapitel 2.1) erreicht wurde. Zur Bestimmung der Konzentrationen der energiereichen Metaboliten wurden die statischen 31P-MR-Spektren ohne Sättigung ($FA = 90^\circ$, $TE^* = 0,4 \text{ ms}$, $TR = 15 \text{ s}$, $NA = 8$) in Ruhe gemessen und die Offsets von γ -ATP und Pi verzeichnet, diese dienen damit als Baseline von ATP und Pi. Zur Bestimmung von $T1_{app}$ wurden zwei unterschiedliche Kontrollexperimentmessungen durchgeführt (DRESS-lokalisierte bzw. FAST-Messungen). Das erste mit einer nominellen FA von 52° (β) und $NA = 8$ und das zweite mit einer nominellen FA von 15° (α) und $NA = 24$. Bei beide Kontrollexperimentmessungen wurden mit $TR = 2 \text{ s}$, $TE = 0,4 \text{ ms}$, und vier Präparationsuntersuchungen in den nachfolgenden drei Schritten durchgeführt (Valkovič, et al., 2016):

1. Messungen der γ -ATP-Sättigung (Frequenzoffset von -2,48 ppm),
2. Messungen durch ein Kontrollexperiment für die PCr-zu-ATP-Wechselrate bei einer um PCr bei $\sim 2,48 \text{ ppm}$ gespiegelten Downfield-Frequenz,
3. Messungen durch das zweite Kontrollexperiment für die Pi-ATP-Wechselrate bei einer um die Pi-Resonanz gespiegelten Downfield-Frequenz bei $\sim 12,52 \text{ ppm}$

Die Messungen während der Belastung wurden unter Verwendung des gleichen Protokolls für DRESS-lokalisierte FAST-Messungen, wie oben beschrieben, durchgeführt. Zuerst wurde das komplette FAST-Experiment in Ruhe durchgeführt, und zweitens wurde das FAST-Experiment mit den gleichen Parametern während des Trainings durchgeführt. Die FAST Messungen während der Belastung erfolgten zwei min. nach dem Beginn der Belastung da sich in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hat das erst dann ein stationärer Zustand der PCr Erschöpfung erreicht wird. (Valkovič & Chmelík, 2013) (Valkovič L. , et al., 2016). Die Gesamtbelastung liegt daher bei ~ 6 Minuten, gefolgt von sechs Minuten Erholungsmessung.

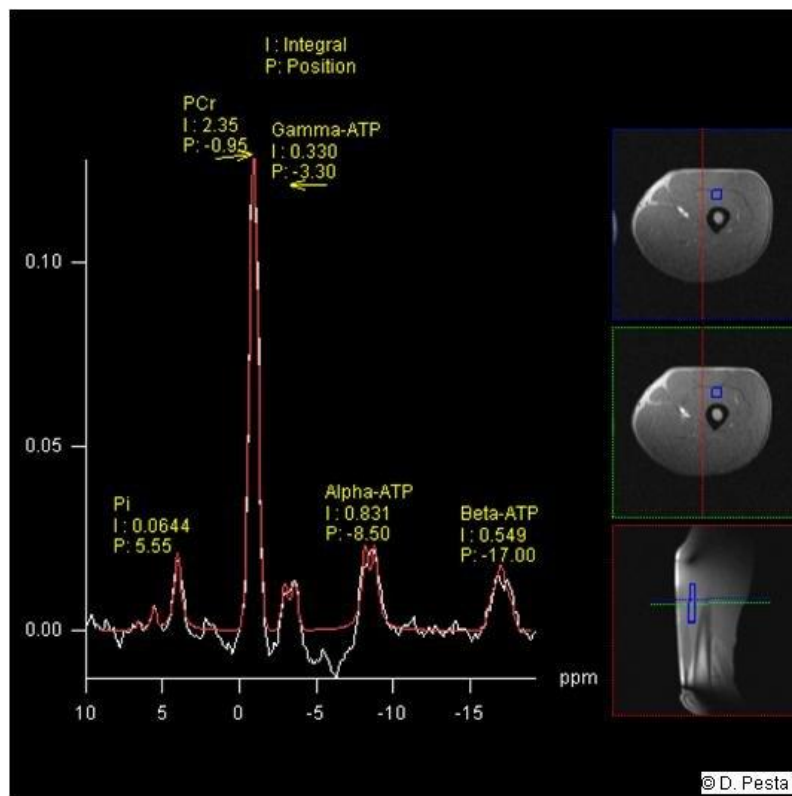


Abbildung 3: Spektrum der energiereichen Metaboliten ATP PCr und Pi (Quelle: Ergospect) und Platzierung des Voxels im *M. vastus lateralis*

3. Hintergrund muskelphysiologische Mechanismen

In jeder Zelle des menschlichen Körpers finden wir mehrere tausend Mitochondrien (Jornayvaz & Shulman, 2010). Das Mitochondrium ist ein Zellorganell, das aus Substraten wie Kohlenhydraten und Fetten, Energie in Form von ATP produziert (Munk, Abröhl, Kurt, Langer, & Nethe-Jaenchen, 2008). Die mitochondriale Dichte ist also dort am höchsten, wo die größten ATP-Umsätze stattfinden (Pagel-Langenickel, 2008). Vor diesem Hintergrund erfolgten die Messungen und Untersuchungen in allen drei Studien am M. Quadrizeps (*M. vastus medialis*), bzw. zum Vergleich am *M. soleus*.

Grundsätzlich nutzt jede Zelle einfach gesprochen die zwei Substrate Kohlenhydrate und Fette. Dabei erfahren beide jedoch unterschiedliche biochemische Abbaureaktionen (Munk, Abröhl, Kurt, Langer, & Nethe-Jaenchen, 2008). Durch die Messmethoden der ¹H MRS und ³¹P MRS via 7 Tesla lassen sich diese Abbaureaktionen in Vivo beobachten und quantifizieren (Bogner, et al., 2011). Letztendlich jedoch basieren beide auf einem biochemischen Nenner dem Acetyl-CoA.

Acetyl-CoA ist sowohl das Endprodukt des Kohlenhydrat-, als auch des Fettstoffwechsels – wobei letzteres auch als β -Oxidation bezeichnet wird (Dellomonaco, Clomburg, Miller, & Gonzalez, 2011).

3.1 Oxidative Phosphorylierung und Kohlenhydratstoffwechsel

Betrachtet man den basalen Faktor des Energiestoffwechsels, die mitochondriale Funktion der Muskelzelle, so bemerkt man, dass die oxidative Phosphorylierung und Glykolyse eine wichtige Quelle der zellulären Energie darstellen. Die ATP Synthese welche durch die oxidative Phosphorylierung innerhalb des Mitochondriums stattfindet, und folglich entscheidend für die Organfunktion verantwortlich ist, stellt die Grundlage einer funktionalen Muskelphysiologie dar. Betrachtet man die Entstehungsgeschichten verschiedener degenerative Erkrankungen wie z.B. Typ-2-Diabetes, Dyslipidämie und Sarkopenie so liegt diesen meist eine mitochondriale Dysfunktion zugrunde (McInnes, 2013), und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung unserer modernen Zivilisationskrankheiten.

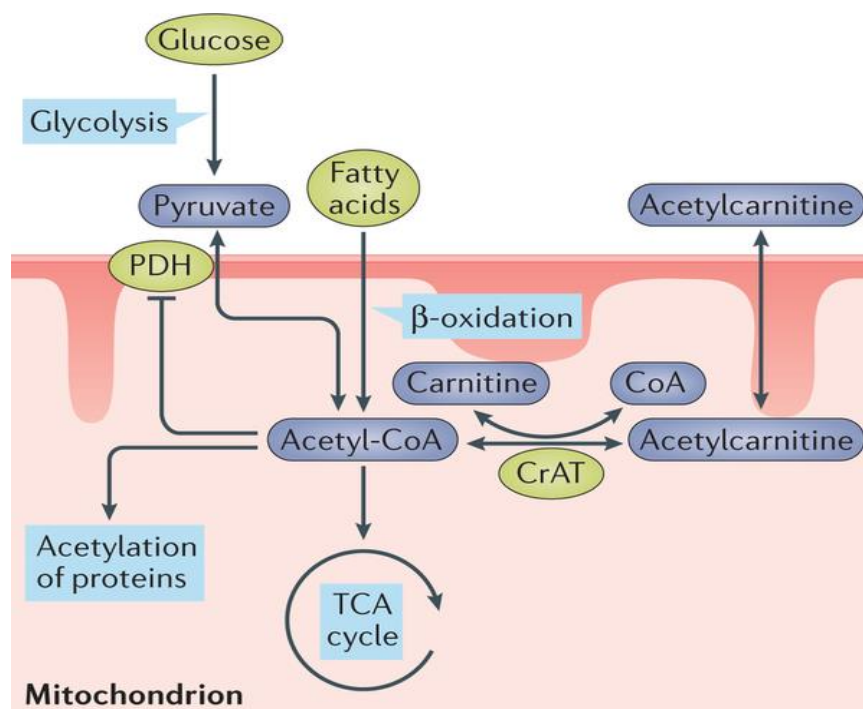


Abbildung 4: Die Rolle des Acetyl-CoA in Citratzyklus zur Energiegewinnung aus KH Und Fetten (Quelle: Nature Reviews/ Endocrinology)

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass beide Substrate (KH & Fette) zwar unterschiedlichen Abbaureaktionen folgen, aber letztendlich zur weiteren Energiegewinnung das Acetyl-CoA in den Citrat-

Zyklus eingeht (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Um im weiteren Verlauf die Beschreibungen der Verstoffwechselung von Fettsäuren und Kohlenhydraten, und deren Untersuchung in unseren Studien als Gesamteindruck zu erkennen soll hier kurz die Randle-Hypothese erklärt werden (Randle & et.al., 1963).

Die Wirkmechanismen der freien Fettsäuren auf den menschlichen Glukosestoffwechsel wurden 1963 von Philipp Randle beschrieben. In seinem Glukose-Fettsäuren-Zyklus (Randle-Zyklus) beschreibt er, dass ein erhöhter Spiegel freier Fettsäuren die Glukoseoxidation im Mitochondrium hemmt. Gleichzeitig wird jedoch die β -Oxidation der freien Fettsäuren durch eben diese erhöhte Glukoseoxidation bei hohem Glukosespiegel verringert (Randle & et.al., 1963). Unter anderem wird diese Tatsache heute als eine der Entstehungsmöglichkeiten für Typ II Diabetes allgemein anerkannt.

Zwar weiß man heute, dass die von Randle aufgestellte Hypothese in ihren Grundzügen stimmt, die tatsächliche Regulierung der Kohlenhydrate jedoch wesentlich komplexer ist.

Die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydrat- und Fettsäureoxidation ist abhängig von der metabolischen Umgebung des Intrazellulär- aber, und auch des Extrazellulär- raumes (Hargreaves, 2012). Die Verfügbarkeit von Substraten (sowohl innerhalb als auch außerhalb des Muskels) aber vor allem die durch Trainingsintensität und -dauer beeinflusste Umgebung spielt eine erhebliche Rolle (Robinson, et al., 2014).

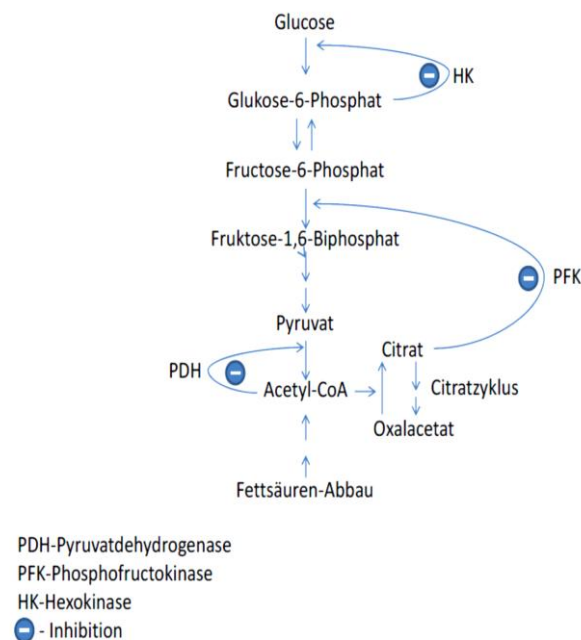


Abbildung 5: Inhibition und kompetitive Hemmung der Phosphofructokinase der Pyruvatdehydrogenase und der Hexokinase (Phüler, Regitz, Schmid, & Bornscheuer, 1999)

Durch vermehrte β -Oxydation der freien Fettsäuren wird erheblich mehr Acetyl-CoA produziert, welches in den Citratzyklus eingeschleust werden muss. Dadurch steigt der Citratspiegel und bewirkt dadurch eine Hemmung der Phosphofruktokinase (PFK) und das akkumulierende Acetyl-CoA inhibiert die Pyruvatdehydrogenase (PDH) (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Die Inhibition dieser beiden Enzyme führt zu einer Akkumulation des Glukose-6-Phosphats was deshalb zu einer kompetitiven Hemmung der Hexokinase (HK) führt (Zhou & Grill, 1995).

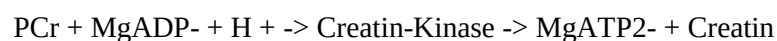
Dieser Ablauf führt damit unweigerlich zum verminderten Abbau, bzw. zur verminderten Aufnahme von Glukose in die Zelle und ist dahingehend als Ursache der herabgesetzten glukoseinduzierten Insulinsekretion anzunehmen (Krebs & Roden, 2004).

Ein arbeitender Muskel bezieht seinen Energiebedarf zuerst aus seinen intramuskulären Speichern, dem Zytoplasma und den Myofibrillen des Muskelgewebes (Scott, Stevens, & Binder-Macleod, 2001). Da die ATP-Reserve in den Muskelfasern mit 5.5 bis 6 mmol/kg Muskelfeuchtgewicht verschwindend gering ist (Weineck, 2009), muss unter Belastung das verbrauchte ATP permanent aus den Spaltprodukten ADP und dem Phosphatrest resynthetisiert werden (Zintl, 2009). Alle anderen Energiespeicher können nicht direkt genutzt werden, sondern dienen dazu, das verbrauchte ATP zu resynthetisieren. Die ATP-Resynthese (Abb.6) erfolgt durch aerobe und anaerobe Prozesse (Zintl, 2009).

Um Energie für die Muskelkontraktion bereitzustellen, wird das hochenergetische Molekül Adenosintriphosphat (ATP) durch das ATPase-Enzym in Adenosindiphosphat (ADP) und anorganische Phosphate sowie H^+ -Ionen gespalten (Hettinger & Hollmann, 2000).



Um ADP zu ATP zu rephosphorylieren, wird eine Phosphatgruppe des Phosphokreatins (PCr) durch die Creatinkinase-Reaktion zu ADP transferiert (Abb.6). Kreatin selbst wird in den Mitochondrien zu PCr rephosphoryliert. PCr fungiert dabei als Zwischenpuffer bzw. als Shuttle des energiereichen Phosphates von den Mitochondrien zu den Myofibrillen, der Verbindungsstellen bei der Energieproduktion (Hohmann, Lames, & Letzelter, 2007).



Zu Beginn der Muskelarbeit ist die mitochondriale ATP-Produktion zu niedrig, um Kreatin vollständig zu PCr zu phosphorylieren. Dies löst einen progressiven PCr-Abfall im Zytosol aus. Daher versucht die Muskelzelle den ATP-Bedarf teilweise durch anaerobe Glykolyse zu decken - diese Phase wird als anaerobe Phase bezeichnet. Mehr ATP für die oxidative Rephosphorylierung von Kreatin kann jedoch durch enzymatische Aktivierung und erhöhte Sauerstoffversorgung und durch erhöhten Blutfluss gewährleistet werden, was schließlich zum PCR-Hydrolyse-Gleichgewicht / Steady-State und Rephosphorylierung führt (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Dieses Gleichgewicht folgt normalerweise einem mono-exponentiellen Verlauf. Die Zeitkonstanten, für die Übergangsphase des progressiven PCr sinken

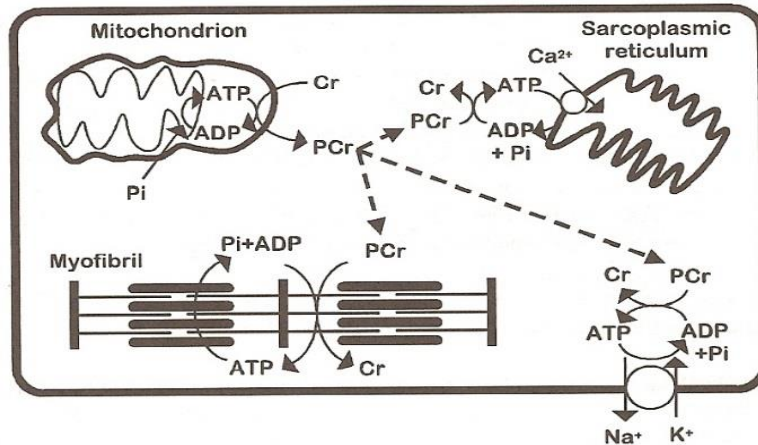


Abbildung 6 Schematische Darstellung der 2 Hauptfunktionen Kreatin-Phosphat (PCr)-System in einer Muskelfaser. Die erste ist die des zeitlichen Energiepuffers für die (ATP) Regeneration. Die zweite Hauptfunktion ist der Transport von energiereichem Phosphat vom Mitochondrium zur Myofibrille. (Paoletti, Poli, & Jackson, 2000)

bei gesunden Probanden auf einen stationären Zustand von 30 bis 60 Sekunden und korreliert mit einer erhöhten Perfusion der Versorgungsarterien. Zur Berechnung der entsprechenden Zeitkonstanten ist daher während der Messung im MR eine zeitliche Auflösung von 5 bis 15 Sekunden erforderlich, und erlaubt die Bewertung des mitochondrialen Sauerstoffumsatzes innerhalb des Muskels (Valkovič & Chmelík, 2013). Die ^{31}P MRS-Spektroskopie ist damit eine einzigartige Methode zur Messung der Leistungen im Mitochondrium der Muskelzelle. Dieses methodische Vorgehen ist für die Messung der Re-synthese von PCr während körperlicher Belastung am Quadspect Ergometer ein zuverlässiges und akzeptiertes Maß für die oxidative Kapazität (Valkovič, et al., 2013).

In der Muskelphysiologie ist die mitochondriale Funktion, die durch die Zeitkonstante der PCr-Erholung nach einer anstrengenden Belastung bestimmt wird, von besonderem Interesse. Ausdauer Athleten zeigen eine schnellere Regeneration von PCr im Vergleich zu Sprint-trainierten Athleten (Pesta, et al., 2013). Ausdauertraining führt zur mitochondrialen Biogenese und damit zu einer erhöhten mitochondrialen Dichte im Muskel.

Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen zeigt sich, dass die nichtinvasive Untersuchung der intrazellulären Energie substate (Phosphocreatine PCR, ATP, und anorganisches Phosphate Pi sehr gut durch eine phosphor-Magnetresonanz-Spektroskopie dargestellt werden können (Valkovič, et al., 2016; Kemp, Meyerspeer, & Moser, 2007).

3.2 Acetylcarnetin und Fettstoffwechsel

Der menschliche Fettstoffwechsel ist gemeinsam mit der Energiegewinnung aus Kohlenhydraten verantwortlich für sportliche Leistungsfähigkeit (Hargreaves, 2012). Gerade bei Ausdauersportarten, wo über einen langen Zeitraum energiereiche Substrate benötigt werden, bedient sich je nach Intensität die

Muskelzelle dem Fettstoffwechsel in wechselnder Ausprägung (Smekal, 2004). Verschiedene Arten des Trainings bauen daher auf speziellen Fettstoffwechseltrainingsmethoden auf. Dabei wird Grundsätzlich versucht die Fettflussrate während der Belastung optimal zu nutzen. Dies kann durch eine vermehrte Lipolyse der Depotfette und der intramuskulären Triglyceride erfolgen, wobei eine Vergrößerung der Triglyceridspeicher, eine Erhöhung des Mitochondrienvolumens und eine Harmonisierung des Transportes von Fettsäuren im Muskel – dem Plasma und der Mitochondrienmembran eine Rolle spielt (Scharhag-Rosenberger, 2012). Von entscheidender Funktion ist daher die Geschwindigkeit und Menge an Fett das im Mitochondrium des Muskels dabei verarbeiten kann (Horowitz & Klein, 2000). Das Acylcarnitin/Carnitin-Transportsystem (Carnitin-shuttle) fungiert dabei als spezifisches Transportsystem durch die innere Mitochondrienmembran, welches die Diffusion von Fettsäuren in Form von Fettsäureacyl-Carnitin-Estern (Acylcarnitin) durch die innere Mitochondrienmembran in die Matrix der Mitochondrien zur Oxidation ermöglicht (Pierre, et al., 2007; Ramsay & Zammit, 2004).

Der Ablauf stellt sich wie folgt dar: (Abb7)

Fettsäuretransport in die mitochondriale Matrix. Die Acylgruppe des langkettigen Acyl-Coenzyms A (CoA), die aktive Form von langkettigen Fettsäuren, wird über Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT I) auf Carnitin übertragen, wobei Acylcarnitin gebildet und freies Coenzym A erzeugt wird. Acylcarnitin wird in die mitochondriale Matrix über Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) transportiert. Carnitin-Palmitoyltransferase II (CPT II) regeneriert freies Carnitin durch Katalysierung und der Übertragung der Acylgruppe von Carnitin zu Coenzym A in der mitochondrialen Matrix. Carnitin wird über Carnitin-Acylcarnitin-Translokase als freies Carnitin oder Acetylcarnitin nach Acetylierung über Carnitin-Acetyltransferase (CAT) zum Cytoplasma zurückgeführt (Wong & Crawford, 2011).

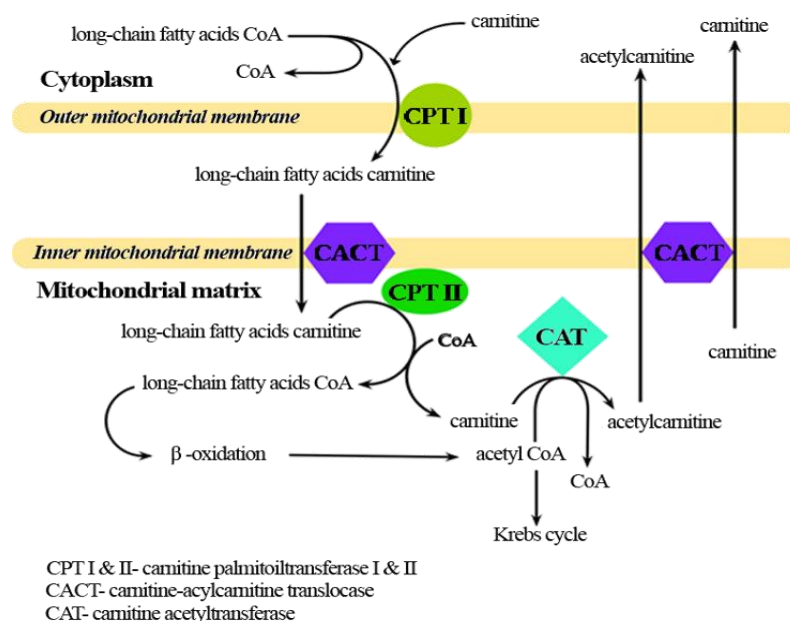


Abbildung 7: Fettsäuretransport in die mitochondriale Matrix über "Carnitin-Shuttle" (Wong, Joo, & McDonnell, 2000)

Im Gegensatz zu Acyl-CoA kann Acylcarnitine zelluläre Membranen durchqueren; So kann die Umwandlung dieser Moleküle den zellulären Kohlenstoffhandel zwischen den einzelnen Geweben beeinflussen. Die prominentesten Mitglieder dieser Familie sind die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT1) und CPT2. Diese sind auf der äußeren und inneren mitochondrialen Membran lokalisiert, wobei sie zusammen mit Carnitin-Acylcarnitin-Translokase den Import von langkettigen Fetten zu den Acyl-CoA in die mitochondriale Matrix für die β -Oxidation bereitstellen (Ramsay & Zammit, 2004; McGarry, et al., 1991). Ein drittes Mitglied dieser Familie, Carnitin-Acetyltransferase (CAT), liegt hauptsächlich in der mitochondrialen Matrix, wo sie selektiv auf kurzkettige Acyl-CoAs wirkt (Bieber, 1988; Cordente, et al., 2004). Im Gegensatz zu CPT1 und CPT2 war die genaue Funktion von CAT und ihre potenzielle Relevanz für metabolische Erkrankungen lange Zeit nicht bewiesen. Erwähnenswert ist jedoch, dass, eine Rolle für dieses Enzym bei der Aufrechterhaltung der Glukose-Homöostase in Tierstudien hoch signifikant ist, wobei die therapeutischen Vorteile der L-Carnitin-Supplementierung mit einem robusten Gewebeabfluss und einer Harnausscheidung von Acetylcarnitine (dem Hauptprodukt von CAT) übereinstimmen (Noland, et al., 2009; Power, et al., 2007). Den Beweis, dass CAT eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der systemischen Glukosetoleranz nicht nur bei Nagetieren, sondern auch beim Menschen spielt, und die Ganzkörper-Glukose-Homöostase beeinflusst wurde von (Muoio, et al., 2012) bestätigt

Während das klassische vorgehen zur Bestimmung des Acetylcarnitinspiegels nur über eine invasive Biopsie des Muskelgewebes denkbar war, ermöglicht die Untersuchung via Magnetresonanz eine nichtinvasive Möglichkeit (Lindeboom, et al., 2014). Insbesondere die Variante einer 7 Tesla Untersuchung ermöglicht eine wesentlich bessere Auflösung und damit eine genauere Bestimmung des Acetylcarnitinspiegel, was wir in unsrer Untersuchung nachweisen konnten (Tušková, et al., 2016). Unter Berücksichtigung des gesamten Verstoffwechselungsprozesses der Substrate zur Energiegewinnung des Muskels spielt jedoch auch der Prozess der ATP Syntheserate eine entscheidende Rolle. Während die Fette zur Energiegewinnung erst durch den Acetylcarnitin/Carnitinkreislauf geschleust werden müssen um der β -Oxidation zur Verfügung stehen zu können werden Kohlenhydrate direkter verstoffwechselt (Muoio, et al., 2012).

Es deutet vieles darauf hin, dass bei hohen körperlichen Belastungen, und einer damit verbundenen erhöhten Glycolyserate, der limitierende Faktor für die Lipolyse der Transport der langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran darstellt (Smekal, 2004). Wenn es zu einem verstärkten glykolytischen Fluss aus Kohlenhydraten kommt, wird vermehrt Acetyl-CoA im Muskel angehäuft und das überschüssig produzierte Acetyl-CoA wird an L-Carnitin gebunden. Dies hat wiederum zur Folge, dass der intramuskuläre Pool an „freiem“ Carnitin sinkt. Das „freie“ Carnitin wird aber für den Transport der langkettigen Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran benötigt (Carnitin-Shuttle-System), und somit führt die Reduzierung des „freien Carnitin-Pools“ zu einer Herabsetzung des Transportes der FFA durch die innere Mitochondrienmembran (Pesta, et al., 2013) Die Freisetzung von FFA wird von Fettgewebe bei höheren Intensitäten verringert, höchstwahrscheinlich aufgrund des verminderten

Fettgewebsflusses, was zu einer verminderten Abgabe von FFA an den kontrahierenden Muskel führt (Muoio, 2014). Interessant ist auch, dass wenn die Verfügbarkeit der FFA während Belastungen über 80% der VO_2max auf dem Level der unter moderaten Intensität beobachteten Werte bleibt und bei der Rückkehr zu moderater Belastung die Oxidation der FFA nicht sofort vollständig wiederhergestellt wird (Horowitz & Klein, 2000). Das deutet darauf hin, dass Mechanismen innerhalb des Muskels auch die Oxidation der Fettsäure bei höheren Trainingsintensitäten begrenzen.

Außerdem führt die bei hohen Belastungen auftretende Laktatazidose zu einer verminderten Aktivität der Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT I). Da das Enzym CPT I den Transport der langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran katalysiert, wirkt sich diese Hemmung der CPT I negativ auf den Transportmechanismus aus (Smekal, 2004).

Sehr hohe Intensitäten bei körperlicher Belastung verringern demnach die Fettsäure-Oxidation, da in diesen Intensitäts-Bereichen (über 80 % der VO_2max) sehr viel Acetyl-CoA via (β -Oxidation oder) Glycolyse (Glukose-Abbau) generiert wird. Die dadurch entstehende Hemmung des PDH führt zur Anstauung des Acetyl-CoA da dieses nicht mehr im Citrat-Zyklus abgebaut werden kann, und Acetyl-L-Carnitin temporär bindet. Dieses Carnitin fehlt dann dahingehend beim neuen Eintritt von FFA in das Mitochondrium (Gacesa, Schick, Machann, & Grujic, 2016).

Bemerkenswert ist, dass in einigen Fällen die Adipositas-assoziierte Anhäufung von lang- und mittelkettigen Acylcarnitinen im Muskel von einem Rückgang des freien Carnitins begleitet wurde (Noland, et al., 2009; Seiler, et al., 2014), während die Nahrungs-L-Carnitin-Supplementierung die Ganzkörper-Glukosetoleranz verstärkte und die metabolische Flexibilität erhöht (Power, et al., 2007). Zusammengenommen verleihen diese Erkenntnisse betreffend der Rolle für die L-Carnitin- und Acylcarnitin-Produktion bei der Regulierung der Glukose-Homöostase dem Glucose-Fettsäure-Zyklus, wie er ursprünglich von Randle 1963 (Randle & et.al., 1963) beschreiben wurde nach wie vor Aktualität, auch wenn heute dabei eher von metabolischer Flexibilität gesprochen wird.

3.3 Metabolische Flexibilität

Mitochondrien, die Atmungsmotoren der Zelle, verbrauchen Sauerstoff, um Kohlenstoff-Zwischenprodukte zu verbrennen, die aus drei Hauptnährstoffen gewonnen werden: Fettsäuren, Glukose und Aminosäuren. Diese Brennstoffe können jeweils zu Acetyl-CoA katabolisiert werden, welches als universelles Substrat dient, das den Krebs-Zyklus zugeführt wird (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Jede Umdrehung des Krebs-Zyklus gibt Kohlenstoffe in Form von CO_2 frei und erzeugt gleichzeitig reduzierende Äquivalente (NADH und FADH_2) (Fisher-Wellman, et al., 2013) welche die Elektronentransportkette (ETC) und die oxidative Phosphorylierung antreiben, ein weniger leistungsfähiges und leistungsfähigeres ATP-Regenerations-System mit höherer Kapazität als Glykolyse. Das Elektronentransportsystem, wie auch die oxidative Phosphorylierung, benötigt Sauerstoff als endgültigen Elektronenakzeptor, was zur Erzeugung von Wasser führt (Anderson, et al., 2009). Die Zellrate der CO_2 -Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch oder der Atmungsquotient (RQ) schwankt zwischen 0,7 und 1,0 und liefert eine Annäherung des mitochondrialen Brennstoffverbrauchs unter typischen Bedingungen,

bei denen Aminosäuren nur minimal als oxidatives Substrat beitragen. Ein hoher RQ ist ein Hinweis auf die Glukose-Oxidation, während ein niedriger RQ vorwiegend Fettoxidation reflektiert (Demsey, Amann, Harms, & Wetter, 2012). (Abb8)

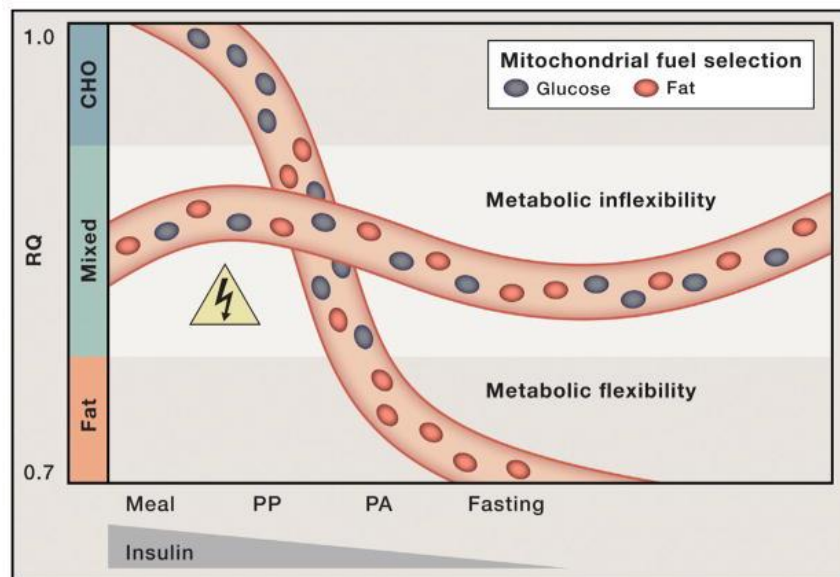


Abbildung 8: vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Flexibilität / Inflexibilität je nach Energiezufuhr (Muoio D. , 2014).

Die normale Physiologie zeichnet sich durch tägliche Schwankungen im Ganzkörper-RQ aus, die einen metabolisch flexiblen Zustand reflektieren, in dem Mitochondrien zwischen Substraten (Fett und Zucker), die auf ernährungsphysiologischen und physiologischen Reizen basieren (Mailloux, Jin,, & Willmore, 2013). Metabolische Flexibilität ist die Fähigkeit der Muskelzelle von einer vornehmlichen Fettsäureoxidation und -aufnahme zur einem Zustand unterdrückter Fettsäureoxidation und gesteigerte Glucoseaufnahme, -oxidation und -speicherung in insulinstimulierten Bedingungen (Kelley & Mandarino, 2000). Die physiologische Bedeutung der metabolischen Plastizität kann nicht verstanden werden, ohne zuerst den evolutionären Druck für Mitochondrien zu betrachten, um Fett als Brennstoffquelle zu wählen, wenn systemische Glukosereserven bedroht sind (Jaspers, et al., 2017). Während Lipide eine reichhaltige, kohlenstoffreiche Energiequelle für die meisten Gewebe bereitstellen, hat das Gehirn eine begrenzte Kapazität für den Fettkatabolismus und ist daher stark auf eine kontinuierliche Zufuhr von Glukose angewiesen. Während teils evolutionenbedingten Perioden der Nahrungsmittelbeschränkung, oder anhaltender körperlicher Belastungen wurde dadurch ein Schutz gegen Hypoglykämie erreicht, indem vielseitigere Gewebe (z.B. Herz-, Skelettmuskel, Leber) in eine Lipid-basierte Atemwirtschaft umgewandelt werden. Auf einer systemischen Ebene wird dieser Wechsel der metabolischen Versorgung weitgehend durch die gegenregulatorischen Hormone, Insulin und Glukagon vermittelt, die beide einen starken Einfluss auf die Fettgewebslipolyse ausüben (Muoio D. , 2014). Fasten senkt das Insulin Glukagon-Verhältnis, das die Hydrolyse von Fettgewebe Triacylglycerin stimuliert und dadurch die Abgabe von freien Fettsäuren an die Peripherie erhöht. Lipolyse tritt auch in Geweben wie Muskel und Leber auf, was die schnelle Bereitstellung von Lipidbrennstoffen weiter erleichtert. Wie

zuerst von Randle (Randle & et.al., 1963) erkannt, werden systemische Veränderungen der Energieversorgung und des Bedarfs auch lokal überwacht und kontrolliert, so dass der Glukoseverbrauch unterdrückt wird, wenn die Fettoxidation zunimmt.

Vor dem Hintergrund dieser Tatsachen wurde in die hier vorliegenden Untersuchungen, insbesondere bei der Bestimmung des Acetylcarnetinspiegel auf Parameter wie Messzeitpunkt im Tagesverlauf, das Ernährungsverhalten vor den Messungen und die Trainingsbelastungen geachtet.

3.4 Weitere Metaboliten (Carnosine)

Ebenfalls im Zytoplasma der Muskelzelle findet sich Carnosine. Jedoch ist die Wirkung von Carnosine bis jetzt noch nicht vollständig untersucht. Carnosine (β -alanyl-l-histidine) ist ein zytoplasmatisches Dipeptid im menschlichen Körper an unterschiedlichen Speicherorten vorkommt (Reddy, Garrett, Perry, & Smith, 2005). Neben dem Gehirn und der Leber ist der quantitativ dominanteste Speicherort vor allem die Skelettmuskulatur (Blancquaert, et al., 2017). Seine bekannten physiologischen Funktionen umfassen die pH-Pufferung, eine entzündungshemmende und antioxidative Wirkung und die Eigenschaft zum Schutz gegen die Bildung von fortgeschrittenen Glykosierungs- und Lipoxidationsmechanismen (Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013; Derave, Evaraert, Beekman, & Baguet, 2010).

Von Anfang an wurde die Erforschung der physiologischen Rolle von Carnosine auf den Skelettmuskel gerichtet, da das Molekül zunächst in Fleisch-Extrakt entdeckt wurde (Gulewitsch, 1911). Jedoch wurde bis jetzt die komplette Funktion aufgrund der unglaublichen Komplexität noch nicht geklärt. Folgende Abbildung (Abb.9) fasst übersichtlich die derzeit vielversprechendsten physiologischen Rollen von Carnosine im Skelettmuskel zusammen. (Boldyrev A. , 2012).

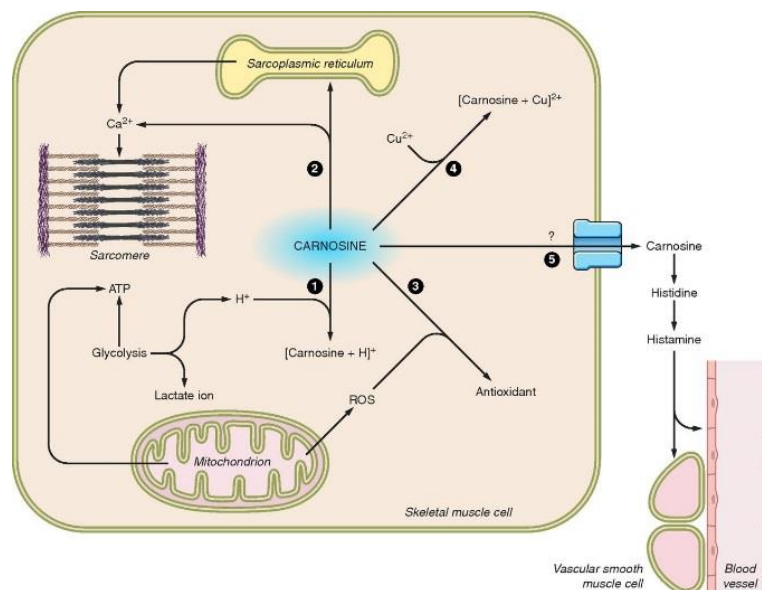


Abbildung 9 Die möglichen Wirkmechanismen des Carnosines in der Skelettmuskulaturzellen: 1) Protonenpufferung; 2) Regulation bei der Calciumfreisetzung und Kalziumempfindlichkeit; 3) protektive Wirkung gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS); 4) Chelatbildner bei versch. Metallionen Und 5) extrazelluläre Bereitstellung von Histidin / Histamin (Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013).

Die Konzentration von Carnosine im Muskel variiert interindividuell im Bereich von 5-8 mmol / kg Nassgewicht (oder 20-30 mmol / kg Trockengewicht) (Derave, Everaert, Beekman, & Baguet, 2010; Pan, Hamm, Rothman, & Shulman, 1988; Kendrick, et al. 2009)

Wahrscheinlich gibt es mehrere Faktoren, welche das Carnosinniveau im Muskel beeinflussen. Hauptdeterminante ist dabei der Muskelfasertyp und dessen Zusammensetzung (glykolytisch vs. oxidativ), das Alter, und das Geschlecht. Ebenso spielt jedoch der Trainingszustand aber auch Ernährungsfaktoren einschließlich oraler Supplementierung mit Aminosäure β -Alanin (Carnosinvorstufe) eine Rolle. (Derave, et al., 2007; Everaert, et al., 2011; Baguet, Everaert, Achten, Thomis, & Derave, 2012).

Interessant ist jedoch, dass es bis anhin keine Hinweise auf eine Obergrenze für den Carnosin-Gehalt im Muskel gibt, da durch orale Supplementierung der Carnosinspiegel um mehr als 80% erhöht werden kann (Hill, et al., 2007; Kendrick, et al., 2009). Die Rolle von Carnosin als pH-Puffer im Skelettmuskel wurde erstmals 1938 titulierte (Deutsch & Eggleton, 1938). Bate-Smith beschrieb im gleichen Jahr, dass die muskuläre Pufferkapazität zu 25% auf Carnosine zurückzuführen ist (Bate-Smith, 1983). Heute geht man von einer Gesamtpufferkapazität von etwa 10-20% (Mannion, Jakeman, Dunnett, Harris, & Willan, 1992; Tallon, Harris, Boobis, Fallowfield, & Wise, 2005) aus.

Auch wurde mit dem Carnosine bei hochintensiven Muskelkontraktionen eine Mitbeteiligung an der anaeroben Glykolyse zur Produktion von Milchsäure und der daraus resultierenden Azidose assoziiert, was folglich mit muskelkontraktiver Müdigkeit begründet wurde (Hultman & Sahlin, 1980). Obwohl die Rolle der Azidose bei der Muskelermüdung eine Frage der Debatte bleibt (Allen, Lamb, & Weserblad, 2008; Pedersen, Nielsen, Lamb, & Stephenson, 2004) kann man erwarten, dass der Grund für die Menge von Carnosine im Muskel zumindest teilweise mit der Protonen-Sequestrierungseigenschaft des Carnosinmoleküls zusammenhängt.

Eine weitere vermeintliche Rolle von Carnosin im Skelettmuskelgewebe ist ein physiologischer Chelator von Cu^{2+} . (Schroder, Schmitz, & Bachert, 2008) haben die Anwesenheit von Cu^{2+} -Carnosin-Chelaten im menschlichen Wadenmuskel durch Proton-MR-Spektroskopie in vivo nachgewiesen.

Carnosine kann nicht invasiv von ^1H MRS nachgewiesen werden. Dazu werden anhand von zwei Spektrellinien, die aus $\text{C}2\text{-H}$ - und $\text{C}4\text{-H}$ -Protonen die am Imidazolring entstehen gemessen. (Just-Kukurová, 2016). Allerdings müssen bei der Bewertung von Carnosine orientierungsabhängige Effekte, basierend auf der dipolaren Kopplung, der chemischen Verschiebungsanisotropie berücksichtigt werden.

4. Material und Methodik

Für alle durchgeführten Studien wurden freiwillige Probanden rekrutiert, und eine schriftliche Einverständniserklärung in Übereinstimmung mit der im Vorfeld genehmigten Ethikkommissionen unterzeichnet.

Das Studienprotokoll wurde von den zuständigen Institutionen und den Ethikgremien der Medizinischen Universität Wien und des Universitätsklinikums Bratislava, Comenius-Universität Bratislava, genehmigt und die Studien wurde gemäß den anerkannten Richtlinien durchgeführt.

Da für die unterschiedlichen Studien, verschiedenen Probandengruppen getestet und untersucht wurden, kann eine Einteilung der Probanden in drei große Gruppen vorgenommen werden.

Je nach Studie wurden entweder nur männliche bzw. männliche und weibliche Probanden untersucht. Die Bezeichnung Probanden beschreibt daher Personen beiderlei Geschlechts und ist in jeder Studie separat hervorgehoben.

Übergewichtige (Präadipositas) bis fettleibige Personen ($\text{BMI} \geq 27,0 \text{ kg.m}^2$) ohne körperliche Aktivität und ohne Pharmakotherapie bzw. keiner Krankengeschichte von Typ-2-Diabetes.

Im weiteren Verlauf als Obese/Sedentary (Ob/Sed.) bezeichnet

Normalgewichtige Personen ($\text{BMI } 18,5 \text{ kg.m}^2 - 23 \text{ kg.m}^2$) mit normaler körperlicher Aktivität aber keiner regelmäßigen sportlichen Betätigung. Im weiteren Verlauf als Lean Active (L/Ac) bezeichnet.

Gut trainierte Triathleten mit ebenfalls normalem BMI ($18,5 \text{ kg.m}^2 - 23 \text{ kg.m}^2$) und einer $\text{VO}_{2\text{max}}$ von über $45 \text{ ml. min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ mit regelmäßiger Trainingsbelastung (keine wettkampfspezifische Trainingsvorbereitungen). Im weiteren Verlauf als „Athleten bezeichnet.

Alle MR-Messungen wurden an einem 7T-Ganzkörper-Magnetom-MR-System (Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Für die Messungen des Acetylcarnetin, Carnosine und den freien Fettsäuren (^1H MRS) wurde eine 28-Kanal-Kniespule (QED, Mayfield Village, OH, USA) verwendet, um Spektren aus dem M. quadrizeps und dem M. soleus des linken Beins in Rückenlage zu gewinnen.

Für die dynamischen Messungen des ATP und PCr (^{31}P MRS) wurde eine Dual-abgestimmte (^{31}P - ^1H) kreisförmige Oberflächenspulen (10 cm Durchmesser, (Rapid Biomedical, Rimpf, Deutschland), verwendet.

Für die Untersuchungen der Oberschenkelmuskulatur (M. quadriceps) befanden sich die Probanden in Bauchlage um durch eine Knie-Extension eine Messung der Oberschenkelmuskulatur zu ermöglichen. (Abb.2)

Für die Messungen der Wadenmuskulatur (M. triceps surae) befanden sich die Probanden in Rückenlage für die Plantarflexion zur Messung der Wadenmuskulatur

Die Diagnosepedale („Quadspect“ und „Trispect“ Fa. Ergospect, Innsbruck, Austria) welche durch eine schnelle und einfache Handhabung (Aufbau in ca. 5 min) einsatzbereit sind, verfügen über eine hochmoderne Technologie für die Signalübertragung und eine automatische Aufzeichnung aller relevanten Parameter (z. B. Kraft, Abstand, Frequenz und Energieabgabe). Durch die vollautomatische Kraftanpassung durch ein pneumatisches System und Regelung der Energieabgabe durch die Steuerungssoftware konnte somit für jeden Probanden nach Bestimmung der individuellen maximalen Kraft eines daraus resultierenden Submaximal bzw. Maximalen Belastungsszenario geschaffen werden. Der Widerstand wird durch Luftdruck erzeugt und kann präzise gesteuert und während der Messung verändert werden. Dies ermöglicht es, den Muskel während eines vordefinierten Lastprotokolls in Verbindung mit fortgeschrittenen MR-Techniken zu untersuchen. Das Modul erlaubt mit einem maximalen Standard-Drehmoment von 110 Nm oder (dem von uns verwendeten) optionalen Upgrade auf 250 Nm für sportbezogene ärztliche Untersuchungen verwendet.

Für die Erhebung der Messwerte der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde bei verschiedenen Probandengruppen (siehe Methodik der einzelnen Studien) eine Spiroergometrie durchgeführt. Dabei unterzogen sich die Probanden einem standardisierten Protokoll mit kontinuierlichen Belastungsanstieg bis zur Erschöpfung auf einem Fahrradergometer (Lode Excalibur, Groningen, Niederlande). Die Messung der VO_{2max} und anderer Parameter erfolgte mittels "Breath by Atem" Spiroergometrie (Master CPX, VIASYS Healthcare). Das Testprotokoll beinhaltet eine dreiminütige Adaptionsphase zur Messung der Baseline und darauffolgende kontinuierliche Erhöhungen um 20 Watt / pro Minute bei gleichbleibender Umdrehungszahl von 90 U/Min) bis zur individuellen max. Erschöpfung. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Gesamtdauer der Spiroergometrie für alle Probanden (trainiert und untrainiert) zwischen 7 und max. 26 min lag vgl. (Scharhag-Rosenberger, 2010)

4.1 Datenverarbeitung, Berechnungen und statistische Auswertung

Grundsätzlich finden sich in den einzelnen Studien eigene Kapitel zur Beschreibung der verwendeten Methoden zur Auswertung der Messwerte. Daher erfolgt hier eine Übersicht der jeweilig angewandten Methodik.

Bei der Auswertung der MR basierten Daten wurden alle Spektren mittels jMRUI (Java-basierte Magnetresonanz-Benutzerschnittstelle, Version 5) und dem AMARES (Advanced Method for Accurate, robust und Efficient Spectral Fitting) Zeitbereichsanpassungsalgorithmus analysiert (Vanhamme, Boogaart, & Huffel, 1997).

4.2 Methodik der Magnetresonanzverfahren ¹H-MRS & ³¹P-MRS

¹H-MRS

Die spektralen Linien von jedem Spektrum von Acetylcarnitine, Carnosine, Lipiden und Wasser wurden als einzelne Lorentzianer angepasst. In den Acetylcarnitinspektren wurden Kreatin, TMA und Lipide eingesetzt. Lipide, die den Acetylcarnitin-Peak umgeben wurden mit einer eingeschränkten Frequenz von 2,0-2,1 ppm und 2,17-2,3 ppm ausgestattet, um ihren Einfluss auf das eingesetzte Acetylcarnitin zu vermeiden. Aus den Carnosin-Spektren wurden Restwasser- und Lipidpeaks durch einen Hankel Lanczos Squares Singular Values Decomposition (HSVLD) Algorithmus entfernt, und der Peak von Carnosin wurde angepasst. (Just-Kukurová, 2016) Unter Verwendung der Wasserspitze als interne Referenz wurde die Konzentration von Acetylcarnitin und Carnosin nach der Formel für die millimolare Konzentration im Nassgewicht (mmol / kg ww) berechnet. Aus den Lipidspektren wurde die Peakfläche von IMCL-CH & sub2; (Methylen) bei 1,3 ppm angepasst, für den Relaxationseffekt T1 und T2 korrigiert und als Prozentsatz des Wassergehalts ausgedrückt. (Ren, Sherry, & Malloy, 2010; Just-Kukurová, 2016; Klepochová, et al., 2017).

³¹P-MRS

Die Resonanzlinien von PCr, Pi, Pi2, Phosphomonoester (PMEs) - Phosphocholin (PC) und Phosphoethanolamin (PE) und Phosphodiester (PDEs) - Glycerophosphocholin (GPC) und Glycerophosphoethanolamin (GPE) wurden als einzelne Lorentzien, Wohingegen γ - und α -ATP als Doppel und β -ATP als Tripletts eingesetzt wurden. Die Frequenz des Pi2-Peaks wurde in Bezug auf die erwartete Frequenzdifferenz zwischen Pi2 und Pi auf $\sim 0,4$ ppm beschränkt. Für das FAST-Experiment wurden die Linienbreiten von PCr und Pi aus den Spektralen mit dem höchsten Signal / Rausch-Verhältnis bestimmt und dann auf ± 5 Hz beschränkt (Tušek Jelenc, 2016; Valkovič, et al., 2016). Die Verschiebung der Resonanzposition zwischen PCr- und Pi-Signalen in Teilen pro Million wurde verwendet, um den intramyozellularen pH-Wert (Moon, Richard, & Richards, 1973) gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung zu berechnen. Die ADP-Konzentration wurde nach dem von Kemp et al. (Kemp, 1993) (unter der Annahme, dass 15% des gesamten Kreatins [Cr] im Ruhezustand nicht phosphoryliert waren).

Um die Zeitkonstante der PCr-Resynthese (τ PCr) zu berechnen, wurden die PCr-Signaländerungen während der Erholungsperiode des dynamischen Experiments an einer mono-exponentiellen Funktion mit MATLAB angepasst. Dies wurde verwendet, um die anfängliche PCR-Wiederfindungsrate (VPCr) zu berechnen, die in etwa dem ATP-Umsatz am Ende der Übung entspricht, und die maximale Rate der oxidativen Phosphorylierung (Q_{max}) wurde nach dem ADP-basierten Modell von Michaelis und Menten berechnet (Kemp, 1993; Valkovič, et al., 2016)

4.3 Spiroergometrie

Die kontinuierlich gemessenen physiologischen Messwerte während der Tests waren VO_2 , VCO_2 , VE und Atemäquivalent (RER) und die daraus errechneten Parameter von RQ ($\text{VCO}_2 / \text{VO}_2$), und dem Atemäquivalent für VO_2 , & Atemäquivalent für VCO_2 . Wichtigster spiroergometrischer Parameter zur Bestimmung der Ausdauerkapazität ist die maximale Sauerstoffaufnahme ($\text{VO}_{2\text{max}}$), die bei gut ausgebildeten Ausdauersportlern meist über 50 ml / min / kg beträgt und bis zu 90 ml / min / kg erreichen kann. Bei nicht trainierten Männern und Frauen im mittleren Alter beträgt sie etwa 30 bis 50 ml / min / kg (Meyer & Kindermann, 1999). Ein Vergleich zwischen Männern und Frauen zeigt, dass Frauen 10 bis 15% niedrigere Werte haben. Weitere Parameter für die Ausdauerkapazität ist die ventilatorische Schwelle (VT) und Atemwegskompensation Punkt (RCP). Die VT ist in der Regel bei Ausdauerathleten zwischen 60 und 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$ und bei Untrainierten zwischen 40 und 60% $\text{VO}_{2\text{max}}$ (Mayer, Lucia, Earnest, & Kindermann, 2005). Die RCP liegt somit zwischen 80 und 90% $\text{VO}_{2\text{max}}$ für Ausdauersportler und zwischen 70 und 80% $\text{VO}_{2\text{max}}$ für nicht trainierte Probanden.

5. Beschreibungen der einzelnen Studien

Grundsätzlich sind alle drei Studien aufeinander aufgebaut, bzw. ergänzen das Thema mit je einem Teilbereich der Untersuchungen zum Muskelstoffwechsel. Auch die Tatsache, dass verschiedenen Untersuchungsmethoden (insbesondere im Bereich der Erkennung und Quantifizierung des Acetylcarnetin) sich erst im Laufe der Untersuchungen ergeben haben hat diese Kumulationen erst möglich gemacht.

5.1 Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight to obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content

Der Schwerpunkt der ersten Studie lag begründet auf der Tatsache einer zunehmend Übergewichtigen Gesellschaft. Dieses Problem könnte ebenso als das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -aufwand aus dem sich nachfolgend fast immer eine Insulinresistenz entwickelt beschrieben werden. Angesichts der Tatsache, dass der Skelettmuskel fast die Hälfte der gesamten Körpermaße ausmacht und für die Mehrheit der Glukoseaufnahme und Glykogenspeicherung als Reaktion auf einen Insulinreiz verantwortlich ist (DeFronzo, Bonadona, & Ferrannini, 1992), war die Untersuchung des Muskelenergieaufwandes von besonderer Bedeutung für die Pathogenese von Fettleibigkeit und dem Metabolischen Syndrom.

Jüngste Studien zeigten, dass eine entstehende Insulinresistenz sich auf Anomalien im Energiestoffwechsel bezieht, dabei aber nicht nur auf den Skelettmuskel beschränkt ist, (Kelley, He, Menshikova, & Ritov, 2002; Rabol, Boushel, & Dela, 2006; Little, 2011) sondern auch am Herz (Perseghin, 2007) und der Leber zu finden ist. Die kontraktile Aktivität des Skelettmuskels wird in erster Linie durch die ATP-Syntheserate (Kemp & Radda, 1994) geregelt, die unter aeroben Bedingungen im

beanspruchten Muskel hauptsächlich durch die oxidative Phosphorylierungskapazität von Mitochondrien bestimmt wird.

Wie eingangs beschrieben wurde dafür die Möglichkeiten des 7 Tesla (Phosphor-Magnetresonanzspektroskopie / ^{31}P -MRS) für den Nachweis von intramyozellulären Energiemetaboliten, insbesondere des Phosphocreatin [PCr], ATP und anorganisches Phosphat [Pi] untersucht ist durch (^{31}P -MRS) genutzt.

Das Ziel der Untersuchung war es daher, den Skelettmuskelstoffwechsel von Personen mit Übergewicht und inaktivem Lebenswandel (Ob/Sed), welche anfällig für Typ-2-Diabetes sind, mit dem von normalgewichtigen Personen mit normalem Bewegungsverhalten 2-3/ Woche Sport) (L/Ac) zu vergleichen.

Beim Vergleich der beiden Gruppen wurde zusätzlich zu einem signifikant höheren BMI und einer niedrigerem VO_2max folgendes festgestellt.

- Die Kombination von erhöhtem BMI und sesshaftem Lebensstil führt zu signifikanten Unterschieden im alkalischen Pi-Pool des Skelettmuskels.
- die Konzentration des alkalischen Pi-Pools [Pi_2] und dessen Verhältnis zu dem Haupt-Pi-Konzentration [Pi_1], waren in der Gruppe der (Ob/Sed)-Gruppe gegenüber der L/Ac-Gruppe signifikant niedriger.
- signifikant niedrigere mitochondriale Kapazitäten (Q_{max}) der Ob/Sed Gruppe und Pi-zu-ATP-Austauschfluss (FATP) im Vergleich zur L/Ac-Gruppe.
- Signifikante Erhöhung der Gesamtkonzentration von PDE (Phosphodiesterase) insbesondere von Glycerophosphocholin [GPC] in der Gruppe der regelmäßig Aktiven.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 17 August 2015

Accepted: 16 December 2015

Published: 03 February 2016

Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content

Ladislav Valkovič^{2,2,3,4}, Marek Chmelík^{1,2}, Barbara Ukropcová^{5,6}, Thomas Heckmann⁷, Wolfgang Bogner^{1,2}, Ivan Frollo³, Harald Tschann⁷, Michael Krebs⁸, Norbert Bachl⁷, Jozef Ukropec⁵, Siegfried Trattnig^{1,2} & Martin Krššák^{1,2,8}

Defects in skeletal muscle energy metabolism are indicative of systemic disorders such as obesity or type 2 diabetes. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (³¹P-MRS), in particularly dynamic ³¹P-MRS, provides a powerful tool for the non-invasive investigation of muscular oxidative metabolism. The increase in spectral and temporal resolution of ³¹P-MRS at ultra high fields (i.e., 7T) uncovers new potential for previously implemented techniques, e.g., saturation transfer (ST) or highly resolved static spectra. In this study, we aimed to investigate the differences in muscle metabolism between overweight-to-obese sedentary (Ob/Sed) and lean active (L/Ac) individuals through dynamic, static, and ST ³¹P-MRS at 7T. In addition, as the dynamic ³¹P-MRS requires a complex setup and patient exercise, our aim was to identify an alternative technique that might provide a biomarker of oxidative metabolism. The Ob/Sed group exhibited lower mitochondrial capacity, and, in addition, static ³¹P-MRS also revealed differences in the Pi-to-ATP exchange flux, the alkaline Pi-pool, and l-carnitine concentrations between the groups. In addition to these differences, we have identified correlations between dynamically measured oxidative flux and static concentrations of the alkaline Pi-pool and l-carnitine, suggesting the possibility of using high spectral resolution ³¹P-MRS data, acquired at rest, as a marker of oxidative metabolism.

² Durch Eheschließung änderten sich die Namen Heckmann zu Hochwartner / und Tuskova zu Klepochova

² Durch Eheschließung änderten sich die Namen Heckmann zu Hochwartner / und Tuskova zu Klepochova

¹ High Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. ² Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna, Austria. ³ Department of Imaging Methods, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. ⁴ Oxford Centre for Clinical MR Research (OxCMR), University of Oxford, Oxford, United Kingdom. ⁵ Obesity section, Diabetes and Metabolic Disease Laboratory, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. ⁶ Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. ⁷ Department of Sports and Physiological Performance, Centre of Sports Science, University of Vienna, Vienna, Austria. ⁸ Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.K. (email: martin.krssak@meduniwien.ac.at)

Obesity, resulting from an imbalance between energy intake and expenditure, is a worldwide epidemic associated with insulin resistance syndrome. Given that skeletal muscle accounts for almost half the total body mass and is responsible for the majority of glucose uptake and glycogen storage in response to insulin stimulus¹, the investigation of muscle energy expenditure is of particular importance with regard to the pathogenesis of obesity and metabolic syndrome. Recent studies showed that insulin resistance relates to abnormalities in energy metabolism, not only of skeletal muscle²⁻⁴, but also of the heart⁵ and liver⁶. The contractile activity of skeletal muscle is primarily regulated by the ATP synthesis rate⁷, which, under aerobic conditions in exercised muscle, is determined mainly by the oxidative phosphorylation capacity of mitochondria. Changes in muscle energy metabolism related to mitochondrial dysfunction could indicate defects in lipid metabolism (i.e., fatty acid oxidation)⁸, potentially resulting in the progression of metabolic disease such as type 2 diabetes even in a young, overweight-to-obese, sedentary population⁹⁻¹¹.

The non-invasive detection of intramyocellular energy metabolites (i.e., phosphocreatine [PCr], ATP, and inorganic phosphate [Pi]) is possible through phosphorous magnetic resonance spectroscopy (³¹P-MRS), which provides an ideal tool for the *in vivo* monitoring of cellular energy status and metabolism^{7,12}. Dynamic ³¹P-MRS, during exercise and recovery, in particular, allows direct estimation of the oxidative ATP synthesis rate in challenged muscle¹²⁻¹⁵, which reflects maximal mitochondrial capacity⁷. Altered mitochondrial metabolism is associated with obesity, elevated fasting glucose or insulin resistance¹⁶⁻²⁰. As the dynamic examinations require a complex setup, e.g., dedicated ergometers, and patient compliance throughout the whole exercise protocol, an alternative ³¹P-MRS technique for the assessment of energy metabolism at rest would constitute a significant advantage. The measurement of resting Pi-to-ATP flux (F_{ATP}) using ³¹P-MRS saturation transfer (ST), correlates with the findings of dynamic experiments^{21,22}. Although the absolute values of F_{ATP} do not provide a direct measure of oxidative metabolism²³, it has also been related to insulin resistance^{24,25}.

Recently, the use of ³¹P-MR spectra, measured in the equilibrium state, has been promoted to obtain similar information about muscle energy metabolism. In particular, the concentration of phosphodiesteres ([PDE]) was shown to correlate with the Pi-to-ATP flux²⁶. Moreover, an alkaline Pi pool (Pi₂) has been detected *in vivo* at ultra-high field (i.e., 7T)²⁷, and related to the PCr re-synthesis rate after exercise²⁸.

Our aim was to compare the skeletal muscle metabolism of overweight-to-obese sedentary (Ob/Sed) subjects, who are prone to type 2 diabetes, and lean active (L/Ac) individuals, using static and dynamic ³¹P-MRS measurements in the quadriceps femoris muscle at 7 T. In addition, the interrelations between the derived parameters were investigated to determine possible alternatives to exercise-recovery experiments.

Results

Between groups comparison.

In addition to a significantly higher BMI and lower VO_{2max} , the Ob/Sed individuals also differed from the L/Ac volunteers in the metabolic parameters derived from ³¹P-MRS. The concentration of the main muscular PDE (i.e., glycerophosphocholine [GPC]), as well as the total [PDE], were significantly higher, while the concentration of the alkaline Pi-pool ([Pi₂]) and its ratio to the main Pi concentration ([Pi₁]), i.e., (Pi₂/Pi), were significantly lower in the Ob/Sed group compared to the L/Ac group. In addition, the group of Ob/Sed subjects had significantly lower mitochondrial capacity (Q_{max}) and Pi-to-ATP exchange flux (F_{ATP}) values compared to the L/Ac group. Detailed information about the measured physiological and muscle energy metabolism parameters are listed in Table 1. In Fig. 1 are

27depicted representative ^{31}P -MR spectra acquired at rest and during the exercise-recovery experiment and Fig. 2 depicts the comparison between the groups.

Correlations between the measured parameters.

The measured concentration of PDE in the quadriceps muscle correlated positively with both age ($r = 0.45$, $p = 0.014$) and BMI ($r = 0.62$, $p = 0.0004$). BMI correlated negatively with the $[\text{Pi}_2]$ ($r = -0.56$, $p = 0.002$), as well as with the Pi_2/Pi ratio ($r = -0.44$, $p = 0.023$) and $Q_{\max}$ ($r = -0.39$, $p = 0.039$). The calculated F_{ATP} was also found to be negatively correlated with age ($r = -0.48$, $p = 0.009$) and BMI ($r = -0.51$, $p = 0.007$).

In addition, we have found correlations between the metabolic parameters extracted from the ^{31}P -MRS measurements performed at rest and the oxidative metabolism markers measured in a dynamic exercise-recovery experiment. The $[\text{PDE}]$ correlated negatively with $Q_{\max}$ ($r = -0.51$, $p = 0.005$), while both $[\text{Pi}_2]$ and Pi_2/Pi correlated with $Q_{\max}$ positively ($r = 0.68$, $p = 0.0001$ and $r = 0.65$, $p = 0.0002$, respectively). $Q_{\max}$ significantly correlated also with the k_{ATP} ($r = 0.51$, $p = 0.005$) and F_{ATP} ($r = 0.63$, $p = 0.0003$).

Several correlations were also found between the different parameters of muscular energy metabolism measured at rest. The $[\text{PDE}]$ correlated negatively with $[\text{Pi}_2]$ ($r = -0.63$, $p = 0.0003$), Pi_2/Pi ($r = -0.63$, $p = 0.0003$), k_{ATP} ($r = -0.54$, $p = 0.003$), and F_{ATP} ($r = -0.59$, $p = 0.001$). Both $[\text{Pi}_2]$ and Pi_2/Pi were correlated with k_{ATP} ($r = 0.41$, $p = 0.029$ and $r = 0.52$, $p = 0.005$), as well as with F_{ATP} ($r = 0.59$, $p = 0.001$ and $r = 0.45$, $p = 0.018$). All correlations of the evaluated metabolic parameters with the $[\text{PDE}]$ were also significant for the $[\text{GPC}]$. Representative correlations are depicted in Fig. 3.

Multivariate stepwise regression analysis of $Q_{\max}$ including physiological and metabolic parameters derived from ^{31}P -MRS data acquired at rest, identified $[\text{Pi}_2]$ ($r^2 = 0.46$, adjusted $r^2 = 0.44$, $p = 0.0001$) as the strongest and F_{ATP} ($r^2 = 0.54$, adjusted $r^2 = 0.50$, $p = 0.00001$) as the second-strongest independent predictor of $Q_{\max}$. Detailed results are given in Table 2.

Discussion

In this study, we compared parameters of skeletal muscle metabolism, measured by static and dynamic ^{31}P -MRS methods, between a group of overweight-to-obese sedentary subjects, who are prone to diabetes, and a group of lean active individuals. We have found that the combination of increased BMI and sedentary lifestyle leads to significant differences in the alkaline Pi pool in skeletal muscle, as well as in other metabolic ^{31}P -MRS parameters, such as the concentration of PDE, the Pi-to-ATP metabolic flux, and mitochondrial capacity. In addition, significant correlations were found between the concentration of PDE, the alkaline Pi_2/Pi ratio, and the resting Pi-to-ATP exchange rate and flux, measured by ^{31}P -MRS techniques at rest, and the maximal mitochondrial oxidative flux, measured by an exercise-recovery experiment.

Dynamic ^{31}P -MRS provides a parameter closely related to training status, i.e., the mitochondrial capacity ($Q_{\max}$) of the muscle tissue¹⁵. This was also demonstrated in our study, as the $Q_{\max}$ of the overweight-to-obese sedentary subjects was significantly lower when compared to active, lean individuals. The correlation between $Q_{\max}$ and BMI found in this study can be explained by the decreased physical activity in more obese individuals, as our regression analysis showed a primary connection of $Q_{\max}$ with other parameters of muscle metabolism and not with BMI. This is in good agreement with a recent *in vitro* study, which found no differences in mitochondrial

Variable	Overweight Obese/Sedentary	Lean/Active
N (female)	14 (5) ^o	15 (5)
Age (years)	34.6 ± 7.1	29.3 ± 5.5
BMI (kg.m ⁻²)	30.4 ± 2.3	23.1 ± 2.6*
Body fat (%)	35.2 ± 7.1	18.3 ± 6.1*
LBM (kg)	62.4 ± 10.9	63.0 ± 15.6
VO ₂ max (mL.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	36.8 ± 5.3	45.9 ± 3.1*
Steps per 24 hours	6052 ± 1166	11093 ± 4074*
static MRS		
[PDE] (mM)	4.21 ± 1.12	2.82 ± 1.00*
[GPC] (mM)	3.95 ± 1.04	2.47 ± 0.98*
[GPE] (mM)	0.26 ± 0.27	0.23 ± 0.17
[Pi ₂] (mM)	0.18 ± 0.07	0.28 ± 0.06*
Pi ₂ /Pi	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02*
pH _{rest}	7.06 ± 0.04	7.05 ± 0.03
[ADP] _{rest} (μ M)	10.1 ± 0.9	9.8 ± 0.6
ST		
kATP (s ⁻¹)	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01
FATP (mM.s ⁻¹)	0.25 ± 0.06	0.31 ± 0.04 [†]
kCK (s ⁻¹)	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.05
F _{CK} (mM.s ⁻¹)	9.26 ± 2.36	8.66 ± 2.40
Dynamic		
PCr drop (% signal)	38.4 ± 19.4	40.4 ± 13.9
τ _{PCr} (s)	40.9 ± 14.0	42.6 ± 15.8
VPCr (mM.s ⁻¹)	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.07
Q _{max} (mM.s ⁻¹)	0.50 ± 0.08	0.58 ± 0.07 [†]
pH _{end exercise}	6.97 ± 0.14	6.90 ± 0.16
[ADP] _{end exercise} (μ M)	47.8 ± 32.0	40.9 ± 15.5

Table 1. Characteristics of the studied groups and results of muscle energy metabolism measurements via static ³¹P-MRS, saturation transfer, and dynamic experiments. Data are given as mean ± standard deviation. ^oFor one volunteer from the overweight-to-obese sedentary group, only dynamic experiment data are available. Significant differences (unpaired t-test) between the groups are depicted as follows: **p* < 0.01; [†]*p* < 0.05.

respiratory capacity and mitochondrial content in myocellular tissue samples between lean and obese subjects with similar training status²⁹. Similarly, a different *in vivo* study did not find any changes in mitochondrial capacity in humans after weight reduction stimulated by diet-only; however, if combined with increased physical activity, an improvement in aerobic capacity was observed³⁰.

Significantly higher myocellular PDE levels were found in our Ob/Sed subjects when compared to the L/Ac group. This was further supported with the positive correlation found between [PDE] and BMI. This is in good agreement with the finding of a previous report by Szendroedi *et al.*²⁶ in subjects with a comparable physical activity index. A correlation of [PDE] and age was also reported, in the current study and in^{26,31}; however, our regression analysis showed that physical activity and BMI, rather than age, primarily predict the PDE levels (data not shown). The increased spectral resolution of the 7 T MR system, used in our study, reveals that the measured [PDE] is mainly attributable to [GPC], with only a small contribution from glycerophosphoethanolamine ([GPE]), and that, in fact, it

is the [GPC] that is responsible for the differences between the two groups. This separation in PDE signals was not visible in the previous study performed at 3 T²⁶.

The ratio of alkaline Pi₂ to cytosolic Pi (Pi₂/Pi) was lower in the Ob/Sed group in comparison to the L/Ac group. Recently, van Oorschot *et al.* reported a dependence of Pi₂/Pi, measured in the vastus lateralis, on the training status, when they compared highly trained runners with normally active individuals²⁸. The potential influence of BMI was, however, not considered in the aforementioned study. The results of our study suggest such a dependence of the Pi₂/Pi ratio in skeletal muscle on BMI, as a linear correlation between BMI and Pi₂/Pi was found. Nevertheless, the results of our regression analysis identified only [GPC] and Q_{max} as the primary predictors of the Pi₂/Pi (data not shown). The differences in Pi₂/Pi found between the groups can be directly attributed to the changes in [Pi₂], which was also significantly higher in the L/Ac group in comparison to the Ob/Sed group.

Although the mean F_{ATP} values of our Ob/Sed group (F_{ATP} = 0.25 ± 0.06 mM.s⁻¹) are still above the decreased values reported previously in patients with type 2 diabetes (F_{ATP} = 0.21 ± 0.05 mM.s⁻¹)²⁵ the physical inactivity together with the overweight of our volunteers caused a significant reduction in the myocellular Pi-to-ATP metabolic flux, when compared to L/Ac individuals (F_{ATP} = 0.31 ± 0.04 mM.s⁻¹).

Interrelations between metabolic parameters measured by dynamic and static ³¹P-MRS. We report several correlations between the parameters of static ³¹P-MR spectra, exchange rates and metabolite fluxes

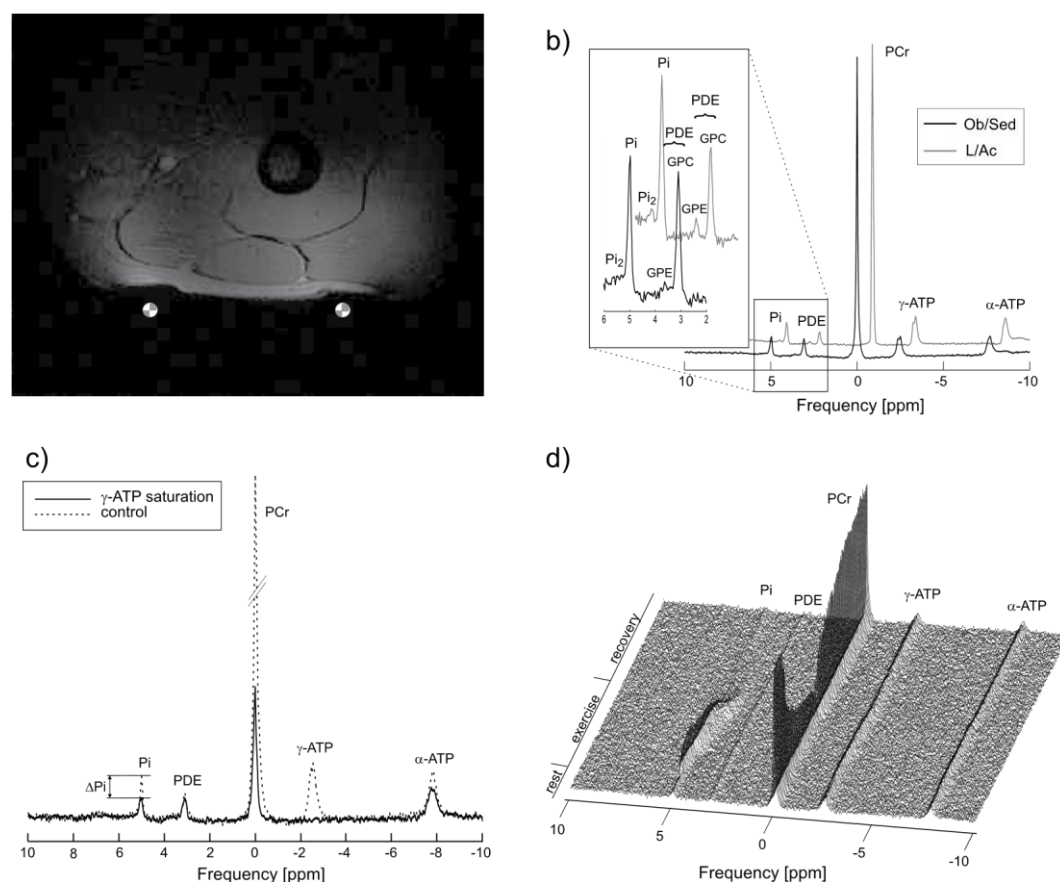


Figure 1. (a) An *in vivo* localizer image of the human thigh with the depicted coil position. (b) Highly spectrally resolved representative ³¹P-MR spectra from an obese sedentary and lean active subject, scaled to PCr signal intensity. The area of Pi and PDE peaks is enlarged. Note higher Pi₂ and lower PDE signal intensity in the L/Ac

subject. (c) Saturation transfer spectra showing the effect of γ -ATP saturation (solid line) on its chemical exchange partner, Pi, compared with the control experiment (dashed line). (d) Time course of the ^{31}P spectra during a dynamic ^{31}P -MRS experiment. Note the PCr signal depletion during exercise and its re-synthesis during recovery.

.....

measured by ST at rest, and oxidative metabolism markers measured by exercise-recovery experiments. The alkaline Pi_2 resonance is suspected to represent mitochondrial density in the muscle tissue and depends on the amount of regular physical activity²⁸. Its relation to training status was also confirmed in our study, as the $[\text{Pi}_2]$, as well as Pi_2/Pi , positively correlated with the maximal oxidative flux (Q_{max}), determined during the dynamic experiment, and also with the k_{ATP} and F_{ATP} , defining the Pi-to-ATP exchange rate and metabolic flux. Linear correlations between Q_{max} and metabolic parameters measured by ST experiments at rest (i.e., k_{ATP} and F_{ATP}) reported in our previous study on overweight-to-obese subjects²², were also found in this study combining the two different population groups. In addition, the multivariate regression analysis identified $[\text{Pi}_2]$ and F_{ATP} as independent predictors of Q_{max} , suggesting the potential use of highly spectrally resolved static ^{31}P -MRS at 7 T and ST as alternative techniques to dynamic exercise-recovery experiments.

The identified correlation between [PDE] and measured Pi-to-ATP metabolite flux (F_{ATP}) is in good agreement with a recent report by Szendroedi *et al.*²⁶. Significant correlations were found also between [PDE] and mitochondrial capacity (Q_{max}), as well as other ^{31}P -MR parameters of muscle metabolism measured at rest, i.e., $[\text{Pi}_2]$, Pi_2/Pi , and k_{ATP} . In addition, the main contributors to total [PDE] were analyzed and all [PDE] correlations were also significant for [GPC]. Our results suggest the potential of using [PDE], or, if distinguishable (i.e., at 7 T) directly, the [GPC], as a surrogate biomarker of skeletal muscle energy metabolism. Although it is not perfectly clear what links GPC to muscle energy metabolism, previous studies support this finding^{32–37}. In particular, Farber *et al.*, studying a model of membrane defect of Alzheimer's disease, reported that an inhibition of oxidative phosphorylation causes accumulation of GPC through accelerated PC turnover³⁴. Impaired oxidative metabolism and elevated PDE levels have been also reported in patients with spinal cord injury³⁵ and congenital lipodystrophy³⁶. Muscular PDE content was also related to glucometabolic control in type II diabetes²⁶. Furthermore, excessive amounts of PDE have been reported in fibromyalgia³³, Duchenne muscular dystrophy³², or Becker muscular dystrophy³⁷, connecting abnormal membrane metabolism with muscle dysfunction. Nonetheless, further investigations of this relation are still necessary.

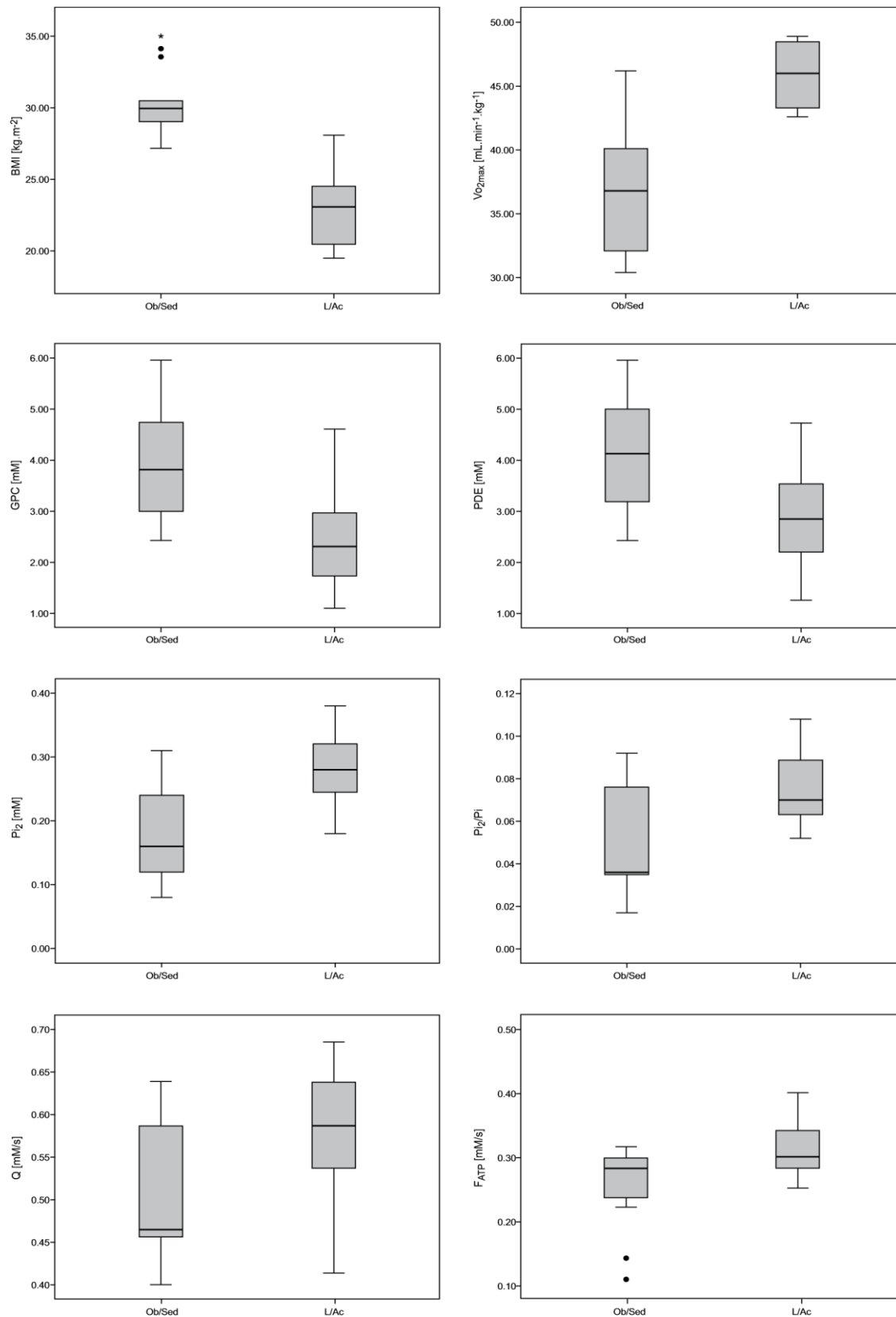


Figure 2. Box plots depicting the significantly different physiological and metabolic parameters between the two groups. The solid lines represent the median, boxes represent lower and upper quartiles, and whiskers the minimum and maximum. Outliers and extreme outliers are denoted by circles and stars, respectively. The outliers were also taken into account for all statistical tests.

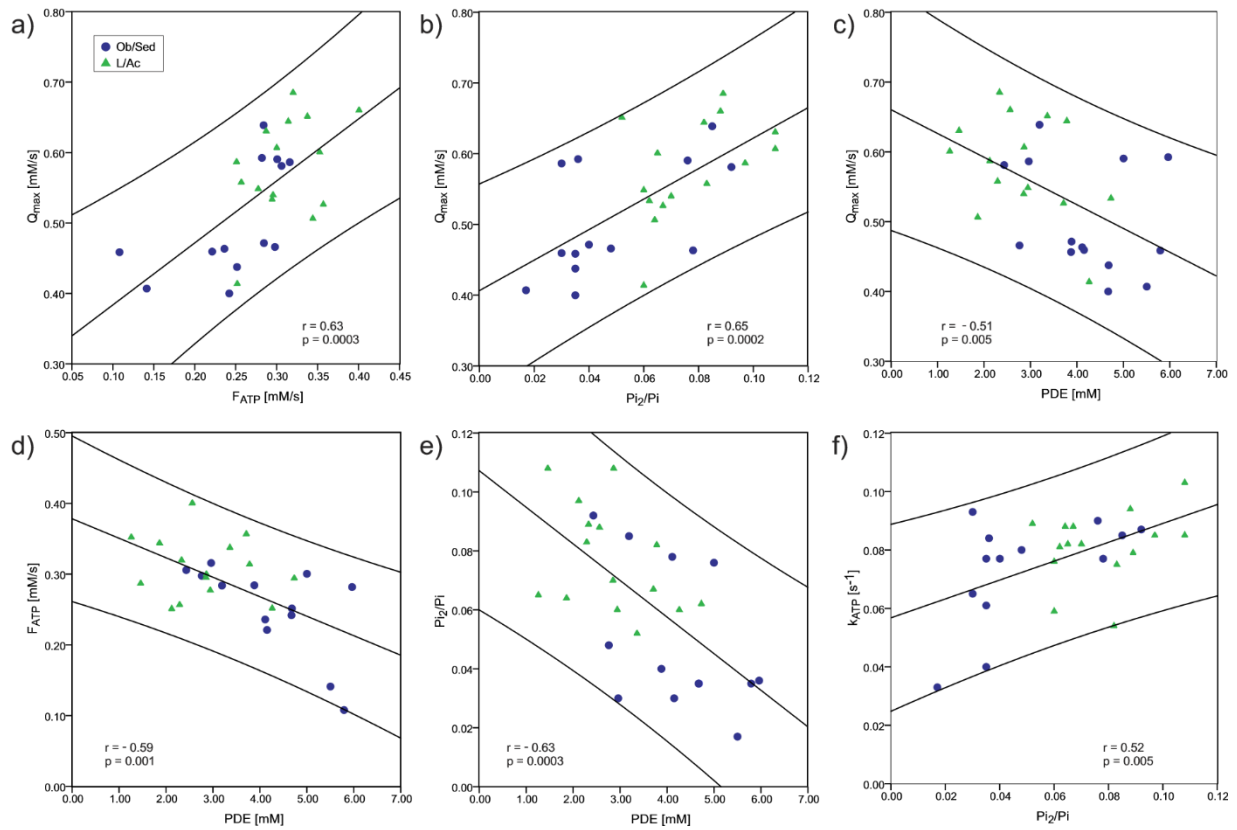


Figure 3. Plots of correlations between myocellular energy metabolism parameters measured by dynamic and static ^{31}P -MRS in Ob/Sed (●) and L/Ac (▲) individuals: (a) mitochondrial capacity (Q_{max}) with the Pi-to-ATP forward metabolic flux at rest (F_{ATP}); (b) Q_{max} with the ratio of alkaline Pi to main Pi (Pi_2/Pi); and (c) Q_{max} with the concentration of phosphodiesterases ([PDE]). Further correlations of the ^{31}P -MRS parameters measured at rest: (d) F_{ATP} with [PDE]; (e) Pi_2/Pi with [PDE]; and (f) Pi-to-ATP exchange rate constant (k_{ATP}) with Pi_2/Pi . 95% confidence intervals are also depicted.

Independent variables per Q_{max}	F value	p value
Pi_2^*	22.035	0.0001
F_{ATP}^*	14.653	0.0001
Pi_2/Pi	< 0.05	0.217
BMI	< 0.05	0.536
k_{ATP}	< 0.05	0.537
GPC	< 0.05	0.689
PDE	< 0.05	0.940
age	< 0.05	0.961

Table 2. Results of multivariable stepwise regression of Q_{max} (dependent variable) and physiological and metabolic variables measured at rest (independent variable). *Variables accepted into the model as predictors; all other variables not accepted into the model.

The findings of this study support our previous report on correlations between dynamic and ST parameters in this Ob/Sed group²² and provide additional information through analysis of Pi_2/Pi and GPC, and moreover, by comparison to a lean active group of individuals. As to the technical limitations of our study, we should note that although care was taken to perfectly reposition the subject in the second MR system, when applicable, some small mislocalizations could not be fully excluded. The effect of individual anatomy must be also considered, as the localization through the sensitivity of the

surface coil used in this study might cover different portions of the quadriceps muscles between subjects. Localization techniques, recently proposed for dynamic examinations of the lower leg muscles, e.g., frequency selective ^{31}P -MRI^{38–40}, semi-LASER for single voxel localization⁴¹ or depth-resolved surface coil MRS⁴², could be used in future studies to measure muscle-specific metabolism. However, the muscles of the quadriceps covered by the sensitivity volume of the used surface coil are all active during knee-extension⁴³, and, therefore, the inter-subject variability of the covered muscle volumes should have had only a minor effect on our results.

In conclusion, overweight-to-obese sedentary pre-diabetics exhibit increased concentrations of glycerophosphocholine, a lower amount of alkaline Pi, a slower Pi-to-ATP exchange rate, and decreased mitochondrial capacity compared to lean active individuals. Associations found between the parameters of myocellular metabolism measured at rest and during exercise suggest that highly spectrally resolved static ^{31}P -MRS and saturation transfer measurements at rest could provide markers of muscle mitochondrial metabolism.

Methods

Fifteen young, overweight-to-obese, sedentary individuals (10/5 male/female; age 34.6 ± 7.1 years) with a body mass index (BMI) $\geq 27.0 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, a sedentary lifestyle without regular physical activity, no pharmacotherapy, and no medical history of type 2 diabetes were recruited for this study and classified as the overweight-to-obese/sedentary (Ob/Sed) group. Thirteen of these volunteers had already participated in our previous study on the interrelations between mitochondrial capacity and Pi-to-ATP exchange rates in this particular type of population²². Fifteen young, lean, physically active participants (10/5 male/female; age 29.3 ± 5.5 years) were recruited for the current study as the control lean/active (L/Ac) group.

Written, informed consent was obtained from each participant in the study after an explanation of the purpose, nature and potential risks of the study. The examination protocol was approved by the appropriate institutional ethical boards of the Medical University of Vienna and of the University Hospital Bratislava, Comenius University Bratislava, and the study was carried out in accordance with the approved guidelines.

Physiological tests.

Within a week before the MR examination, the participants underwent a physical examination and physiological testing. BMI was measured by an analog weight scale and standard measuring tape. Bioelectric impedance, measured using an Omron BF511 (Omron Healthcare, Matsusaka, Japan), was used to evaluate total adiposity (%Fat) and to estimate the lean body mass (LBM). The maximal aerobic capacity (i.e., whole-body oxygen uptake [$\text{VO}_{2\text{max}}$]) was measured during an incremental exercise test performed on a Lode Corival cycle ergometer (Lode, Groningen, The Netherlands). Continuous measurement of the gas exchange rate was obtained with the Ergostik (Geratherm Respiratory, Bad Kissingen, Germany), and the maximal oxygen consumption rate was expressed relative to LBM. The ergometry was performed at least three days prior to the MR examinations. The activity level was evaluated based on two working days and a weekend of accelerometer recordings and expressed as the number of steps per 24 hours.

^{31}P -MRS.

Each participant underwent the entire MR examination protocol in one day, starting two hours after a standardized meal. The dynamic ^{31}P -MRS exercise-recovery experiment was performed on either a 7 T MR system (Magnetom, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) or a 3 T MR system (TIM Trio) from the same manufacturer, due to initial compatibility problems of our ergometer (Quadspect, Ergospect, Innsbruck, Austria) with the 7 T. Dual-tuned (^{31}P - ^1H) circular surface coils (10 cm diameter, Rapid Biomedical, Rimpfing, Germany), with similar sensitivity volumes²² were used on both MR systems. The use of two MR systems, equipped with the same ergometer and surface coils with a similar

sensitivity volume, has recently been shown to have no effect on the metabolic data derived from dynamic ^{31}P -MRS⁴⁴.

Static ^{31}P -MRS experiments were performed exclusively at 7 T, as the increased spectral resolution is necessary for separation of the Pi_2 , as well as the GPE and GPC signals²⁷, and the increase in signal-to-noise ratio allows significant reduction in measurement time of the ST experiment, compared to 3 T⁴⁵. The subjects were investigated while lying inside the MR scanner with the surface coil fixed to the quadriceps femoris muscle (Fig. 1a) and the coil positions were marked to allow precise repositioning in the other MR system, if applicable. When the dynamic measurements were performed at 3 T (i.e., in case of first 10 Ob/Sed subjects), the order of examinations was randomized to allow simultaneous examinations of two subjects; otherwise the measurements at rest were always performed prior to the exercise-recovery experiment.

For the assessment of intramyocellular metabolite concentrations and the Pi_2/Pi ratio, a pulse-acquire ^{31}P -MR spectrum (acquisition delay = 0.4 ms; repetition time = 15 s; bandwidth = 5 kHz; 16 averages in 4 minutes) was acquired at rest (Fig. 1b) and corrected for longitudinal relaxation times, as measured for ^{31}P muscle metabolites at 7 T^{27,46}. The γ -ATP signal was used as an internal concentration reference, assuming a stable ATP concentration of 8.2 mM in the skeletal muscle¹².

The exchange rate between ATP and Pi (i.e., ATP synthesis) was investigated using an ST experiment applying continuous irradiation, and the apparent longitudinal relaxation time (T_1^{app}) was determined via an inversion recovery experiment, as described previously⁴⁵. The total measurement time of the ST experiment was under 9 minutes.

The exercise-recovery protocol involved six minutes of repeated knee extensions against an air pressure, set to 30% of the maximal voluntary contraction force, once every repetition time (i.e., 2 s), followed by six minutes of recovery¹⁵. The volunteers were instructed by an audio signal to time the contraction-relaxation periods, so that the spectra were acquired always in the relaxed state of the muscle.

Analyses and calculations.

Due to patient noncompliance ($n_{\text{Ob/Sed}}=1$) and technical problems ($n_{\text{Ob/Sed}}=1$), 28 complete datasets and one incomplete dataset (dynamic ^{31}P -MRS only), were available for analyses.

All acquired ^{31}P -MR spectra were analyzed using jMRUI software with the AMARES time domain fitting algorithm⁴⁷. The resonance lines of PCr, two Pi signals, and two PDEs—glycero-phosphocholine (GPC) and glycero-phosphoethanolamine (GPE)—were fitted as single Lorentzians, whereas γ - and α -ATP were fitted as doublets and β -ATP as a triplet. The line width of the Pi_2 peak was constrained with respect to the line width of the main Pi peak, and the expected frequency difference between Pi_2 and Pi was set to ~ 0.4 ppm, to ensure a good fit for the Pi_2 peak^{27,28}. The shift in resonance position between PCr and Pi signals in parts per million (δ) was used to calculate intramyocellular pH⁴⁸, according to the Henderson-Hasselbalch equation: $\text{pH} = 6.75 + \log((\delta - 3.27) / (5.63 - \delta))$. The free cytosolic ADP concentration ([ADP]) was calculated according to the method described by Kemp *et al.*⁴⁹, assuming that 15% of total creatine [Cr] was not phosphorylated in the resting state⁵⁰.

The chemical exchange rate constant (k_{ATP}) was calculated from the fractional reduction of Pi magnetization upon selective saturation of γ -ATP (Fig. 1c)⁴⁵. The resting unidirectional forward exchange flux was then calculated as $F_{\text{ATP}} = k_{\text{ATP}} \times [\text{Pi}]$.

To calculate the time constant of PCr resynthesis (τ_{PCr}), the PCr signal changes during the recovery period of the dynamic experiment (Fig. 1d) were fitted to a monoexponential function using MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA). The initial PCr recovery rate (V_{PCr}), which roughly represents ATP turnover at the end of exercise, was determined and used to calculate the maximal rate of oxidative phosphorylation (Q_{max}) according to the ADP-based model of Michaelis and Menten⁴⁹.

Data are presented as means $\pm$ standard deviations and compared between the groups by an unpaired Student t-test. The relationships between metabolic parameters were analyzed by linear regression analysis, using Pearson's correlation coefficient, to estimate the strength of the relationship. Multivariate stepwise regression analysis for the dependent variable $Q_{\max}$ was performed using the independent variables (i.e., BMI, age, [PDE], [GPC], $[Pi_2]$, Pi_2/Pi , k_{ATP} , and F_{ATP}). A similar multivariate regression analysis was performed for the dependent variables [PDE] and Pi_2/Pi . The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Data. Parts of the data were presented as abstracts at the following meetings: ISMRM 2012 Melbourne Australia, ISMRM 2015 Toronto Canada. Some ^{31}P -MRS data of the dynamic and ST experiment, from the Ob/Sed group exclusively, were published in the *NMR in Biomedicine* journal (ref. 22).

References

- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C. & Ferrannini, E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. **15**, 318–368 (1992).
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V. & Ritov, V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. **51**, 2944–2950 (2002).
- Rabøl, R., Boushel, R. & Dela, F. Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*. **31**, 675–683 (2006).
- Little, J. P. *et al.* Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *J Appl Physiol* (1985). **111**, 1554–1560 (2011).
- Perseghin, G. *et al.* Abnormal left ventricular energy metabolism in obese men with preserved systolic and diastolic functions is associated with insulin resistance. *Diabetes Care*. **30**, 1520–1526 (2007).
- Schmid, A. I. *et al.* Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **34**, 448–453 (2011).
- Kemp, G. J. & Radda, G. K. Quantitative interpretation of bioenergetic data from ^{31}P and ^1H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q*. **10**, 43–63 (1994).
- Hood, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). **90**, 1137–1157 (2001).
- Morino, K., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. **55** Suppl 2, S9–S15 (2006).
- Ukropec, J. *et al.* Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health. *Arch Physiol Biochem*. **114**, 357–368 (2008).
- Wells, G. D. *et al.* Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can J Neurol Sci*. **35**, 31–40 (2008).
- Kemp, G. J., Meyerspeer, M. & Moser, E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle *in vivo* by ^{31}P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed*. **20**, 555–565 (2007).
- Quistorff, B., Johansen, L. & Sahlin, K. Absence of phosphocreatine resynthesis in human calf muscle during ischaemic recovery. *Biochem J*. **291** (Pt 3), 681–686 (1993).
- Tonson, A. *et al.* Muscle energetics changes throughout maturation: a quantitative ^{31}P -MRS analysis. *J Appl Physiol* (1985). **109**, 1769–1778 (2010).
- Layec, G. *et al.* Comparative determination of energy production rates and mitochondrial function using different ^{31}P MRS quantitative methods in sedentary and trained subjects. *NMR Biomed*. **24**, 425–438 (2011).
- Newcomer, B. R., Larson-Meyer, D. E., Hunter, G. R. & Weinsier, R. L. Skeletal muscle metabolism in overweight and postoverweight women: an isometric exercise study using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **25**, 1309–1315 (2001).
- Scheuermann-Freestone, M. *et al.* Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. **107**, 3040–3046 (2003).
- Schrauwen-Hinderling, V. B. *et al.* Impaired *in vivo* mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. *Diabetologia*. **50**, 113–120 (2007).
- Perry, C. G., Kane, D. A., Lanza, I. R. & Neuffer, P. D. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes*. **62**, 1041–1053 (2013).
- Faraut, B. *et al.* Capsaicin administration results in an uncoupling protein-3 downregulation, an enhanced muscle oxidative capacity and a decreased abdominal fat content *in vivo*. *Int J Obes (Lond)*. **33**, 1348–1355 (2009).
- Schmid, A. I. *et al.* Comparison of measuring energy metabolism by different ^{31}P magnetic resonance spectroscopy techniques in resting, ischemic, and exercising muscle. *Magn Reson Med*. **67**, 898–905 (2012).
- Valkovič, L. *et al.* Interrelation of ^{31}P -MRS metabolism measurements in resting and exercised quadriceps muscle of overweight-to-obese sedentary individuals. *NMR Biomed*. **26**, 1714–1722 (2013).
- Kemp, G. J. & Brindle, K. M. What do magnetic resonance-based measurements of $Pi \rightarrow ATP$ flux tell us about skeletal muscle metabolism? *Diabetes*. **61**, 1927–1934 (2012).
- Petersen, K. F. *et al.* Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. **350**, 664–671 (2004).
- Szendroedi, J. *et al.* Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes. *PLoS Med*. **4**, e154 (2007).
- Szendroedi, J. *et al.* Skeletal muscle phosphodiester content relates to body mass and glycemic control. *PLoS One*. **6**, e21846 (2011).
- Kan, H. E. *et al.* *In vivo* ^{31}P MRS detection of an alkaline inorganic phosphate pool with short T1 in human resting skeletal muscle. *NMR Biomed*. **23**, 995–1000 (2010).
- van Orschot, J. W. *et al.* ^{31}P MR spectroscopy and computational modeling identify a direct relation between Pi content of an alkaline compartment in resting muscle and phosphocreatine resynthesis kinetics in active muscle in humans. *PLoS One*. **8**, e76628 (2013).
- Fisher-Wellman, K. H. *et al.* Mitochondrial respiratory capacity and content are normal in young insulin-resistant obese humans. *Diabetes*. **63**, 132–141 (2014).
- Toledo, F. G. *et al.* Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes*. **57**, 987–994 (2008).
- Satrustegui, J. *et al.* An *in vivo* phosphorus nuclear magnetic resonance study of the variations with age in the phosphodiester content of human muscle. *Mech Ageing Dev*. **42**, 105–114 (1988).
- Younkin, D. P. *et al.* ^{31}P NMR studies in Duchenne muscular dystrophy: age-related metabolic changes. *Neurology*. **37**, 165–9 (1987).

33. Park, J. H. *et al.* Use of P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect metabolic abnormalities in muscles of patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* **41**, 406–13 (1998).
34. Farber, S. A., Slack, B. E. & Blusztajn, J. K. Acceleration of phosphatidylcholine synthesis and breakdown by inhibitors of mitochondrial function in neuronal cells: a model of the membrane defect of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **14**, 2198–206 (2000).
35. McCully, K. K., Mulcahy, T. K., Ryan, T. E. & Zhao, Q. Skeletal muscle metabolism in individuals with spinal cord injury. *J Appl Physiol* (1985). **111**, 143–8 (2011).
36. Sleight, A. *et al.* Mitochondrial oxidative phosphorylation is impaired in patients with congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* **97**, E438–42 (2012).
37. Wokke, B. H. *et al.* Muscle MRS detects elevated PDE/ATP ratios prior to fatty infiltration in Becker muscular dystrophy. *NMR Biomed.* **27**, 1371–7 (2014).
38. Parasoglou, P., Xia, D., Chang, G. & Regatte, R. R. Dynamic three-dimensional imaging of phosphocreatine recovery kinetics in the human lower leg muscles at 3T and 7T: a preliminary study. *NMR Biomed.* **26**, 348–356 (2013).
39. Parasoglou, P., Xia, D., Chang, G. & Regatte, R. R. Three-dimensional saturation transfer (31)P-MRI in muscles of the lower leg at 3.0 T. *Sci Rep.* **4**, 5219 (2014).
40. Schmid, A. I. *et al.* Dynamic PCr and pH imaging of human calf muscles during exercise and recovery using (31)P gradient-Echo MRI at 7 Tesla. *Magn Reson Med.* (2015).
41. Fiedler, G. B. *et al.* Localized semi-LASER dynamic (31)P magnetic resonance spectroscopy of the soleus during and following exercise at 7 T. *MAGMA.* **28**, 493–501 (2015).
42. Valkovič, L. *et al.* Depth-resolved surface coil MRS (DRESS)-localized dynamic (31)P-MRS of the exercising human gastrocnemius muscle at 7 T. *NMR Biomed.* **27**, 1346–1352 (2014).
43. Richardson, R. S., Frank, L. R. & Haseler, L. J. Dynamic knee-extensor and cycle exercise: functional MRI of muscular activity. *Int J Sports Med.* **19**, 182–187 (1998).
44. Šedivý, P. *et al.* Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys.* **42**, 1678–1689 (2015).
45. Valkovič, L. *et al.* Time-resolved phosphorous magnetization transfer of the human calf muscle at 3 T and 7 T: a feasibility study. *Eur J Radiol.* **82**, 745–751 (2013).
46. Bogner, W. *et al.* Assessment of (31)P relaxation times in the human calf muscle: a comparison between 3 T and 7 T *in vivo*. *Magn Reson Med.* **62**, 574–582 (2009).
47. Vanhamme, L., van den Boogaart, A. & Van Huffel, S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson.* **129**, 35–43 (1997).
48. Moon, R. B. & Richards, J. H. Determination of intracellular pH by 31P magnetic resonance. *J Biol Chem.* **248**, 7276–7278 (1973).
49. Kemp, G. J. *et al.* Quantitative analysis by 31P magnetic resonance spectroscopy of abnormal mitochondrial oxidation in skeletal muscle during recovery from exercise. *NMR Biomed.* **6**, 302–310 (1993).
50. Boska, M. ATP production rates as a function of force level in the human gastrocnemius/soleus using 31P MRS. *Magn Reson Med.* **32**, 1–10 (1994).

Acknowledgements

This work was supported by the Christian Doppler Society–Clinical Molecular MR Imaging (MOLIMA to S.T.), by the OeNB Jubilaeumsfond (grant #15363 to M.Krš., #15455 to L.V. and #16133 to W.B.), by the AKTION Austria–Slovak Republic (grant #2013-10-15-004), by an EFSD & Lilly research fellowship to B.U., by the Slovak Grant Agency (VEGA grants #2/0013/14, #2/0192/14 and APVV grant #0431-12), and by a Sir Henry Dale Fellowship from the Wellcome Trust and the Royal Society [098436/Z/12/Z].

Author Contributions

L.V., B.U., J.U. and M.K. designed the study, L.V., M.C. and T.H. acquired and analyzed the data. L.V. and M.K. wrote the manuscript. W.B., I.F., H.T., M.K., N.B., J.U. and S.T. contributed to the discussion and all authors reviewed the final form of the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Valkovič, L. *et al.* Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. *Sci. Rep.* **6**, 20087; doi: 10.1038/srep20087 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

5.2 ¹H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7T.

Von großem Interesse war daher die Veränderungen des Muskelenergie-Metabolismus im Zusammenhang mit den Unterschieden in der mitochondrialen Kapazität welche auf Funktionen bzw. ein Regulationsdefizite im Lipidstoffwechsel hindeuten (Hood, 2001), was möglicherweise zu einem Fortschreiten der metabolischen Erkrankung wie Typ-2-Diabetes (Morino, Petersen, & Schulman, 2006; Ukropec, 2008; Wells, 2008) führt.

Durch weitere Untersuchungen und Tests welche am 7 Tesla durchgeführt wurden hat sich aufgrund der verschiedener diverseren Messveränderungen und Spektrumserweiterungen die Möglichkeit ergeben Acetylcarnetin aus dem Spektrum der messbaren Parameter zu identifizieren und zu isolieren, wodurch eine Quantifizierung möglich wurde.

Diese Möglichkeit der Erkennung wurde von der Kollegin Radka Tuskova beim 24 ISMRM Meeting in Singapore vorgestellt und wurde mit dem „Summa cum Laude Merit Award“ ausgezeichnet. Das nachfolgende Paper zeigt die Untersuchungsmethodik an 4 Probanden um eine bestmögliche Bestimmung der Acetylcarnetinkonzentration im M. soleus und M. vastus medialis.

¹H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7T.

R. Tušková^{1,2,3}, L. Valkovič^{1,3,4,5}, M. Gajdošík^{1,3}, T. Heckmann⁶, N. Bachl⁶, H. Tschan⁶, S. Trattnig^{1,3}, M. Krššák^{1,3,7}
¹High-Field MR Center, Department of Biomedical Imaging and Image-Guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna, Austria, ²Department of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia, ³Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna, Austria, ⁴University of Oxford Centre for Clinical Magnetic Resonance Research, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom, ⁵Department of Imaging Methods, Institute of Measurements Science, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, ⁶Center of Sport Science and University Sport, University of Vienna, Vienna, Austria, ⁷Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Synopsis: Carnitine plays an important role in fat metabolism. A long-echo time (TE of 350ms) proton magnetic resonance spectroscopy protocol was implemented for detection of skeletal muscle acetylcarnitine at rest on a clinical 7T scanner in the calf (soleus) and thigh (vastus lateralis) muscle. T₂ relaxation times of the 2.13 ppm signal of acetylcarnitine at 7T were assessed as 137.8±47.7ms. Concentrations of acetylcarnitine in vastus lateralis muscle in four healthy volunteers were found to be 1.69±0.21mmol/kg wet weight, whereas lower concentrations (i.e., 0.54±0.19mmol/kg) were found in soleus muscle.

Introduction: Carnitine plays an important role in fat metabolism, as it serves as a shuttle for acetyl groups from cytosol to mitochondrial matrix [1]. Therefore, it is crucial in glucose metabolism and pathogenesis of insulin resistance and of type 2 diabetes mellitus [2]. The main reservoir of carnitine is skeletal muscle. Acetylcarnitine (AC) could be observed at 2.13 and 3.17ppm chemical shifts in proton (¹H) MR spectra. The fact, that in *in vivo* the AC line at 2.13ppm overlaps with lipid resonances and the line at 3.17ppm with trimethyl ammonium (TMA) peak, hinders a straight-forward detection and quantification of AC in skeletal muscle. Typically, the altered carnitine mechanism and increased concentration of AC after exercise enables the detection of AC [3] in difference spectra. Recently, the differences

in T₂-relaxation times of AC and lipids have been employed for detection of the 2.13ppm line of AC in long TE ¹H MR spectroscopy (MRS) of quadriceps muscle at rest at 3T [4].

In this work we aimed to detect the AC resonance at 2.13ppm in calf (soleus) muscle and thigh muscle (vastus lateralis) in m. quadriceps femoris at rest, using long TE MRS at 7T; to determine its T₂- relaxation times; and to compare the AC concentrations in both muscle groups.

Methods: All measurements were performed on a 7T whole body Magnetom MR system (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). A 28 channel knee coil (QED, Mayfield Village, OH, USA) was used to acquire spectra from the calf and quadriceps muscles of the left leg. Four healthy, active, male volunteers (age 30.2±4.0 years, BMI 23.2±0.7 kg/m²) were recruited for this study. Spatial selection was achieved using a STEAM localization sequence (TR/TE=2000/350ms, spectral bandwidth=3kHz, number of averages=128, delta frequency=2.5ppm, preparation scans=4). The voxel of interest (40x35x15mm³) was placed in the soleus (SOL) or vastus lateralis (VL) muscles. Due to the long TE applied, water suppression was redundant. For the assessment of T₂-relaxation time of AC peak at 2.13ppm at 7T a series of seven spectra with variable TE's (100-450ms) were acquired in both muscles in all volunteers. Remaining sequence parameters were identical. All spectra were fitted in AMARES in the jMRUI software [5]. T₂-relaxation time was calculated in MATLAB by fitting the data with the mono exponential function $M_{TE} = M_0 \cdot e^{(-TE/T_2)}$. Using the residual water peak as an internal reference the absolute concentration of AC (in mmol/kg) was calculated according to the formula for molar concentration in wet weight:

$$C_{AC} = (S_{AC}/S_w) \cdot (CF_w/CF_{AC}) \cdot c_w \cdot n_w \cdot w\%$$

where S are signals of metabolites (w-water, AC-acetylcarnitine), CF are correction factors for T₂ relaxation, c_w=55 mol/L is the molar concentration of the water, n_w=2 is the number of protons in a water molecule and w% is the approximate water content of skeletal muscle tissue, i.e. 0.7 l/kg wet weight of the tissue.

Results: Using long TE, we were able to detect AC resonance line at 2.13ppm at rest in both muscles (fig. 1) in all four volunteers. The T₂ of AC in VL muscle was found to be 137.8±47.7ms (Tab. 1) and the comparison of visibility of the AC signal at different TE's is shown in fig. 2. Unfortunately we were not able to resolve the AC peak in SOL muscle spectra with short TE. However, the T₂ of TMA, lipids and water peak in SOL are almost equal as in VL muscle, so we can assume similar T₂ of AC in SOL muscle as well. Concentrations of AC from SOL and VL muscles are shown in Tab. 2.

Discussion: Our results demonstrate effective detection of AC using long TE at rest at 7T in both muscle groups. The assessed concentration of AC from VL in healthy volunteers was found to be 1.69±0.21mmol/kg wet weight, which is in good agreement with the results of Lindeboom et al. who reported 1.58±0.30 mmol/kg in endurance-trained subjects [4]. The AC concentration in SOL at rest was found to be lower, i.e., 0.54±0.19mmol/kg. Observed differences in skeletal muscle AC among different volunteers could be caused due to different training status, as was shown in study by Lindeboom et al. [4].

Conclusion: The long-TE ¹H MRS measurement at 7T represents a successful method for the detection and quantitation of AC at rest. This method can be applied to clarify the role of AC levels in relation to impaired mitochondrial oxidation of fatty acids and insulin resistance in different skeletal muscle groups.

References:

- [1] H. Karlic and A. Lohninger, *Nutrition*, vol. 20, no. 7–8, pp. 709–715, 2004.
- [2] G. Mingrone, "Ann. N. Y. Acad. Sci.", vol. 1033, no. 1, pp. 99–107, Nov. 2004.
- [3] J. Ren, S. Lakoski, R. G. Haller, a. D. Sherry, and C. R. Malloy, *Magn. Reson. Med.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–

17, 2013.

- [4] L. Lindeboom, C. I. Nabuurs, J. Hoeks, B. Brouwers, E. Phielix, M. E. Kooi, M. K. C. Hesselink, J. E. Wildberger, R. D. Stevens, T. Koves, D. M. Muoio, P. Schrauwen, and V. B. Schrauwen-Hinderling, *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 11, pp. 4915–25, 2014.
- [5] L. Vanhamme, van den Boogaart A, and Van Huffel S, *J. Magn. Reson.*, vol. 129, no. 1, pp. 35–43, Nov. 1997.

Figures:

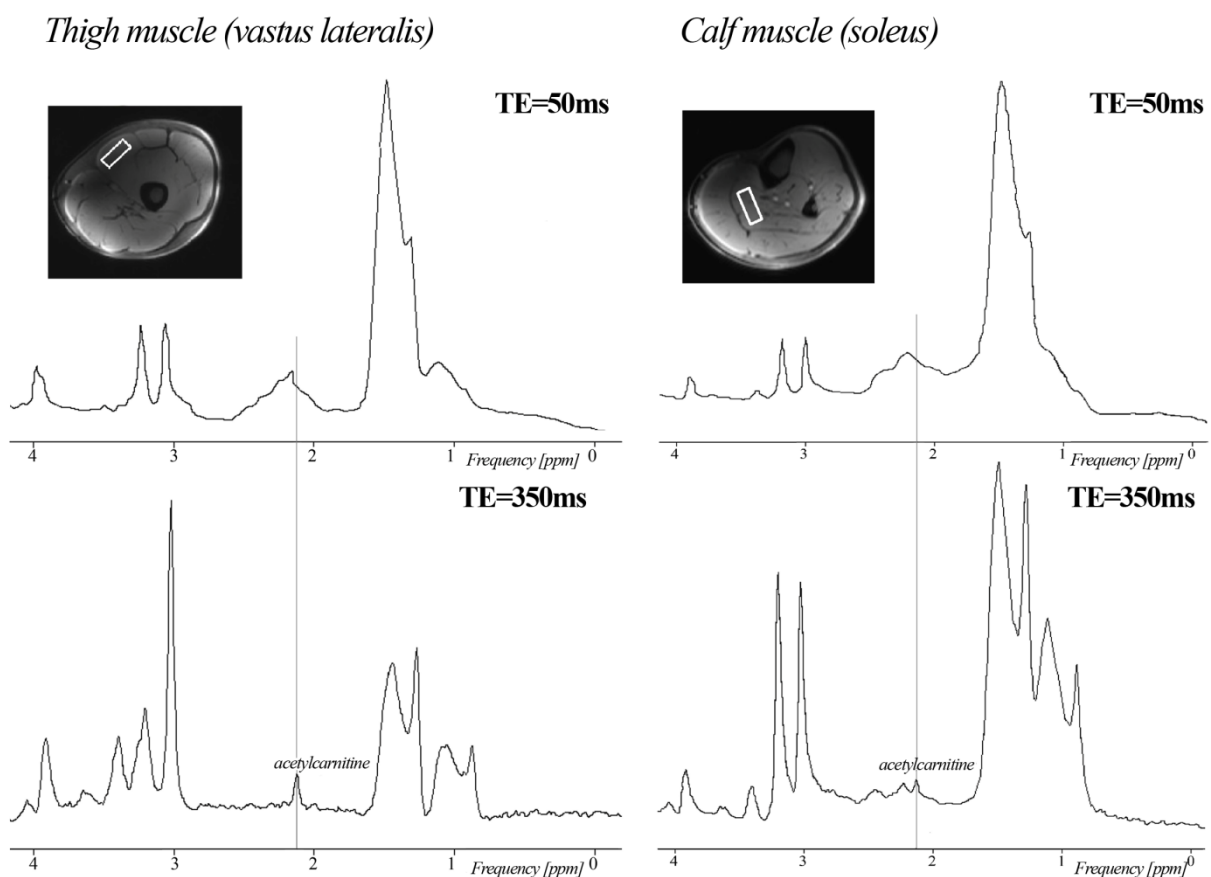


Fig. 1: Comparison of short (50ms) and long (350ms) TE spectra from vastus lateralis and soleus muscles. Localizer axial images and voxels placement are inserted. For better visualization, 1.5-Hz Gaussian apodization filter was applied to reduce noise in the spectra.

		Thigh muscle (vastus lateralis)	Calf muscle (soleus)
	ppm	T ₂ [ms]	T ₂ [ms]
Acetylcarnitine	2.13	137.8 ± 47.7	/
Water	4.70	26.4 ± 7.4	18.2 ± 5.5
Lipid [EMCL -(CH ₂) _n -]	1.50	74.3 ± 15.5	60.5 ± 18.7
Trimethyl ammonium	3.20	94.5 ± 10.2	104.9 ± 27.3
Creatine	3.03	160.4 ± 51.5	134.1 ± 23.2

Tab. 1: T₂ relaxation times of skeletal muscle metabolites at 7T.

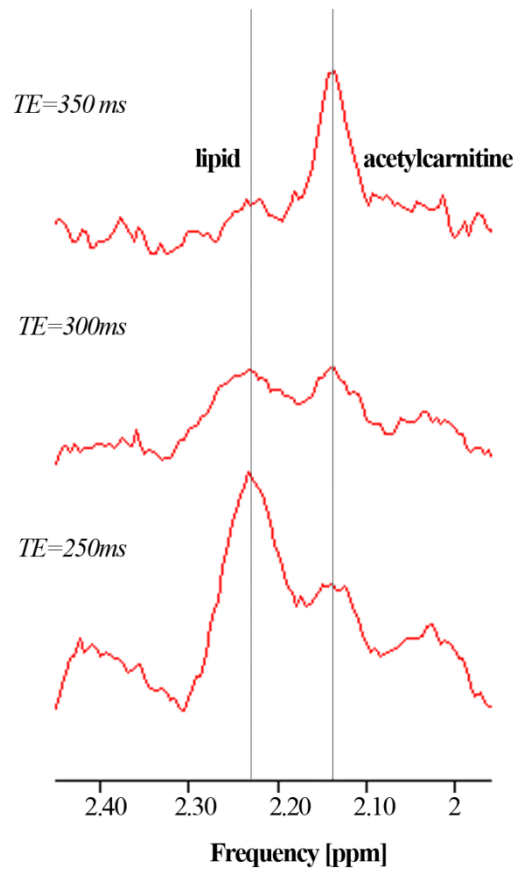


Fig.2: Detection of Acetylcarnitine resonance at 2.13 ppm in vastus lateralis muscle using different TE. For better visualization, the 1.5-Hz Gaussian apodisation filter was applied to reduce noise in the spectra in this figure.

# volunteer	Acetylcarnitine concentration [mmol/kg]	
	calf/soleus	thigh/vastus lateralis
1	0.40	1.77
2	0.65	1.95
3	0.36	1.48
4	0.75	1.55
average ± stdev	0.54 ± 0.19	1.69 ± 0.21

Tab. 2: Concentrations of acetylcarnitine in soleus and vastus lateralis muscles obtained in this study.

5.3 Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal Muscles by ^1H MRS at 7 T

Aufbauend auf dem erfolgreichen Beweis der Isolierung des Spektrums für Acetylcarnitin folgte eine weitere Untersuchung bezüglich des Vorhandenseins und der Beeinflussbarkeit des Acetylcarnitines im Tagesverlauf und durch Bewegung. Dazu wurden, wie im vorangegangenen Studienprotokoll, das Acetylcarnitinniveau bei verschiedenen Relaxationszeiten gemessen. Da vorangegangene Studien eine Veränderung der Konzentration im Tagesverlauf aufgezeigt hatten, wurde bei allen Teilnehmern und Teilnehmerinnen jeweils derselbe Tageszeitpunkt wie auch das Ernährungsverhalten festgelegt. Zur Vergleichbarkeit der Leistungsfähigkeit wurde bei allen Probanden (8 männlich / 2 weiblich) eine Spiroergometrie am Österreichischen Institut für Sportmedizin (ÖISM, Wien) durchgeführt. Dadurch entstand eine Aufteilung in zwei Gruppen: (normal active / moderate trained). Für die Definition der Gruppen wurde für Frauen ein Grenzwert der VO_2max von $\geq 33.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ bzw. für Männer von $\geq 45.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die normal active Gruppe festgelegt. Eine $\text{VO}_2\text{max} \leq 33.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ für Frauen und $\leq 45.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ für die männlichen Teilnehmer war das Einschlusskriterium für die Gruppe moderat trained.

Das Messprotokoll sah eine Untersuchung im Nüchtern Zustand vor, eine Messung nach dem Mittagessen (gefolgt von einer 2 Std. Pause) eine Messung direkt nach einer 10 min exzessiven Belastung (10 min Kniebeugen) und eine letzte zur Bestimmung der Erholung nach weiteren 15 min. Damit konnten bei allen Probanden unter gleichbleibenden Bedingungen die Messwerte erhoben werden und zeigten uns die Veränderung und Adaption des Acetylcarnitin nicht nur an verschiedenen Tageszeitpunkten, sondern auch die Reaktion auf extreme Belastung.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten bei allen Probandinnen ein gleiches Bild. Nach dem Schema „Fasten über Nacht – Essen – Trainieren – Erholen“ zeigte sich ein homogener Tagesverlauf bei allen untersuchten ProbandInnen.

Interessant ist dabei die Tatsache, dass die Acetylcarnitinkonzentration in der Wade insgesamt geringer als im Oberschenkelmuskel ist, was jedoch mit der unterschiedlichen Muskelfaserzusammensetzung zusammenhängen kann. Während im Oberschenkel die Fasertypen sich annähernd ein Gleichgewicht halten, ist in der Wade eine Verschiebung hin zu den langsam zuckenden Fasern festgestellt worden vgl. (Gollnick, Sjödin, & Karlsson, 1974). Diese Untersuchungen können bis zum heutigen Tage nur invasiv durch Biopsien festgestellt werden. Es besteht jedoch die realistische Möglichkeit dies ebenfalls durch eine MR Untersuchung zu erreichen.

Zusammenfassend waren die Ergebnisse der Untersuchungen folgende:

Die moderat trainierten Probanden wiesen eine signifikant ($p < 0,005$) höhere Konzentration an Serums-Acetylcarnitin im M-vastus lateralis auf als die normal aktiven Probanden, während im M. soleus die Werte zwar höher, aber einen nicht signifikanten Unterschied beschrieben.

Die signifikanten Acetylcarnetinkonzentrationsunterschiede im Tagesverlauf beruht auf dem Vorhandensein bzw. der Zufuhr freiere Fettsäuren über die Nahrung. So zeigte sich dass die Konzentration der freien Fettsäuren nach dem Schlaf (overnight fasting state) und auch direkt nach der Belastung erhöht war jedoch nach der Mahlzeit in abgesenkter Konzentration gemessen wurde. Auch dieses Ergebnis lässt sich mit Werten aus Biopsien belegen vgl. (Groop L. , Bonadonna, DelPrato, Ratheiser, & DeFronzo, 1990; Bahr, Høstmark, Newsholme, Grønnerød, & Sejersted, 1991).

ORIGINAL ARTICLE

Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal Muscles by ^1H MRS at 7 T

Radka Klepochová, PhD,*†‡ Ladislav Valkovič, PhD,§|| Martin Gajdošík, PhD,*‡¶
Thomas Hochwartner, MAG,# Harald Tschann, PhD,# Michael Krebs, MD,¶
Siegfried Trattnig, MD,*‡ and Martin Krššák, PhD*‡¶

Objectives: The aims of this study were to detect the acetylcarnitine resonance line at 2.13 ppm in the human vastus lateralis and soleus muscles, assess T_1 and T_2 relaxation times, and investigate the diurnal and exercise-related changes in absolute concentration noninvasively, using proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. **Materials and Methods:** All measurements were performed on a 7 T wholebody Magnetom MR system with a 28-channel knee coil. Five healthy, moderately trained volunteers participated in the assessment of the detectability, repeatability, and relaxation times of acetylcarnitine. For the evaluation of the effect of training status, another 5 healthy, normally active volunteers were examined. In addition, normally active volunteers underwent a day-long protocol to estimate diurnal changes and response to the exercise. **Results:** Using a long echo time of 350 milliseconds, we were able to detect the acetylcarnitine resonance line at 2.13 ppm in both muscle groups without significant lipid contamination. The T_1 of acetylcarnitine in the vastus lateralis muscle was found to be 1807.2 ± 513.1 milliseconds and T_2 was found to be 129.9 ± 44.9 milliseconds. Concentrations of acetylcarnitine from the vastus lateralis muscle in moderately trained volunteers were higher than concentrations from normally active volunteers. Acetylcarnitine concentrations changed during the day, tending to be higher in the morning after an overnight fast than after lunch. After 10 minutes of high-intensity exercise, the concentration significantly increased, and 15 minutes after cessation of exercise, a decrease could be observed. **Conclusions:** Our results demonstrate an effective detection of

acetylcarnitine using a long TE of 350 milliseconds at 7 T in the vastus lateralis and soleus muscles with high repeatability and reliability on a 7 T scanner. Our data emphasize the need for strict standardization, physical activity, and dietary conditions for the measurement of the acetylcarnitine.

Key Words: acetylcarnitine, ^1H MRS, long TE, skeletal muscles, 7 T

(Invest Radiol 2017;00: 00–00)

Received for publication November 14, 2016; and accepted for publication, after revision, December 29, 2016.

From the *High-Field MR Center, Department of Biomedical Imaging and Image Guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; †Department of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia; ‡Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna, Austria; §University of Oxford Centre for Clinical Magnetic Resonance Research (OCMR), University of Oxford, Oxford, United Kingdom; ||Department of Imaging Methods, Institute of Measurements Science, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; ¶Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna; and #Centre of Sport Science and University Sport, University of Vienna, Vienna, Austria.

Conflicts of interest and sources of funding: This study was supported by Anniversary Fund of Austrian National Bank (#15363 to M. Krššák, #15455 to L.V.), Christian Doppler Society (MOLIMA to S.T.) and by a Sir Henry Dale Fellowship from the Royal Society and Wellcome Trust (#098436/Z/12/Z). Part of this study was presented at the Joint Annual Meeting of ISMRM, 2016, Singapore (Tušková et al)

^1H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7 T).

The authors report no conflicts of interest.

Correspondence to: Martin Krššák, PhD, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III, Medical University

The biologically active enantiomer L-carnitine (hereafter “carnitine”) is a compound known for its important function in fat metabolism and exists as free carnitine or in esterified short- and long-chain forms. Acetylcarnitine is predominantly the short-chain form of carnitine (Fig. 1).¹ Carnitine synthesized in the liver and kidney² is released and taken up by other tissues. The main reservoir for the whole-body store of carnitine is skeletal muscle (at 98%; of this amount, approximately 80% is in the form of carnitine and 20% is in the form of acetylcarnitine).¹

Carnitine has 2 main functions. First is the translocation of longchain fatty acids from cytosol to the mitochondrial matrix,³ and the second involves the formation of acetylcarnitine from short-chain acetyl-coenzyme A and protection against acetyl-coenzyme A accumulation, which is potentially harmful to cellular function.⁴ In addition, a low acetyl-coenzyme A/free coenzyme A ratio is needed to maintain pyruvate dehydrogenation activity.⁵ Low carnitine concentrations may reduce or inhibit pyruvate dehydrogenation activity and, therefore, reduce the oxidative degradation of glucose. Moreover, low carnitine concentrations cause a reduction of the fatty acid transport into the mitochondria, which results in the cytosolic accumulation of triglycerides.⁶ Impaired pyruvate dehydrogenation activity and an increase in intramuscular triglyceride is implicated in the pathogenesis of insulin resistance, thereby contributing to the development of type 2 diabetes mellitus.^{6–8}

For many years, biochemical analysis of tissue biopsies was the only method capable of detecting carnitine and acetylcarnitine concentrations in tissues of interest. A noninvasive alternative to this procedure would enable broader physiological research. Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) has been proposed and validated for the measurement of skeletal muscle carnitine and acetylcarnitine concentrations at lower field strengths.^{9–11}

Aside from the ¹H MR resonance lines of creatine (3.03 and 3.9 ppm) and the complex lines of intramyocellular and extramyocellular lipids (0.9 to 1–5 ppm, as well as 2.2–2.4 ppm), the main spectral lines of carnitine that originate from the acetyl group of acetylcarnitine at the 2.13 ppm chemical shift and the trimethyl ammonium (TMA) group from carnitine and acetylcarnitine at the 3.20 ppm chemical shift^{9,10,12} can be detected by ¹H-MRS. The straight forward detection and quantification is challenging, due to the strong overlap of the acetylcarnitine line with lipid resonances at 2.13 ppm, under in vivo conditions, and the fact that the line at 3.20 ppm represents a combination of the TMA groups of carnitines, acetylcarnitine, and choline. As acetylcarnitine metabolism

adapts to an exercise challenge, the detectability of acetylcarnitine is improved immediately after a workout, when concentrations are increased and the resonance lines are well-resolved.¹² Recently, the differences in T₂ and T₁ relaxation times of acetylcarnitine and lipids have been employed for the detection of the 2.13 ppm line in long TE or T₁-edited ¹H MRS.^{9,11}

¹H MRS of the quadriceps muscle at rest at 3 T. In addition, the recent reports point toward different concentrations of acetylcarnitine in different muscle groups. Higher concentration values in the vastus lateralis (VL)⁹ allow detection under resting conditions.

Recently introduced whole-body MR systems operating at a field strength of 7 T brought the advantage of increased signal-to-noise ratio

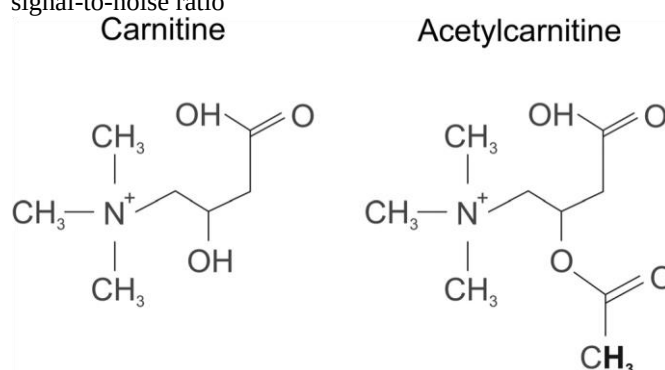


FIGURE 1. Structure of carnitine and acetylcarnitine. In the acetylcarnitine molecule, protons contributing to the resonance at 2.13 ppm in the ¹H MRS spectra are highlighted.

(SNR) and improved spectral resolution in the field of skeletal muscle MR spectroscopy. Usually, this can be translated into smaller volumes of interest (VOIs), and thus, enhanced morphological precision, decreased acquisition times, or improved detection of low metabolic concentrations.^{13–16}

Thus, in this work, we aimed to detect the acetylcarnitine resonance line at 2.13 ppm in the thigh muscle (VL) and calf muscle (soleus) using long TE MRS at 7 T, which, in addition to increased SNR, should provide enhanced spectral resolution and, therefore, improve the repeatability of the measurements. For the quantification of the molar concentration of acetylcarnitine, we first assessed metabolite T₁ and T₂ relaxation times at 7 T. Since acetylcarnitine concentrations in plasma are known to vary during the day¹⁷ and increase after high-intensity exercise,^{18–20} we also aimed to investigate the diurnal and exercise-related changes in the concentration of acetylcarnitine in skeletal muscle noninvasively, using ¹H MRS at 7 T. For our purposes, we called these variations diurnal changes, which include all changes during the day, that is, overnight fasting, feeding, and exercise.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Ten healthy, active volunteers (8males, 2 females) participated in the study. Written informed consent was provided

in accordance with the local ethics committee requirements.

For the determination of maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$), all participants underwent a standardized protocol with continuous increments, until exhaustion, on a cycle ergometer (Lode Excalibur, Groningen, the Netherlands). Measurement of $\text{VO}_{2\text{max}}$ and other parameters was performed via "breath-by-breath" Spiroergometry (Master CPX, VIASYS Healthcare). Based on the self-reported physical activity and measured maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$), volunteers were divided into 2 groups, the moderately trained (4 or more training units a week, $\text{VO}_{2\text{max}} \geq 33.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ for females, and $\text{VO}_{2\text{max}} \geq 45.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ for males) and the normally active (1 to 3 training units a week, $\text{VO}_{2\text{max}} \leq 33.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ for females, and $\text{VO}_{2\text{max}} \leq 45.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ for males). Forty-five to 90 minutes of continuous exercise, regardless of endurance or resistive nature, was considered 1 training unit.

Magnetic Resonance Measurements

All MR measurements were performed on a 7 T whole-body Magnetom MR system (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). A 28-channel knee coil (QED, Mayfield Village, OH) was used to acquire spectra from the quadriceps and soleus (SOL) muscle of the left leg. All volunteers were examined in the supine position.

Detectability, Repeatability, and Relaxation Times of Acetylcarnitine

Of the whole study group, 5 healthy, moderately trained volunteers (age 29.8 ± 4.2 years, body mass index $23.0 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$, self-reported activity of 4 to 7 training units a week, mean $\text{VO}_{2\text{max}}$

$45.5 \pm 6.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) participated in this part of the study. All measurements for repeatability were conducted in the morning hours and measurements for the assessment of relaxation times were conducted in the afternoon (2 to 3 hours after lunch). Volunteers did not perform any physical exercise on the day of the measurement and 1 day before.

Detectability

T_1 -weighted multislice images were acquired and used for VOI positioning. Spatial selection was achieved using a STEAM localization sequence (TR/TE, 2000/350 milliseconds; spectral bandwidth, 3 kHz; number of averages, 128; delta frequency, -2.5 ppm relative to water resonance; number of preparation scans, 4) and the VOI ($40 \times 35 \times 15 \text{ mm}^3$) was carefully placed in the VL muscle or in the SOL muscle. Localized shimming was performed manually, on the adjustment volume that matched the VOI, after automatic field-map acquisition based on gradient recalled, double echo field-map acquisition (GRE-SHIM; Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). The final linewidth of water was in the range of 28 to 38 Hz in magnitude mode.

For concentration determination, the water signal was measured separately (TR/TE, 2000/20 milliseconds; number of averages, 1; delta frequency, 0 ppm).

In 1 volunteer, an additional spectrum with a short echo time of 50 milliseconds was acquired to demonstrate acetylcarnitine-lipid overlap in the observed spectral region.

Repeatability

Test-retest measurements were performed in the morning hours in the VL muscle to determine the repeatability of the protocol. Before the measurements, the position of the coil had been marked. Parameters for measurement, size of VOI, shimming, and measurement of the water signal were as described previously. The retest measurements were performed after a short break during which the volunteers were taken out of the magnet and walked for approximately 1 minute in the scanner room. Full, careful repositioning and shimming procedures were performed with the same measurement protocol. To assess the repeatability of acetylcarnitine, the mean coefficient of variation was calculated for test-retest measurements.

T_2 Relaxation Time

For the assessment of the T_2 relaxation time of the acetylcarnitine spectral line at 2.13 ppm, a series of 8 spectra with 8 different TEs (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, and 450 milliseconds) were acquired in both muscles in all 5 volunteers. Other sequence parameters and VOIs remained the same as for detectability. Total measurement time was approximately 45 minutes.

T_1 Relaxation Time

The T_1 relaxation time was measured in the VL only, using an inversion recovery sequence with the following parameters: TR, 6000 milliseconds; TE, 350 milliseconds; and TI of 20, 200, 500, 800, 2000, 5000 milliseconds; number of averages, 128; delta frequency, -2.5 ppm (used for all RF-pulses); preparation scans, 4; inversion pulse (WURST) duration, 5000 μs . As a long TE was used, no water suppression was necessary. Total measurement time was approximately 1 hour 30 minutes.

Diurnal Changes and Response to Exercise

The second, normally active group of volunteers (age 29.2 ± 1.3 years, body mass index $22.8 \pm 2.5 \text{ kg/m}^2$, self-reported activity of 1 to 3 training units a week, mean $\text{VO}_{2\text{max}}$ $39.9 \pm 7.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) participated in the second part of this study. All of them underwent the first measurement early in the morning (7 AM), after an overnight fast and without strenuous exercise in the morning. Data were obtained from both the VL and the SOL muscles using a STEAM sequence with the same protocol as described previously. The second measurement of acetylcarnitine from the same VOIs was performed immediately after a normal hospital canteen lunch (~6 hours after the first scan). Subsequently, each volunteer performed high-intensity exercise (10 minutes of continuous squats; $n =$

274 ± 38). The ^1H MRS measurements, performed in the VL only, were repeated twice after the exercise (starting at 0 and 15 minutes). A schematic illustration of the experimental design, including the time points of ^1H MRS, is shown in Figure 2.

Data from the second measurement, that is, after lunch, were used also to compare the afternoon concentrations of acetylcarnitine in moderately trained and normally active volunteers.

Spectral Processing, Assessment of Relaxation Times, and Absolute Quantification

All spectra were fitted using the Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral (AMARES) fitting algorithm in the jMRUI v5.2 software²¹ with spectral lines of acetylcarnitine, creatine, TMA, lipids, and water modeled as single Lorentzians. Lipids surrounding the acetylcarnitine peak were fitted with a constrained frequency of 2.0 to 2.1 ppm and 2.17 to 2.30 ppm to avoid their influence on fitted acetylcarnitine.

Relaxation times were calculated in MATLAB by fitting the data to the mono-exponential functions, $M_{TE} = M_0 \cdot e^{(-TE/T_2)}$ and $M_{TR} = M_0 \cdot (1 - b \cdot e^{(-TR/T_1)})$. Although full inversion (ie, $b = 2$) could be expected, we used a 3-parameter fitting routine²² (ie, b -parameter is free), which is often more robust.

Using the water peak as an internal reference, the concentration of acetylcarnitine was calculated according to the formula for millimolar concentration in wet weight (mmol/kg ww):

$$C_{AC} \propto \frac{S_{AC}}{S_{H_2O}} \cdot \frac{1}{n} \cdot \frac{CF}{W_{H_2O}}$$

where S is the signal intensities of metabolites (H_2O , water; AC, acetylcarnitine), n is the number of protons in a water and acetylcarnitine molecule, CF is correction factors for T_1 and T_2 relaxations, $C_{H_2O} = 55,556 \text{ mmol/L}$ is the concentration of the water, and W_{H_2O} is the approximate water content of skeletal muscle tissue, that is, 0.77 L/kg wet weight of the tissue.

Differences in the values of the acetylcarnitine concentration during diurnal changes and after exercise were tested for significance by repeated-measures analysis of variance and Fisher least significant difference—corrected post hoc test. Differences between groups and between muscles were tested for significance by 1-way analysis of variance and least significant difference—corrected post hoc tests. All analyses were done in SPSS (version 21.0; IBM SPSS, Chicago, IL). All values are provided as mean ± SD, and a P value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Detectability and Repeatability of Acetylcarnitine in the VL and SOL Muscles Under Resting Conditions

Using a long TE, we were able to detect the acetylcarnitine resonance line at 2.13 ppm (Fig. 3) in both muscle groups in all volunteers without significant lipid contamination.

The mean individual coefficient of variation estimated in 5 moderately trained volunteers by test-retest measurement was 11.6%.

Relaxation Times of Acetylcarnitine

The T_1 of acetylcarnitine in the VL muscle was found to be 1807.2 ± 513.1 milliseconds, and T_2 was found to be 129.9 ± 44.9 milliseconds. T_1 and T_2 relaxation times of acetylcarnitine from the VL with the reported fitting precision and b values that demonstrate the inversion efficiency are shown in Table 1. Despite the fact that we recruited moderately trained volunteers in whom higher acetylcarnitine muscle levels were assumed, we were not able to resolve the acetylcarnitine peak in the SOL muscle spectra using a short TE, making quantification of T_2 in the SOL impossible. Therefore, concentrations of acetylcarnitine from the SOL were corrected with relaxation coefficients from the VL muscle.

Absolute Quantification

The acetylcarnitine concentration was quantified in all 10, that is, moderately trained and normally active, volunteers in both muscles and from all measurements. ^1H MRS measurements for this part of experiment were always performed in the afternoon under the same physiological conditions.

Concentrations of acetylcarnitine of moderately trained volunteers were significantly higher ($3.83 \pm 1.99 \text{ mmol/kg ww}$) than concentrations of normally active volunteers ($1.29 \pm 0.62 \text{ mmol/kg ww}$) ($P = 0.005$) in the VL muscle. In the SOL muscle, no significant differences were found between the 2 groups of volunteers. The concentration of acetylcarnitine in the SOL muscle of moderately trained volunteers was $1.70 \pm 0.83 \text{ mmol/kg ww}$, and the concentration in normally active volunteers was $1.21 \pm 0.92 \text{ mmol/kg ww}$. Moreover, in general, concentrations of acetylcarnitine in the VL muscle were higher than in the SOL muscle. More details are given in Figure 4.

Diurnal Changes and Response to Exercise

Individual and pooled results are depicted in Figure 5 and representative spectra from one volunteer in Figure 6. Acetylcarnitine concentrations changed during the day, tending to be higher in the morning ($4.33 \pm 0.9 \text{ mmol/kg ww}$) than after lunch ($1.29 \pm 0.62 \text{ mmol/kg ww}$). After 10 minutes of high-intensity exercise, the concentration significantly increased from 1.29 ± 0.62 to $8.26 \pm 4.34 \text{ mmol/kg ww}$ ($P = 0.021$), and, again, significantly decreased 15 minutes after

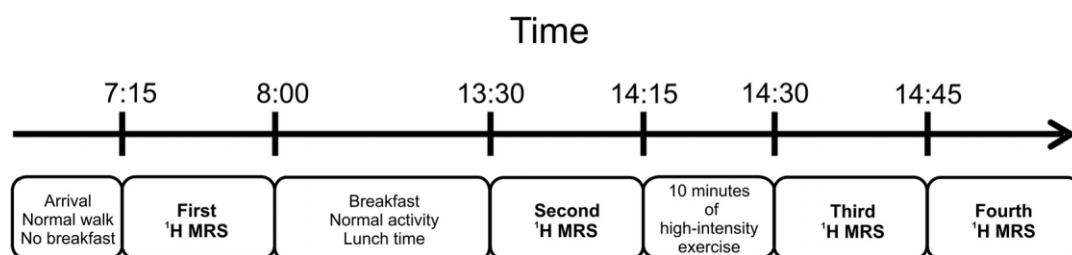


FIGURE 2. Schematic illustration of experimental design, including time points of measurements.

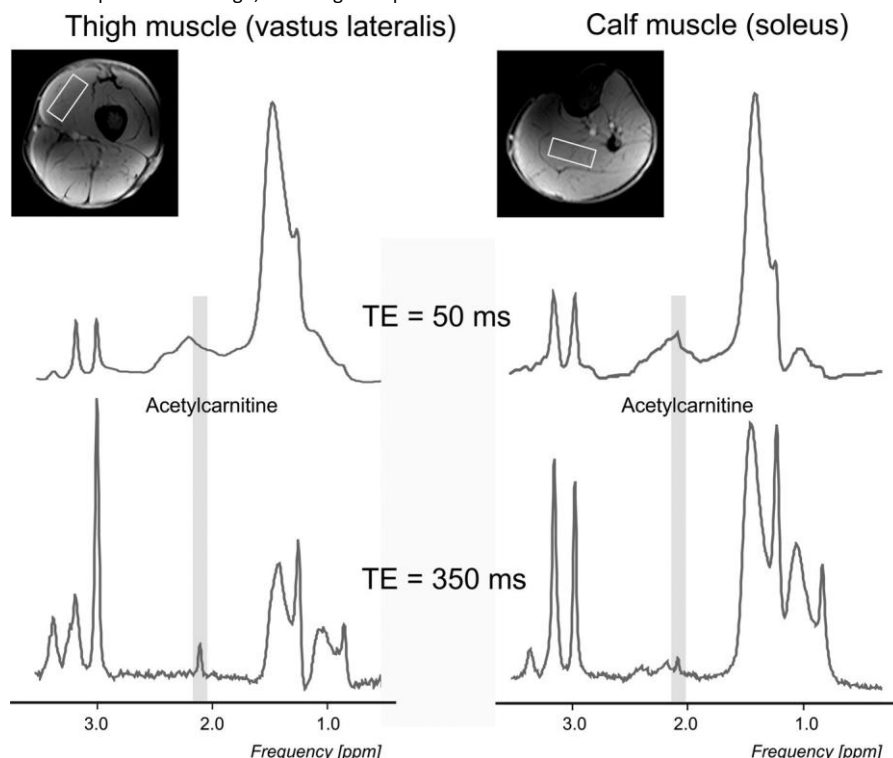


FIGURE 3. Comparison of short (50 milliseconds) and long (350 milliseconds) TE spectra from the VL and the SOL muscles (left leg). T₁-weighted axial images and voxel placements are inserted. For better visualization, a 1.5-Hz Lorentzian apodization filter was applied to reduce noise in the spectra.

Figure 3 can be viewed online in colour at www.investigativeradiology.com.

cessation of the exercise, with concentrations of 8.26 ± 4.34 to 6.18 ± 4.18 mmol/kg ww ($P = 0.019$).

DISCUSSION

Our study demonstrated that acetylcarnitine could be detected by

¹H MRS at 7 T in 2 different and, from the point of view of physiological research, very important skeletal muscle groups, SOL and VL. Furthermore, we determined the relaxation times of acetylcarnitine in skeletal muscle at 7 T, which are essential for absolute quantification purposes. We have also followed the diurnal changes of acetylcarnitine concentrations, which were established from the biochemical analysis of the serum.¹⁷ We also measured skeletal muscle acetylcarnitine levels in normally active and moderately trained volunteers in the morning on an

empty stomach and in the afternoon after lunch, as well as after 10 minutes of high-intensity physical workout.

Detectability of Acetylcarnitine

The results of the long TE measurement revealed that acetylcarnitine appears as an obvious, distinguishable peak without significant lipid contamination. The echo time of 350 milliseconds was chosen here since the spectra with even longer

TE 400 milliseconds and 450 milliseconds suffered a substantial overall loss in SNR. We applied a stimulated echo rather than a spin echo-based sequence as our 7 T standard technique for ¹H MRS measurements due to the lower demands on RF coil efficiency, lower SAR deposition (no 180-degree pulses involved), and lower sensitivity to echo time phase evolution due to the J coupling.²³ It is, however, true that a well prepared/set PRESS sequence could be also used in the current setup.

Acetylcarnitine levels were measured in 2 skeletal muscle groups, the VL and the SOL, with higher concentrations of acetylcarnitine in the VL muscle than in the SOL muscle. According to the results obtained by biochemical analysis of biopsy in the study by Gollnick et al,²⁴ there is an approximately equal proportion of slow-twitch fibers and fast-twitch fibers in the VL, whereas the SOL muscle contains predominantly slow-twitch-type fibers. Moreover, the activity of glycolytic enzymes was lower in slow-twitch fibers.²⁴ Thus, we assume that different concentrations of ac-

The higher concentrations and larger dynamic range appears VL as a more suitable for future cross-sectional and interventional studies. Acetylcarnitine concentrations were expected to be higher in endurance-trained athletes, possibly as a result of enhanced fat oxidation.²⁵ It has been found that endurance exercise training increases fat oxidation and activates, among other processes, pyruvate dehydrogenation activity, leading to markedly increased mitochondrial generation of acetyl-coenzyme A and, secondarily, acetylcarnitine.²⁶ In addition,

TABLE 1. T₁ and T₂ Relaxation Times of Acetylcarnitine, Creatine, TMA, and Water + SD From VL Muscle at 7 T

	T ₁ , ms	Thigh Muscle (VL)			R ₂	Calf Muscle (SOL)	
		R ₂	b Value	T ₂ , ms		T ₂ , ms	R ₂
Acetylcarnitine (2.13 ppm)	1807.2 ± 513.1	0.94 ± 0.05	1.72 ± 0.31	129.9 ± 44.9	0.95 ± 0.07	NA	NA
Water (4.70 ppm)	3334.0 ± 197.53	0.96 ± 0.02	1.76 ± 0.20	27.1 ± 6.6	0.99 ± 0.01	18.3 ± 5.5	0.99 ± 0.01
Creatine (3.03 ppm)	1495.6 ± 246.75	0.99 ± 0.01	1.92 ± 0.13	166.0 ± 46.3	0.98 ± 0.02	132.2 ± 23.3	0.98 ± 0.02
TMA (3.20 ppm)	1751.8 ± 524.92	0.96 ± 0.04	2.00 ± 0.24	91.8 ± 10.6	0.99 ± 0.01	104.9 ± 27.4	0.96 ± 0.04

TMA indicates trimethyl ammonium; VL, vastus lateralis; SOL, soleus.

etylcarnitine between muscles may be caused by different fiber compositions and enzyme profiles. Based on

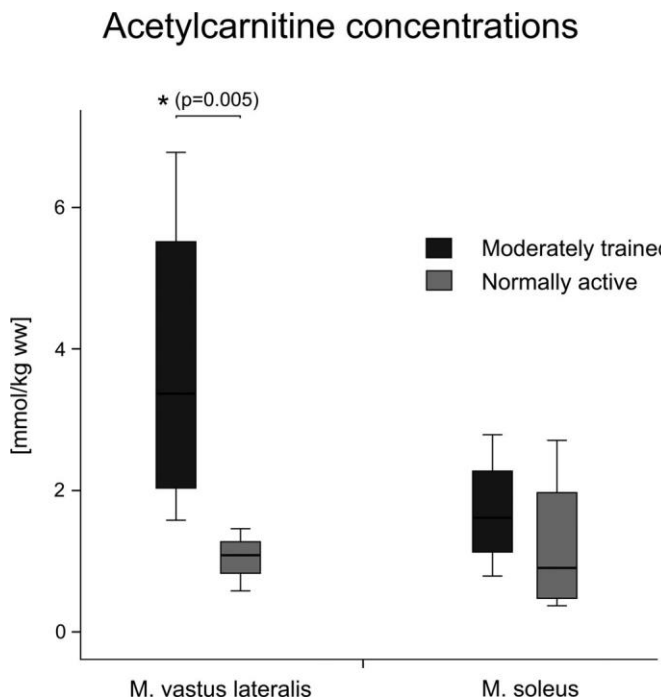


FIGURE 4. Box plots showing concentrations of acetylcarnitine from the VL and the SOL muscle ± SD of moderately trained and normally active volunteers measured in the afternoon. *Significant difference at the P < 0.05 level between the concentrations of acetylcarnitine in moderately trained and normally active volunteers in the VL muscle.

carnitine acetyl coenzyme A transferase activity tasked with conversion of acetyl-coenzyme A into membrane-permeable acetylcarnitine was found to be significantly higher in the endurance-trained athletes.⁹ Process may be important in maintaining mitochondrial efflux of excess acetyl-coenzyme A that otherwise could inhibit pyruvate dehydrogenase.²⁵ Moreover, the high-intensity exercise state is associated with a rapid change in muscle carnitine metabolism characterized by an increase in acetylcarnitine content and decreased free carnitine content.¹⁹ Although further studies are necessary to better understand whole body acetylcarnitine physiology in humans.

In our study, 2 groups of volunteers were investigated, moderately trained and normally active. Moderately trained volunteers showed higher acetylcarnitine concentrations in the VL and, non-significantly, also in the SOL muscle than did normally active volunteers. This is in agreement with a previous study by Lindeboom et al,⁹ associating acetylcarnitine concentration with training status, increased insulin sensitivity, and higher in vivo mitochondrial function.

Relaxation Times of Acetylcarnitine

To the best of our knowledge, the results presented here are the first in vivo assessed relaxation times of the 2.13 ppm acetylcarnitine resonance in the VL muscle at 7 T. Lindeboom et al⁹ assessed the spin-spin relaxation time of the 2.13 ppm acetylcarnitine resonance in the VL muscle at 3 T, which was longer (265 ± 45 milliseconds) than our results (129.9 ± 44 milliseconds), and is in good agreement with the theory of a T₂ time decrease with the magnetic field strength. Ren et al,¹² in their work, determined both

spin-spin and spin-lattice relaxation times of a 3.17-ppm acetylcarnitine resonance line at 7 T in the SOL muscle. In resting muscle, they could not resolve the carnitine peak due to the low concentration; thus, T_1 and T_2 relaxation

times were assessed in post-exercise spectra. The T_1 values reported there, using an inversion recovery method for measurements, were shorter (900 ± 110 milliseconds) than reported here (1807 ± 513 milliseconds).

Acetylcarnitine concentrations

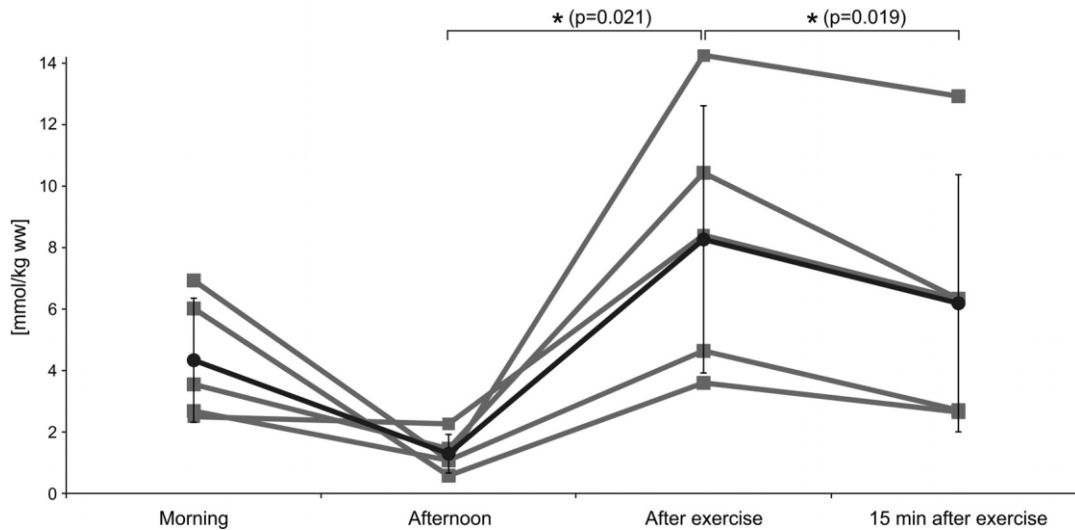


FIGURE 5. Line graphs depicting absolute concentrations of acetylcarnitine in the VL muscle in 5 normally active volunteers (gray lines) and mean (red line) from the morning, on an empty stomach, in the afternoon after lunch, after exercise, and 15 minutes after exercise. *Significant difference at the $P < 0.05$ level between the afternoon concentrations of acetylcarnitine and after high-intensity exercise concentrations in the VL muscle and between concentrations of acetylcarnitine after high-intensity exercise and 15 minutes after high-intensity exercise in the VL muscle in normally active volunteers. Figure 5 can be viewed online in color at www.investigativeradiology.com.

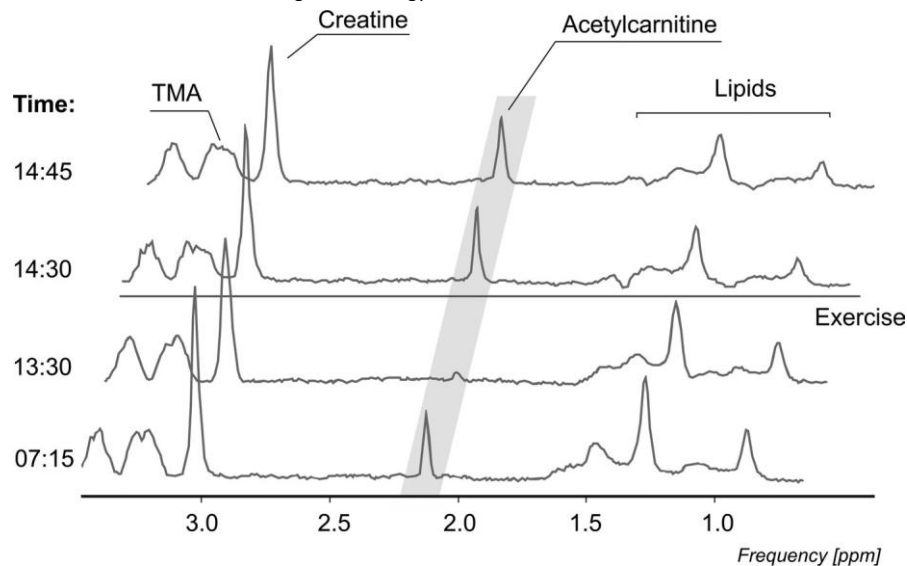


FIGURE 6. ^1H MRS spectra from the VL muscle acquired in the morning, afternoon, immediately after exercise, and 15 minutes after exercise (1.5 Hz Lorentzian apodization). Figure 6 can be viewed online in colour at www.investigativeradiology.com.

These differences could be attributable to the different spectral line of acetylcarnitine (3.17 ppm vs 2.13 ppm) and the different muscle groups under examination (SOL vs VL).¹² However, T_2 values from their study were comparable to our findings in both muscles.¹²

Diurnal Changes and Response to Exercise

Serum carnitine and acetylcarnitine concentrations were previously found to vary significantly during the day in reaction to plasma free fatty acid concentrations.¹⁷ According to the literature, free fatty acid concentrations are increased in the fasting state and acutely after exercise, and, on the other hand, decreased after a carbohydrate-rich meal.^{27,28} It is interesting that the results of repeated skeletal muscle acetylcarnitine measurements during the day mirror this time course. We performed ^1H MRS measurements early in the morning after an overnight fast, and, subsequently, during the afternoon after lunch, and skeletal muscle acetylcarnitine concentrations in the morning were higher than in the afternoon after lunch. Previous findings showed that 10 minutes of high-intensity exercise can change the skeletal muscle carnitine pool⁴ and increase the formation of acetylcarnitine, leading to its subsequent accumulation.²⁹ Thus, a high-intensity exercise challenge to the VL muscle by performing squats continuously for 10 minutes was applied to assess the effect of physical load on the concentration of acetylcarnitine in skeletal muscle. An increase in the acetylcarnitine level was detected in each of the 5 individuals. In accordance with the notion that acetylcarnitine varies with free fatty acid concentrations, increased plasma free fatty acid concentrations were observed after exhaustive exercise on a cycle ergometer.²⁸ Approximately 15 minutes after the cessation of exercise, we could detect acetylcarnitine depletion or washout, which is in accordance with the findings of Seiler et al.,²⁰ on a trained

group of subjects. For our purposes, we called these variations diurnal changes, which include all changes during the day, that is, overnight fasting, feeding, and exercise.

Nevertheless, from our results, we cannot draw general conclusions about exact diurnal changes and the exercise effects on skeletal acetylcarnitine concentration, as our study included only a limited number of subjects and was aimed mainly on the methodological aspects of acetylcarnitine detection and quantification in 2 different muscle groups of young healthy volunteers at an MR field strength of 7 T. Further studies on the influence of food intake, diet composition, sex, age, and different pathophysiological conditions with a larger number of volunteers are necessary.

CONCLUSIONS

Our results demonstrate an effective detection of acetylcarnitine using a long TE of 350 milliseconds at 7 T in the VL and the SOL skeletal muscles. We were able to observe the relaxation behaviour and calculate the T_1 and T_2 relaxation time values for resting VL muscle. We could also observe the diurnal changes of acetylcarnitine concentration and changes after high-intensity exercise. The differences in acetylcarnitine levels in skeletal muscle among different volunteers are linked to different training statuses and suggest an adaption of skeletal muscle metabolism to the training. Our data emphasize the need for strict standardization, physical activity, and dietary conditions for the measurement of acetylcarnitine/carnitine. Further studies can help clarify the role of acetylcarnitine and its relationship to the impaired mitochondrial oxidation of fatty acids and insulin resistance in skeletal muscle.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all the participants for their patience and cooperation and to Christoph Triska for the performance of spiroergometry.

REFERENCES

1. Gatti R, De Palo CB, Spinella P, et al. Free carnitine and acetyl carnitine plasma levels and their relationship with body muscular mass in athletes. *Amino Acids*. 1998;14:361–369.
2. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:30–41.
3. Karlic H, Lohninger A. Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition*. 2004;20:709–715.
4. Brass EP. Supplemental carnitine and exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000;72: 618S–623S.
5. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab*. 2012;15:764–777.
6. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:99–107.
7. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106: 171–176.
8. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, et al. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes*. 2002;51:599–605.
9. Lindeboom L, Nabuurs CI, Hoeks J, et al. Long-echo time MR spectroscopy for skeletal muscle acetylcarnitine detection. *J Clin Invest*. 2014;124: 4915–4925.
10. Kreis R, Jung B, Rotman S, et al. Non-invasive observation of acetyl-group buffering by ^1H -MR spectroscopy in exercising human muscle. *NMR Biomed*. 1999; 12:471–476.
11. Lindeboom L, Bruls YM, van Ewijk PA, et al. Longitudinal relaxation time editing for acetylcarnitine detection with ^1H -MRS. *Magn Reson Med*. 2016.
12. Ren J, Lakoski S, Haller RG, et al. Dynamic monitoring of carnitine and acetylcarnitine in the trimethylamine signal after exercise in human skeletal muscle by 7 T ^1H -MRS. *Magn Reson Med*. 2013;69:7–17.
13. Just Kukurova I, Valkovič L, Bogner W, et al. Two-dimensional spectroscopic imaging with combined free induction decay and long-TE acquisition (FID echo spectroscopic imaging, FIDESI) for the detection of intramyocellular lipids in calf muscle at 7 T. *NMR Biomed*. 2014;27:980–987.

14. Valkovič L, Gajdošík M, Traussnigg S, et al. Application of localized ^{31}P MRS saturation transfer at 7 T for measurement of ATP metabolism in the liver: reproducibility and initial clinical application in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Eur Radiol.* 2014;24:1602–1609.
15. Just Kukurová I, Valkovič L, Ukropec J, et al. Improved spectral resolution and high reliability of in vivo ^1H MRS at 7 T allow the characterization of the effect of acute exercise on carnosine in skeletal muscle. *NMR Biomed.* 2016;29:24–32.
16. Tušek Jelenc M, Chmelík M, Bogner W, et al. Feasibility and repeatability of localized ^{31}P -MRS four-angle saturation transfer (FAST) of the human gastrocnemius muscle using a surface coil at 7 T. *NMR Biomed.* 2016;29:57–65.
17. De Palo E, Gatti R, Crivellaro C, et al. Plasma carnitine and acetyl-carnitine levels at different times of the day. *Clin Physiol Biochem.* 1987;5:95–102.
18. De Palo E, Gatti R, Varnier M, et al. Plasma acetyl-carnitine concentrations during and after a muscular exercise test in patients with liver disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992;30:179–186.
19. Hiatt WR, Regensteiner JG, Wolfel EE, et al. Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans. Dependence on skeletal muscle metabolic state. *J Clin Invest.* 1989;84:1167–1173.
20. Seiler SE, Koves TR, Gooding JR, et al. Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and muscle fatigue during exercise. *Cell Metab.* 2015;22:65–76.
21. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson.* 1997;129:35–43.
22. Deichmann R, Haase A. Quantification of T_1 values by SNAPSHOT-FLASH NMR imaging. *J Magn Reson.* 1992;612:608–612.
23. Hamilton G, Middleton MS, Bydder M, et al. Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification. *J Magn Reson Imaging.* 2009;30:145–152.
24. Gollnick PD, Sjödin B, Karlsson J, et al. Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch.* 1974;348:247–255.
25. Horowitz JF, Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:558S–563S.
26. Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, et al. Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E133–E142.
27. Groop LC, Bonadonna R, DelPrato S, et al. Effect of prolonged overnight fasting on energy metabolism in non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1990;123:30–36.
28. Bahr R, Høstmark AT, Newsholme EA, et al. Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines. *Acta Physiol Scand.* 1991;143:105–115.
29. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol.* 2007;581:431–444.

5.4 Non-invasive proton and phosphorous magnetic resonance spectroscopy suggests multifactorial differences in the skeletal muscle energy metabolism between triathletes and normally active volunteers (*Publikation im Juli 2017 geplant*)

Nachdem in den vorangegangenen Studien die Möglichkeit und der Einsatz der Magnetresonanztomographie (^1H MRS) und der Nachweis des Acetylcarnetin durch (^{31}P MRS) erfolgreich war, wurde in der letzten Studie insbesondere ein möglicher Zusammenhang zwischen den beiden Stoffwechselprozessen untersucht. Da in der Einführung bereits die Hintergründe zum Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beschrieben wurde, und diese beiden sich unablässig bedingen und somit die metabolische Flexibilität des menschlichen Energiestoffwechsels gewährleisten, war es die Hauptfragestellung der vorliegenden Untersuchung inwieweit der Trainingszustand sich dahingehend auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden bei 13 Triathleten und 10 normal aktiven männlichen Probanden jeweils beide Untersuchungen durchgeführt. Um den Trainingszustand zu erheben wurde bei allen Probanden eine Spiroergometrie durchgeführt. Für die Gruppe der Triathleten sollte ein Einschlusskriterium von $50 \text{ (mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})$, der VO_2max gelten, welches sich nach den Spiroergometrien mit $53.73 \pm 4.09 \text{ VO}_2\text{max (mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})$ bestätigte, während die Gruppe der normal Aktiven eine $\text{VO}_2\text{max (mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})$ von 37.82 ± 4.07 erreichten. Alle Triathleten befanden sich zum Zeitpunkt der Messungen im normalen Trainingszustand und verfolgten keine besondere Diät. Die Gruppe der normal Aktiven zeichnete sich durch regelmäßige körperliche Aktivität aus (2-3mal/ Woche Bewegung bzw. Sport in Vereinen oder individuelle sportliche Bewegung im Ausmaß von max. 3 Std. pro Woche). Aufgrund der Tatsache, dass die Untersuchung am Oberschenkelmuskel durchgeführt wurde, lag ein weiteres Einschlussverfahren – um ein möglichst homogene Gruppe zu erhalten - bei den Triathleten auf ihren erreichten Radzeiten vergangener Wettkämpfe (20 km ~ unter 0:39:00,00 und 40 km ~ unter 1:10:00,00)

Auch galt wie in den bereits durchgeführten Studien ein genauer Zeitplan für die Messung und die Ernährung. Keine exzessive Belastung der Muskulatur 24 vor den Messungen & keine spezielle Diät. Das Messprotokoll war vergleichbar mit den vorangegangenen Untersuchungen und wird in der Folge kurz skizziert. Messdauer ca. 45 min

Vorbereitung Proband in Rückenlage, Einstellung der Messposition Platzierung des Voxels im M. vastus medialis, gefolgt von den Messungen der ^1H MRS zur Bestimmung des Acetylcarnetin und der IMCL und des Carnosine. Wechsel der Spulen und drehen des Probanden in Bauchlage zur Positionierung der Spule und dem Ergometer. Messung via P-MRS zur Bestimmung der PCR /ATP rate in Ruhe und unter Belastung. Eine dementsprechende Grafik findet sich in der nachfolgenden Studie.

Die Absicht dieser Studie war es, den Skelettmuskelstoffwechsel von Athleten mit gesunden aktiven Personen durch eine nicht-invasive mehrkernige MRS zu untersuchen und zu vergleichen. Unseres Wissens nach ist dies die erste Studie, die kombinierte Ergebnisse aus lokalisierten, statischen ^1H MRS und statischen + dynamischen ^{31}P MRS kombiniert.

Die Ergebnisse zeigen neben dem zu erwartenden Unterschied in der maximalen aeroben Kapazität (VO_2max) auch den anderen in metabolischen Parametern, die von MRS gemessen wurden, signifikante Unterschiede. Demnach konnten Unterschiede zwischen den IMCL-Werten ($p = 0,007$), eine niedrigere PCr-Konzentration ($p = 0,016$) und ein PCr / Pi-Verhältnis ($p = 0,048$), höherer pH-Werte am Ende der Belastung ($p = 0,017$), schnellere PCr-Erholungskonstante (τPCr) ($p = 0,001$) und einen höheren maximalen Oxidationsfluss (Qmax) ($p = 0,034$) gefunden werden.

Zusätzlich wurden die Korrelationen zwischen Parametern, die aus beiden MRS-Messungen extrahiert wurden, ausgewertet.

In der Triathlet-Gruppe konnte ein 50% höheren IMCL-Gehalt im vastus lateralis-Muskel, eine 12% niedrigere PCr-Konzentration und eine um 16% verringertes $[\text{PCr}] / [\text{Pi}]$ -Verhältnis in Ruhe, sowie einen 2% höheren pH-Wert am Ende der Übung festgestellt werden. Die 35% schnellere PCr-Resyntheserate (τPCr) und eine 29% erhöhte mitochondriale Kapazität (Qmax). Bezüglich des signifikant höheren IMCL Wertes, welcher normalerweise auf eine Insulinresistenz beim Menschen hindeutet wird in der nachfolgenden Diskussion genauer eingegangen.

Non-invasive proton and phosphorous magnetic resonance spectroscopy suggests multifactorial differences in the skeletal muscle energy metabolism between triathletes and normally active volunteers

R. Klepochová^{1,2}, T. Hochwartner³, N. Bachl³, H. Tschan³, C. Triska³, S. Trattning^{1,4}, L. Valkovič^{5,6},
M. Krššák^{1,7,8}

¹High-Field MR Center, Department of Biomedical Imaging and Image-Guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna, Austria,

²Central laboratories, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia,

³Centre of Sport Science and University Sport, University of Vienna, Vienna, Austria,

⁴Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna, Austria,

⁵University of Oxford Centre for Clinical Magnetic Resonance Research, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom,

⁶Department of Imaging Methods, Institute of Measurements Science, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia,

⁷Vienna, AT, Medical University of Vienna, Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular Imaging, MOLIMA

⁸Vienna, AT, Medical University of Vienna, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III,

Corresponding Author:

Martin Krššák, Ph.D.

Associate Professor

Division of Endocrinology and Metabolism

Department of Internal Medicine III

Medical University of Vienna

Währinger Gürtel 18-20

1090 Wien

Austria

Martin.krssak@meduniwien.ac.at

Phone: +43 – 1 – 40 400 37710 Fax: + 43 – 1- 40 400 76300

Abstract:

Until recently, influence of endurance training on skeletal muscle metabolism was studied only by invasive sampling or a few related metabolites were investigated by either ^1H or ^{31}P MRS. This study provide results from both, phosphorus (^{31}P) and proton (^1H) magnetic resonance spectroscopy (MRS), at once measured on endurance trained triathletes and normal healthy volunteers. Moreover, by ^{31}P MRS we realized static measurement as well as dynamic experiment. Thirteen male triathletes and ten healthy active male volunteers participated in the study. The measurements were conducted at ultra-high field 7T and were divided into two parts. First, ^1H MRS data were acquired. Afterwards, for the ^{31}P MRS measurement the volunteers were strapped into an ergometer dedicated for knee extension exercise. The ^{31}P MRS protocol consisted of 6 minutes measurement at rest followed by 6 minutes of knee extension exercise and ending with 6 minutes of recovery. Saturation transfer experiment was also included in the ^{31}P MRS protocol. The triathletes group exhibited significantly higher intramyocellular (IMCL) levels, lower resting phosphocreatine (PCr) concentration and PCr/Pi ratio (Pi - inorganic phosphate), higher pH at the end of exercise, faster PCr recovery constant (τPCr) and higher maximal oxidative flux (Q_{max}). Multivariate stepwise regression analysis identified phosphodiester (PDE) as the strongest independent predictor of maximal maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$), PCr at the end of recovery as the strongest independent predictor of acetyl-carnitine and Pi at rest as the strongest independent predictor of IMCL.

In conclusion, we cannot suggest single MRS based parameter for the exclusive biomarker of fitness and training status. It is rather a combination of different parameters, such as acetylcarnitine, PDE and PCr metabolism following the acute exercise challenge, which can be assessed during a single clinically acceptable multinuclear MRS session suggesting itself for further broad population cross sectional and/or focused interventional studies.

Introduction

The human skeletal muscle is the major tissue responsible for energy metabolism, glycogen storage and glucose uptake (DeFronzo et al. 1981)(DeFronzo and Tripathy 2009). It is well known that endurance training alters functional demands in skeletal muscle (Fujimoto et al. 2003) and that athletes with background of endurance training have a better oxidative metabolism (Pette 1998), improved glucose uptake (Fujimoto et al. 2003), enhanced capillarity and increased mitochondrial density (Pette 1998). Moreover, long-term endurance training has been shown to modify the muscle fibre distribution, with a shift closer to the slow-twitch muscle fibres (Saltin et al. 1977). Most of these knowledge results from systemic or invasive measurements, which might result in negative consequences for the training process and competition performance of athletes, respectively

Magnetic resonance measurements is a non-invasive option which can be applied in research as well as in clinical settings of the muscular-skeletal apparatus. Especially proton (^1H) and phosphorous (^{31}P) magnetic resonance spectroscopy can provide information of metabolic status of the tissue. It has been

reported that the carnosine content, which is assessable by localized ^1H MRS, could be a good indicator for estimating muscle fibre composition as is present in different concentrations in slow-twitch than in fast-twitch fibres (Baguet et al. 2011)(Derave et al. 2010). A well studied phenomenon in the context of skeletal muscle of endurance athletes are elevated intramyocellular lipids (IMCL) (Amati et al. 2011)(Goodpaster et al. 2001)(Dubé et al. 2008). However, elevated IMCL level can also be found in sedentary population where in most cases it suggest an impaired glucose uptake which closely related to insulin resistance (Krssak et al. 1999) and contributes to development of obesity and type 2 diabetes mellitus_(T2DM) (Kautzky-Willer et al. 2003)(Anderwald et al. 2002). However,, high IMCL levels alone, cannot be taken as a sign of lipid metabolism defect, as endurance trained athletes also have shown high IMCL concentration without metabolic impairment (Thamer et al. 2003)(van Loon et al. 2004). Another metabolite which is assessable by ^1H MRS muscle is acetylcarnitine, playing an important role in lipid metabolism (Borum 1991).Acetylcarnetine also correlates with insulin resistance (Lindeboom et al. 2014). The highest fasting concentrations of acetylcarnitine have been observed in endurance-trained athletes and the lowest in T2DM patients, respectively (Lindeboom et al. 2014). Therefore, muscle acetylcarnitine concentration can potentially help to resolve the athletes-paradox of high IMCL. Applying alternative ^{31}P MRS elevated skeletal muscle phosphodiesterases (PDE) content in age-matching participants was suggested as a marker of muscle fitness (Valkovič et al. 2017)(Hug et al. 2006)(Hug et al. 2005)(Bernús et al. 1993). Further, direct information about changes in mitochondrial density in response to training can be provided by alkaline inorganic phosphate (Pi) pool (Pi_2) concentration or Pi_2/Pi ratio (Kan et al. 2010) (Valkovič et al. 2016). ^{31}P MRS additionally allows the measurement of energy-rich metabolites i.e. phosphocreatine (PCr), ATP and Pi (Kemp et al. 1993). In particular, dynamic ^{31}P MRS can be used for the study of oxidative energy production by mitochondria during exercise and subsequent recovery (Valkovič et al. 2017). Summarizing, both ^{31}P and ^1H MRS provide ideal non-invasive tools for the *in vivo* assessment of skeletal muscle metabolism, which plays an essential role in the energy metabolism of the whole body and is the key factor for athletic performance

The non-invasive assessment of performance-related characteristics of skeletal muscles, both in athletes and sedentary persons has been a long-term goal in Sport Science which could not be realized until recently.. The combination of different MRS based methods on lower clinical field systems has been limited by insufficient spectral resolution and rather low signal-to-noise-ratio which resulted in rather long signal acquisition time, making the comprehensive measurement not suitable for clinical praxis.

Multi-nuclear MR examinations at magnetic field of 7T provide, in general, better spectral resolution, higher repeatability and improvements leading to the opportunity to measure subtle signals of parameters for energy metabolism (i.e. alkaline Pi pool (Pi_2), glycerol-phosphocholine (GPC), glycerol-phosphoethanolamine (GPE)) which to our best knowledge have never been measured in athletes in an integrative study.

to The current study aimed to compare the training status and metabolic differences in vastus lateralis muscle in two groups of volunteers: healthy active individuals and endurance trained-triathletes by

multinuclear MRS at 7T. IMCL was studied to prove the hypothesis that acetylcarnitine levels is increased in triathletes as a result of enhanced fatty acid oxidation and fatty acids transport. Additionally possible differences in carnosine levels between groups as a consequence of fibre-type distribution and based on findings that regular exercise can improve antioxidant defence system have been studied. Moreover, endurance-trained athletes should have higher volume of mitochondrial density and therefore (iv) faster oxidative metabolism (Befroy et al. 2008) and (v) faster PCr resynthesis following submaximal exercise (Bogdanis 2012). As the final point we aimed the bivariate and multivariate analysis of the interrelations between the MRS derived and metabolic parameters.

Methods

Study population

Thirteen male triathletes (age 28.2 ± 5.7 years, BMI 22.3 ± 1.4) and ten healthy active male volunteers (age 26.2 ± 4.7 years, BMI 22.8 ± 2.6) participated in the study.

All participating athletes were in the pre-season preparation phase without any special training dedicated methods, and without special diet or nutrition supplementation.

Inclusion criterion for triathletes was the time they needed for 20 km (maximum to be included: 39:00 min:sec) and 40 km (maximum to be included 1:10:00 hour:min:sec) cycling distances during the past competitions.

For the group of active volunteers the inclusion factor was normal and regular physical activity (e.g.: cycling, running, gym, team sports) up to three times per week. No special nutrition and supplementation or any physical activity like weightlifting or special strength training was required as an inclusion factor.

All participants, triathletes and healthy active volunteers, respectively did not perform any physical activity 24h before testing and had no other changes in daily routine. Written, informed consent was provided before commencing and the study protocol following the local ethics committee requirements.

One week before MR examinations, all participants underwent a standardized protocol for the determination of maximal oxygen uptake (VO_{2max}) on a bicycle ergometer (Lode Excalibur, Groningen, The Netherlands) with continuous increments, until exhaustion, Measurement of VO_{2max} was performed via “breath-by-breath” Spiroergometry (Master CPX, VIASYS Healthcare).

Magnetic resonance (MR) measurements

The entire MR examination protocol was performed within a single visit, starting at the same time in the afternoon approximately 1 hour after the standard mixed meal lunch. All MR measurements were performed on a 7T whole-body MR system (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). A 28-channel knee

coil (QED, Mayfield Village, OH, USA) was used to acquire ^1H MR spectra and a dual-tuned ($^{31}\text{P}/^1\text{H}$) circular surface coil (10 cm diameter, Rapid Biomedical, Rimpar, Germany) was used to acquire ^{31}P MR spectra from the quadriceps of the left leg.

The measurements were divided into two parts. First, volunteers were lying in the supine position with the left thigh muscle placed inside the 28-channel knee coil and ^1H MRS data were acquired. Afterwards, for the ^{31}P MRS measurement the volunteers turned into the prone position and their thigh muscle was strapped into an MR compatible ergometer (Quadspect, Ergospect, Innsbruck, Austria) dedicated for knee extension exercise. The exercise resistance was set to 30% of the maximal voluntary contraction force, determined by repeated measurement of the maximum force generated against the pedal fixed in the exercise position. The $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ surface coil was positioned under the thigh muscles of the left leg. The ^{31}P MRS protocol consisted of 6 minutes measurement at rest (four-angle saturation transfer (FAST) at rest + baseline data) followed by 6 minutes of knee extension exercise (including FAST measurement) and ending with 6 minutes of recovery. The volunteers were instructed by an audio signal to time the contraction-relaxation periods (exercise frequency 0.5 Hz), so that the spectra were acquired always in the relaxed state of the muscle.

A schematic illustration of the experimental design, is shown in Figure 1.

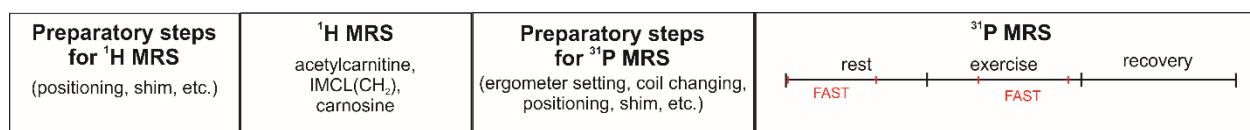


Figure. 1: Schematic representation of the measurement protocol. The ^{31}P MRS protocol consisted of 6 minutes measurement at rest (four-angle saturation transfer (FAST) at rest + baseline data) followed by 6 minutes of knee extension exercise (including FAST measurement) and ending with 6 minutes of recovery.

^1H MRS

T_1 weighted multi-slice localizer images were acquired and used for volume of interest (VOI) positioning. Spatial selection was achieved using a STEAM localization sequence and the VOI of 21ml ($40 \times 35 \times 15 \text{ mm}^3$) was carefully placed in the vastus lateralis (VL) muscle. Voxel positioning was guided by images for proper adjustment of voxel geometry and orientation to fit the actual shape of subject's muscle and to avoid the boundaries of muscle and subcutaneous tissue. Localized shimming was performed manually, on the adjustment volume that matched the VOI, after automatic field-map acquisition based on gradient recalled, double echo field-map acquisition (GRE-SHIM, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). The final linewidth of water signal was in the range of 28–38 Hz in magnitude mode.

Signals of acetylcarnitine and IMCL was measured with following parameters: TR/TE= 2000/350 ms; spectral bandwidth= 3 kHz; number of averages= 128; delta frequency= -2.5 ppm relative to water resonance; number of preparation scans= 4 (Klepočová et al. 2017).

MR signal of carnosine was measured with water signal suppression and following parameters: TR/TE= 9000/20 ms; spectral bandwidth= 3 kHz; number of averages= 64, delta frequency= 2.8 ppm relative to water resonance; number of preparation scans= 0 as was described by (Just Kukurová et al. 2016).

For determination of concentration reference, the water signal was measured with TR= 2000 ms and TE= 20 ms; number of averages= 1; delta frequency= 0 ppm.

³¹P MRS

Depth resolved *in vivo* spectroscopy (DRESS) localization was used for ³¹P MRS signal detection. In particular, a 15 mm thick MRS selection slab representing the volume of interest was placed over the vastus lateralis muscle in each volunteer individually based on localizer images, and manual shimming was performed. 90° flip angle (FA) was adjusted by finding the RF transmit voltage providing the maximum of localized PCr signal.

For the assessment of metabolite concentrations at rest, static ³¹P MR spectra (FA = 90°, TE* = 0.4 ms, TR = 15 s, NA = 8) were acquired. DRESS-localized four-angle saturation transfer (FAST) measurements were made in two experiments, the first with a nominal FA of 52° (β) and NA = 8, and the second with a nominal FA of 15° (α) and NA = 24. Both experiments were performed with TR= 2s, TE= 0.4 ms as described Tušek Jelenc et al. (Tušek Jelenc et al. 2016). The static part of measurement was followed by dynamic part with 2 minutes of baseline measurement, 6 minutes of knee extension exercise and next 6 minutes of recovery. Two minutes into the exercise period FAST experiment was performed to assess reactions of creatine kinase (CK) and the ATP synthesis/hydrolysis cycle during exercise induced metabolic steady state as described by Tušek Jelenc et al. (Tušek Jelenc et al. 2016).

Data processing, calculations, and statistical analysis

All measured spectra were analyzed using jMRUI (Java-Based Magnetic Resonance User Interface; version 5) with the AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral Fitting) time-domain fitting algorithm (Vanhamme, van den Boogaart, and Van Huffel 1997).

¹H MRS

Spectral lines of acetylcarnitine, carnosine, IMCL, and water were fitted as a single Lorentzians. Lipid signals surrounding the acetylcarnitine peak were fitted with a constrained frequency of 2.0 – 2.1 ppm and 2.17 – 2.30 ppm to avoid their influence on fitted acetylcarnitine.

C₂-H peak of carnosine, resonating at 8 ppm, was fitted after removing of residual peak of water and lipids by an Hankel Lanczos Squares Singular Values Decomposition (HSVLD) algorithm, as it was shown to be more robust of two available carnosine signals (Just Kukurová et al. 2016).

Using the water peak as an internal reference, the concentration of acetylcarnitine and carnosine, were calculated according to the formula for milimolar concentration in wet weight (mmol/kg ww):

$$C_m = C_{H_2O} \cdot (S_m/S_{H_2O}) \cdot (n_{H_2O}/n_m) \cdot (CF_{H_2O}/CF_m) \cdot w_{H_2O}$$

where S is the signal intensities of H₂O-water, m- acetylcarnitine or carnosine, n is the number of corresponding protons in water (n=2), acetylcarnitine (n=3) or carnosine (n=1) molecule, CF is correction factors for T₁ and T₂ relaxations, C_{H₂O}=55.56mol/L is the concentration of the water, and w_{H₂O} is the approximate water content of skeletal muscle tissue, i.e., 0.77 l/kg wet weight of the tissue.

IMCL CH₂ (methylene) at 1.3 ppm was fitted, corrected for T₁ and T₂ relaxation effect and expressed as a percentage of water content. We have used literature relaxation times for T₁ and T₂ corrections (Klepočová et al. 2017)(Just Kukurová et al. 2016)(Ren et al. 2011)

³¹P MRS

The resonance lines of PCr, Pi, Pi₂, and phosphodiesteres (PDEs) - glycerol-phosphocholine (GPC) and glycerol-phosphoethanolamine (GPE) – were fitted as single Lorentzians, whereas γ- and α- ATP were fitted as doublets and β- ATP as a triplet. The frequency of the Pi₂ peak was constrained with respect to the expected frequency difference between Pi₂ and Pi to ~0.4 ppm (Kan et al. 2010). For the FAST experiment the linewidths of PCr and Pi were determined from the highest-signal-to-noise ratio spectra and then constrained to ±5 Hz (Tušek Jelenc et al. 2016)(Valkovič et al. 2016).

For the Fast experiment, the apparent relaxation time T_1^{app} was calculated from

$$T_1^{app} = - \frac{T_R}{\ln \left[\frac{\sin \alpha - R' \cdot \sin \beta}{\cos \beta \cdot \sin \alpha - R' \cdot \cos \alpha \cdot \sin \beta} \right]}$$

where $R' = M'(\alpha)/M'(\beta)$ is the ratio of partially saturated signals acquired with the two FAs, α and β. Based on the calculated T_1^{app} values the pseudo-first-order rate constant of the ATP synthesis reaction (k_{ATP}) and the CK forward reaction (k_{CK}) were calculated from

$$k = \frac{1}{T_1^{app}} \cdot \left(1 - \frac{M_z}{M_0} \right)$$

where M_z is the steady state magnetizations of Pi and PCr and M_0 is the equilibrium magnetizations of Pi and PCr measured (Valkovič, Chmelík, et al. 2013)(Tušek Jelenc et al. 2016). For the absolute quantification of metabolite concentrations, a cellular γ-ATP concentration of 8.2mM was assumed (Taylor et al. 1986). Forward metabolic fluxes (F_{ATP} , F_{CK}) were the product of k_{ATP} and k_{CK} times the concentration of Pi and PCr, respectively (Valkovič et al. 2017).

The shift in resonance position between PCr and Pi signals was used to calculate intramyocellular pH (Moon and Richards 1973) according to the Henderson-Hasselbalch equation. ADP concentration was

calculated according to the modified method described by Kemp et al. (Kemp et al. 1993) assuming that 15% of total creatine [Cr] was not phosphorylated in the resting state.

To calculate the time constant of PCr resynthesis (τ_{PCr}) i.e. oxidative capacity, the PCr signal changes during the recovery period of the dynamic experiment were fitted to a mono-exponential function using MATLAB. This was used to calculate the initial PCr recovery rate (V_{PCr}), which roughly represents ATP turnover at the end of exercise and the maximal rate of oxidative phosphorylation i.e. mitochondrial capacity (Q_{max}) was calculated according to the ADP-based model of Michaelis and Menten (Kemp et al. 1993)(Valkovič, et al. 2013)(Valkovič et al. 2016).

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ standard deviations and were compared between the two groups by an unpaired Student t-test. The relationships between metabolic parameters determined using ^1H MRS and ^{31}P MRS were analyzed by linear correlations Microsoft Office Excel (2010), using Pearson's correlation coefficient (two-tailed probability values) to estimate the strength of the relationship. Correlation coefficient of absolute value of 0.415 corresponding to 95% confidence agreement was taken as significant,. A stepwise regression analysis for the dependent variable $\text{VO}_{2\text{max}}$ was performed using the independent variables (i.e. IMCL, τ_{PCr} , $\text{pH}_{\text{end of exercise}}$, Q_{max} , PDE). A similar multivariate regression analysis was performed for the dependent variables IMCL and acetylcarnitine. The results were considered statistically significant for $p < 0.05$.

Results

All tested athletes did not exceed the maximal allowed cycling times and the group mean time reached a 0:31:52, 85 min $\pm$ SD 0:02:39, 81 min for 20 km distance and 01:03:00, 92 min $\pm$ SD 0:03:24, 42 min for 40km distance.

Skeletal muscle metabolism of triathletes

As expected, in comparison to healthy active volunteers, triathletes had a significantly higher maximal aerobic capacity ($\text{VO}_{2\text{max}}$), ($p=0.000$). Additionally, triathletes also differed in metabolic parameters measured by MRS, in particular the triathletes group exhibited significantly higher IMCL ($p=0.013$) levels (Figure 2), lower resting PCr concentrations ($p=0.016$) (Figure 3) and PCr/Pi ratios ($p=0.048$), higher pH at the end of exercise ($p=0.017$), faster PCr recovery constant (τ_{PCr}) ($p=0.001$) and higher maximal oxidative flux (Q_{max}) ($p=0.041$).

Detailed results of both participating study groups are shown in Figure 4 and listed in Table 1.

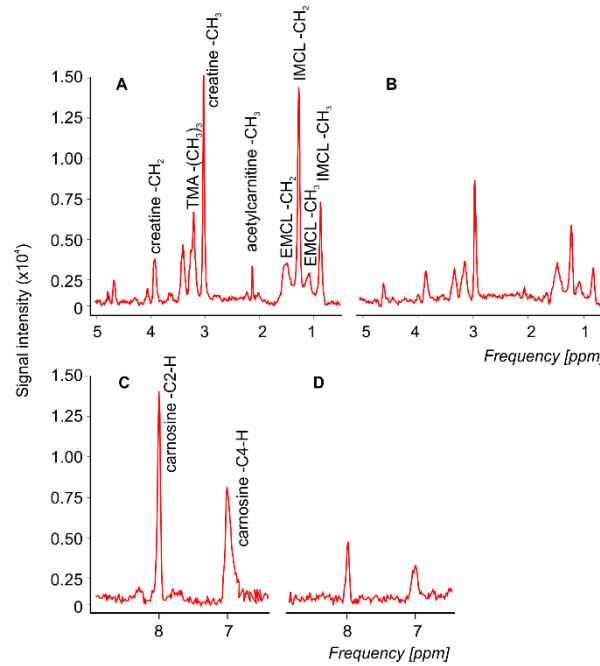


Figure 2: A representative ^1H MRS spectrum from triathlete (A) and healthy active volunteer (B) showing trimethyl ammonium (TMA) groups of carnitine, acetylcarnitine and choline, creatines, acetylcarnitine and extramyocellular (EMCL) and intramyocellular (IMCL) lipid resonance lines. Figure C presents carnosine spectral lines acquired from triathlete and D from healthy active volunteer. For better visualization, a 1.5-Hz Lorentzian apodization filter was applied to reduce noise in the spectra.

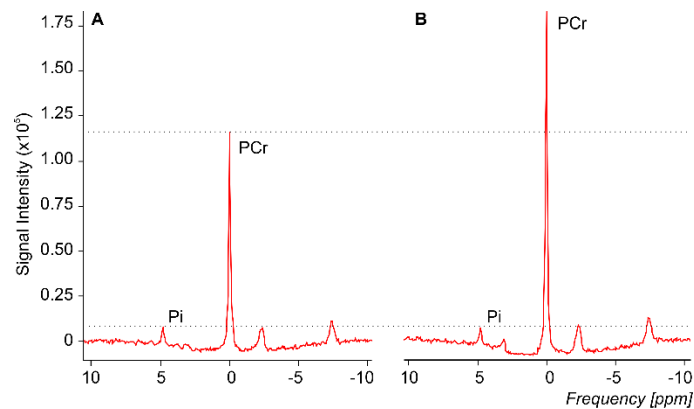


Figure 3: A representative ^{31}P MRS spectrum from triathlete (A) showing a lower concentration of PCr compared to the spectrum of the healthy active volunteer (B). For better visualization, a 3-Hz Lorentzian apodization filter was applied to reduce noise in the spectra.

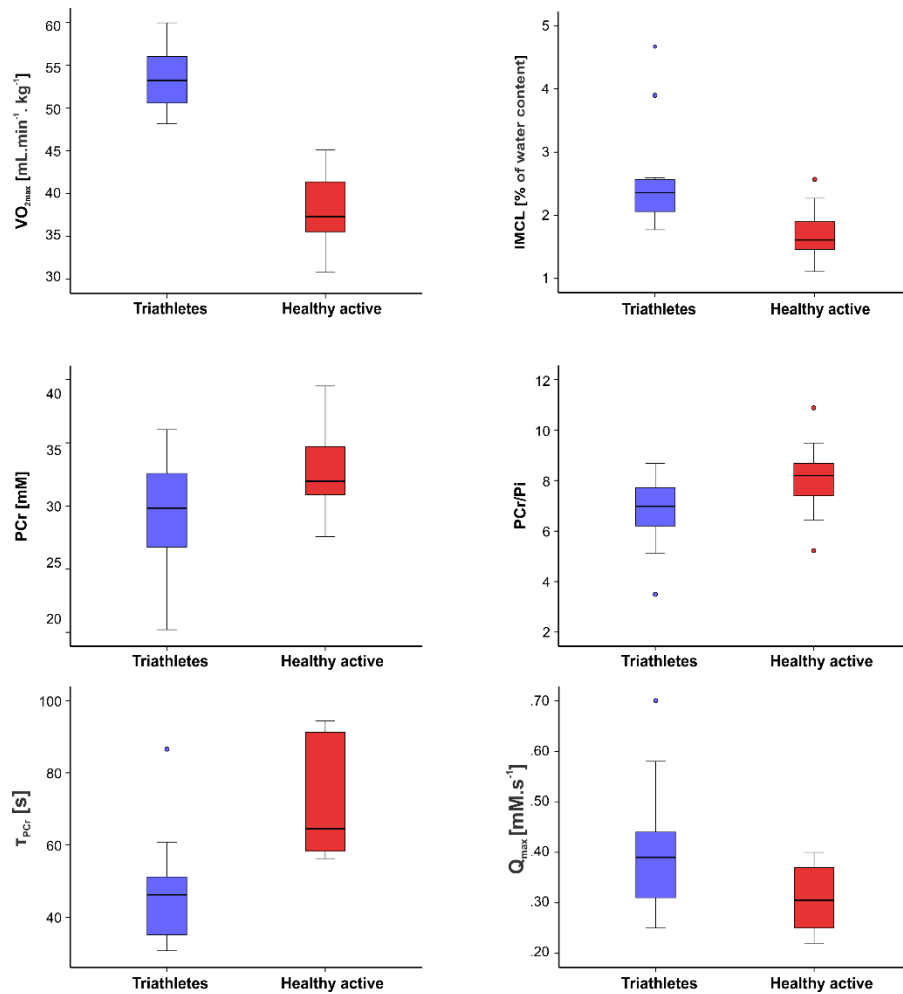


Figure 4: Box plots depicting the significantly different parameters between the two groups. The solid lines represent the median, boxes represent lower and upper quartiles, and whiskers the minimum and maximum. Outliers are denoted by circles. The outliers were also taken into account for all statistical tests.

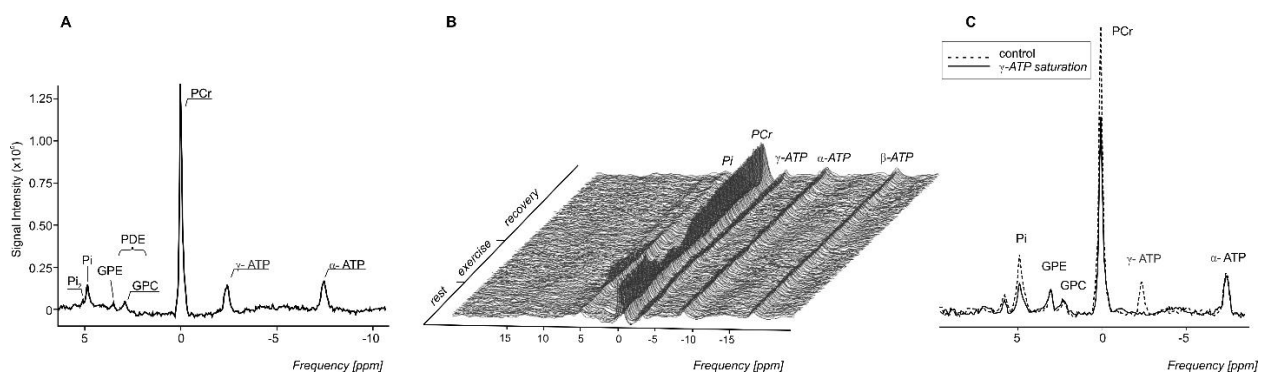


Figure 5: (A) A representative ^{31}P MR spectra (B) Time course of a ^{31}P MR spectra during a knee extension exercise with depicted depletion of PCr signal and its subsequent re-synthesis during recovery period (C) Saturation transfer spectra showing an effect of γ -ATP saturation (solid line) on Pi compared with control experiment (dashed line).

Table 1: Results from ^1H and ^{31}P MRS and spiroergometry. Data are given as mean $\pm$ standard deviation

Variable	Triathletes	Healthy active
N	13	10
Age (years)	28 $\pm$ 6	26 $\pm$ 5
BMI (kg.m^{-2})	22.3 $\pm$ 1.4	22.8 $\pm$ 2.6
$\text{VO}_{2\text{max}}$ ($\text{mL.min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)	53.7 $\pm$ 4.1	37.8 $\pm$ 4.1*
^1H MRS		
[Acetylcarnitine] (mmol/kg ww)	1.75 $\pm$ 0.94	1.61 $\pm$ 1.09
Acetylcarnitine/Creatine ratio	0.18 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.08
[Carnosine] (mmol/kg ww)	2.89 $\pm$ 0.61	2.46 $\pm$ 0.67
[IMCL CH_2] (% of water resonance peak intensity)	1.99 $\pm$ 0.68	1.32 $\pm$ 0.36*
^{31}P MRS Static		
[PCr] <i>at rest</i> (mM)	28.8 $\pm$ 3.9	32.9 $\pm$ 3.6*
[Pi] <i>at rest</i> (mM)	4.44 $\pm$ 1.30	4.15 $\pm$ 0.65
[PCr]/[Pi] <i>at rest</i> (mM)	6.79 $\pm$ 1.40	8.12 $\pm$ 1.56*
[GPC] (mM)	2.19 $\pm$ 0.61	2.71 $\pm$ 1.10
[GPE] (mM)	0.61 $\pm$ 0.32	0.83 $\pm$ 0.24
[PDE] (mM)	2.80 $\pm$ 0.75	3.54 $\pm$ 1.10
[Pi] (mM)	5.40 $\pm$ 0.95	5.75 $\pm$ 1.00
[Pi ₂] (mM)	0.49 $\pm$ 0.30	0.58 $\pm$ 0.22
Pi ₂ /Pi ratio	0.10 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.04
pH <i>rest</i>	7.06 $\pm$ 0.03	7.05 $\pm$ 0.04
^{31}P MRS Magnetization transfer at rest		
k_{ATP} (s^{-1})	0.11 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.04
F_{ATP} (mM.s^{-1})	0.48 $\pm$ 0.20	0.39 $\pm$ 0.16
k_{CK} (s^{-1})	0.24 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.08
F_{CK} (mM.s^{-1})	7.03 $\pm$ 2.33	7.36 $\pm$ 2.58
^{31}P MRS Magnetization transfer during exercise		
k_{ATP} (s^{-1})	0.08 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03
F_{ATP} (mM.s^{-1})	0.85 $\pm$ 0.39	0.72 $\pm$ 0.44
k_{CK} (s^{-1})	0.23 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.11
F_{CK} (mM.s^{-1})	4.24 $\pm$ 1.29	5.63 $\pm$ 2.97
^{31}P MRS Dynamic		
τ_{PCr} (s)	46.45 $\pm$ 15.73	72.26 $\pm$ 16.44*
PCr drop (%)	66.43 $\pm$ 15.32	62.81 $\pm$ 9.68
Pi increase (%)	365.30 $\pm$ 119.22	396.24 $\pm$ 60.42
V_{PCr} (mM.s^{-1})	0.21 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.05
Q_{max} (mM.s^{-1})	0.40 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.06*
[PCr] <i>end of recovery</i> (mM)	29.2 $\pm$ 3.9	31.9 $\pm$ 4.6
[Pi] <i>end of recovery</i> (mM)	2.87 $\pm$ 1.09	2.94 $\pm$ 0.87
[PCr] <i>end of exercise</i> (mM)	19.51 $\pm$ 5.53	19.70 $\pm$ 4.54
[Pi] <i>end of exercise</i> (mM)	10.18 $\pm$ 3.72	11.69 $\pm$ 4.20
[PCr]/[Pi] <i>end of exercise</i> (mM)	2.22 $\pm$ 1.27	1.90 $\pm$ 0.82
pH <i>end of exercise</i>	6.97 $\pm$ 0.09	6.86 $\pm$ 0.11*
[ADP] <i>end of exercise</i> (μM)	36.8 $\pm$ 20.98	28.2 $\pm$ 10.12

Correlations between the measured parameters

$\text{VO}_{2\text{max}}$ positively correlated with Q_{max} ($r = 0.47$, $p = 0.024$), IMCL ($r = 0.52$, $p = 0.011$), pH measured at the end of exercise ($r = 0.46$, $p = 0.027$) and negatively with τ_{PCr} ($r = -0.63$, $p = 0.001$) and PDE ($r = -0.48$, $p = 0.020$). Moreover, PDE positively correlated with BMI ($r = 0.53$, $p = 0.009$).

Several correlations were also found between the metabolic parameters extracted from the ^{31}P MRS measurements and the parameters from ^1H MRS, specifically acetylcarnitine negatively correlated with PDE ($r = -0.44$, $p = 0.036$) and the PCr_{end of recovery} ($r = -0.59$, $p = 0.003$). IMCL negatively correlated with τ_{PCr} ($r = -0.53$, $p = 0.009$), and PCr/Pi at rest ($r = -0.57$, $p = 0.005$) and positively with Pi at rest ($r = 0.68$, $p = 0.000$), Pi at the end of recovery ($r = 0.53$, $p = 0.009$) and age ($r = 0.47$, $p = 0.024$). Carnosine positively correlated with pH measured at the end of exercise ($r = 0.42$, $p = 0.046$).

Multivariate stepwise regression analysis identified [PDE] ($p = 0.004$) as the strongest independent predictor of $\text{VO}_{2\text{max}}$, PCr at the end of recovery ($p = 0.003$) as the strongest independent predictor of acetyl-carnitine and Pi at rest ($p = 0.0006$) as the strongest independent predictor of IMCL.

Representative correlations are depicted in Figure 5.

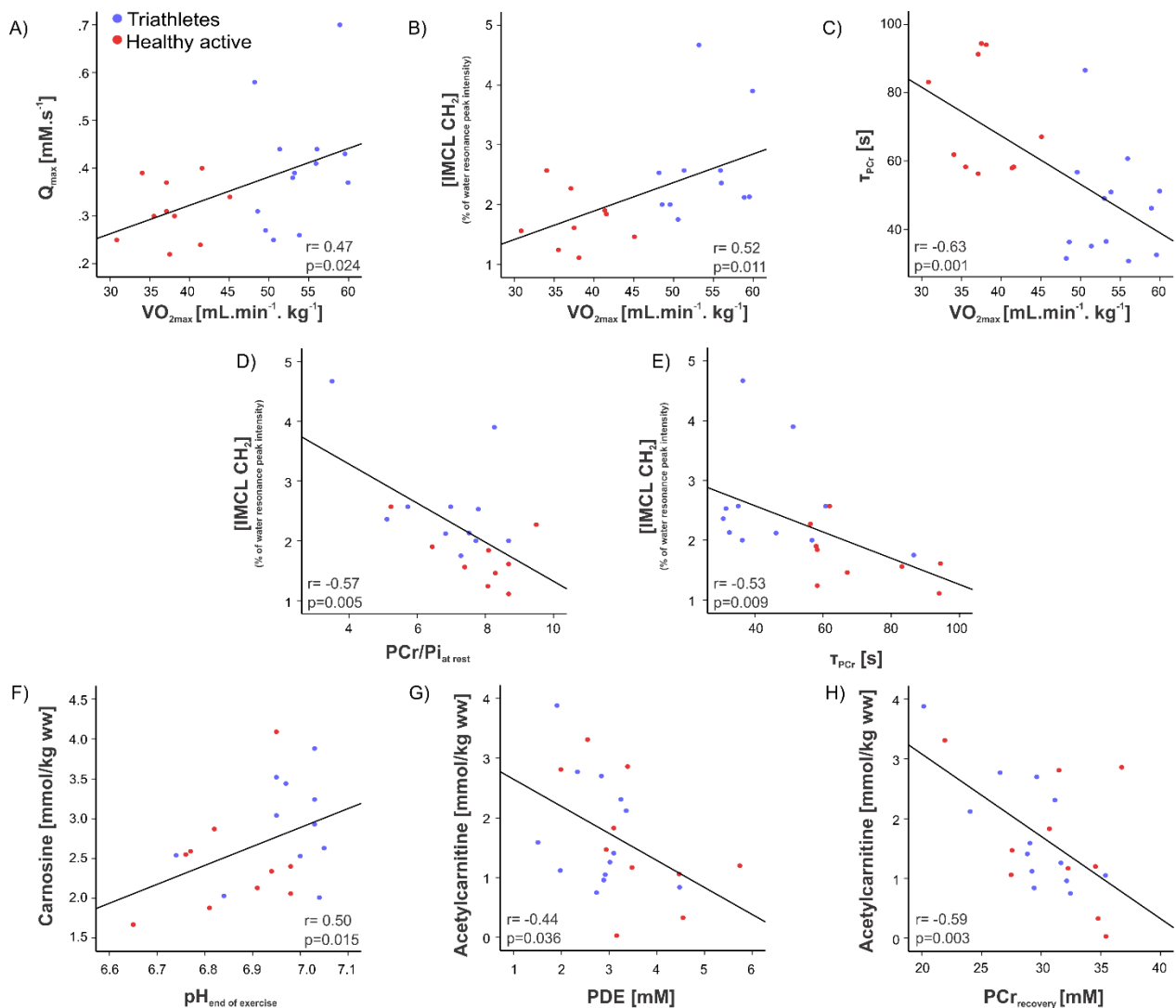


Figure 5: Plots of correlations between parameters measured by spiroergometry and MRS in triathletes and healthy active volunteers: (A) mitochondrial capacity (Q_{max}) with the maximum oxygen uptake (VO_{2max}); (B) intramyocellular lipid content (IMCL) with the VO_{2max} ; (C) PCr recovery (τ_{PCr}) with the VO_{2max} ; (D) IMCL with PCr/Pi ratio at rest; (E) IMCL with τ_{PCr} ; (F) carosine concentration with pH measured at rest; (G) acetylcarnitine concentration with phosphodiesteres (PDE) and (H) acetylcarnitine concentration with concentration of PCr during recovery.

Discussion

The purpose of this study was to investigate skeletal muscle metabolism of athletes in comparison to healthy active participants by non-invasive multinuclear MRS. To our best knowledge, this is the first study showing combined results from localized, static ^1H MRS and static + dynamic ^{31}P MRS in this population at once. In addition, the correlations between parameters extracted from both MRS measurements were evaluated. As a most representative and mostly frequently studied region from skeletal muscles in men, including invasive studies, is a vastus lateralis, we also focus on this type of muscle.

The most important findings in our study were: In the group of triathletes additionally to a 42% higher VO_{2max} , in vastus lateralis a 50% higher IMCL content was assessed, PCr concentration was 12% lower and [PCr]/[Pi] ratio at rest 16% lower, respectively. Additionally there was a 2% higher pH at the end of exercise, a 36% faster PCr resynthesis (τ_{PCr}) and a 29 % higher mitochondrial capacity (Q_{max}).

Levels of IMCL in vastus lateralis muscle were significantly higher in triathletes. In sedentary population increased skeletal muscle IMCL lipid content has been associated with insulin resistance in human obesity and T2DM but endurance-trained athletes have IMCL content similar to that observed in insulin-resistant obese and T2DM subjects (Dubé et al. 2008). This was already described as an athlete's paradox that despite a higher amount of IMCL in skeletal muscles of endurance trained individuals, no impairment in insulin sensitivity was observed (Thamer et al. 2003)(van Loon et al. 2004)(Tarnopolsky et al. 2006)(Dubé et al. 2008). Higher levels of IMCL in triathletes group can be as a consequence for increased need for and efficiency of fatty acids oxidation during long-lasting exercise bouts (Gacesa et al. 2016). This observation agrees with our significant interaction between IMCL content and VO_{2max} and was already observed by (Machann et al. 2004) (Thamer et al. 2003).

In the context of higher amount of IMCL in skeletal muscle of endurance trained athletes together with an idea about enhanced fatty acid oxidation and importance in maintaining insulin sensitivity (by conversion of acetyl-CoA into acetylcarnitine) the acetylcarnitine levels among two groups of volunteers have been compared. However, no significant between-group difference was observed. Only a few studies investigated differences in concentrations of acetylcarnitine/carnitine in trained groups of volunteers. The effect or link between T2DM and the concentration of acetylcarnitine is a more intensive studied issue (Adams et al. 2009)(Dambrova and Liepinsh 2015)(Mingrone 2004). However, slightly higher acetylcarnitine concentration (biopsy samples from the vastus lateralis muscle) were observed in type slow-twitch fibers probably due to of the greater potential for fat oxidation in those type of fibers (Constantin-Teodosiu et. al. 1996). This would suggest higher concentration of acetylcarnitine in triathletes group. In the past we have also found significantly higher acetylcarnitine concentration in vastus lateralis muscle of moderately trained volunteers when compared to normally active (measured non-invasively by ^1H MRS), whereas in

soleus muscle the concentrations were similar in both groups (Klepočová et al. 2017). In this previous study moderately trained volunteers of mix gender including cyclists and tennis players, participated. However in the recent study the focus was on highly endurance trained male triathletes.. Lindeboom et al. (2014) also included groups of endurance-trained, lean sedentary, obese sedentary and T2DM in their study analysing and comparing skeletal muscle acetylcarnitine concentrations in these different sub-groups. They found significant differences only between the endurance trained group and the T2DM group, respectively. No differences could be detected by comparing endurance trained and lean sedentary, or obese sedentary study participants (Lindeboom et al. 2014). Moreover, Seiler et al. in ^1H MRS study with cohort of trained and untrained subjects investigate an exercise-induced acetylcarnitine metabolism and did not find differences in acetylcarnitine concentrations in the baseline measurement, before exercise, (Seiler et al. 2015). Both Seiler's and Lindeboom's group did not specify gender and sports discipline of their endurance trained volunteers (Lindeboom et al. 2014)(Seiler et al. 2015). Another important issue is the time point of acetylcarnitine measurement in the daily routine and metabolic conditions of volunteers. In our previous study we have seen significant difference between morning measured acetylcarnitine concentrations in fasting state and metabolite concentrations after the lunch (Klepočová et al. 2017). Therefore, is difficult to compare results of acetylcarnitine concentration measurements from other studies when not recorded at the same daily time point and/or nutrition conditions. It was already shown that detection and quantification of acetylcarnitine is challenging and current data emphasize the need for strict standardization of measurement time, dietary conditions, and also physical activity for the measurement of the acetylcarnitine/carnitine. Further studies are necessary to better understand whole-body acetylcarnitine metabolism in humans.

Athletes involvement in endurance training should result in increased mitochondrial density and therefore faster oxidative metabolism as a result of training-specific adaptations to high volume load compared with sedentary subjects (McCully et al. 1989). It is also known that untrained people possess an approximately uniformly distributed muscle fibre spectrum (Staron et al. 2000) while endurance trained athletes show more slow-twitch fibres in muscles with high oxidative, low glycolytic capacity (Bogdanis 2012). PCr recovery kinetics can indicate differences in functional mitochondrial performance (Pesta et al. 2013) and individuals with faster PCr resynthesis exhibit greater fatigue resistance during high-intensity exercise (Adhihetty et al. 2003)(Bogdanis 2012). Our finding of 36% faster τ_{PCr} is in agreement with Pesta et al. (Pesta et al. 2013) who reported 40 % faster PCr recovery in endurance trained than in untrained individuals. Twice as fast PCr recovery in endurance trained runners compared to untrained subjects was also found in study of Johansen et. al. (Johansen and Quistorff 2003). Layec et. al. (Layec et al. 2010) show faster PCr recovery rate and higher $Q_{\text{max-ADP}}$ in endurance trained men, what is also in good agreement with results of current study where we found a 29 % higher Q_{max} in triathletes.

Another finding was significantly lower resting PCr concentration and lower PCr/Pi ratio in triathletes group even though Pi concentration at rest between two groups did not significantly differ.

Some studies suggested ^{31}P MRS as an alternative non-invasive method for the differentiation of the fibre-type composition in muscles (Meyer et al. 1985)(Boicelli et al. 1989)(Bernús et al. 1993). High

energy phosphate metabolite content has been associated with shifts in fibre type composition (Hoff et al. 2013). Endurance trained men which are predominant for slow-twitch-fibres with higher mitochondrial enzyme activities may have reduced values of PCr or PCr/Pi ratio (Pesta et al. 2013). And while some animal studies are showing good correlation between biopsy and ^{31}P MRS (Meyer et al. 1985)(Kushmerick et al. 1992), human studies showed either much smaller differences (Bernús et al. 1993), (Guthrie et al. 1996) or inconsistent results (Takahashi et al. 1996)(Vandenborne et al. 1995).

Noteworthy is the similar PCr depletion in both groups of volunteers in current study (see in Table 1. PCr drop (%)).

As another indicator for distribution of muscle fibres was shown to be the carnosine content as slow-twitch fibres should contain lower concentration of carnosine than fast-twitch fibres (Baguet et al. 2014). However, no statistical difference between the two groups of volunteers in carnosine content could be detected in current study. Moreover, no correlation between carnosine content and PCr concentration or PCr/Pi ratio at rest have been determined.

However, there was a correlation between carnosine concentration and pH at the end of exercise in current study. This can lead to a link between accumulations of hydrogen ions during exercise leading to a drop in intramuscular pH and carnosine physiological function as a pH indicator (Culbertson et al. 2010). Therefore, carnosine may be used for intracellular pH determination as also described (Pan et al. 1988)(Wray 1988)(Damon et al. 2003).

Untrained subjects showed a drop in pH during exercise indicating the glycolytic proton production larger than the proton consumption by the CK reaction.

Next to the already established and biochemically proven role of specific metabolites (acetyl-carnitine, carnosine, PCr, PCr metabolism) in the endurance training involved adaption of skeletal muscle metabolism and physiology, multi-parametric analysis highlighted, again, the link between skeletal muscle phosphodiesterases (PDE) and whole body metabolism (Szendroedi et al. 2011). Similar to the findings in sedentary healthy and T2DM and over-weight-to-obese sedentary (Valkovič et al. 2016) volunteers as well as patients with Duchenne muscular dystrophy (Hooijmans et al. 2017) the lower concentrations of PDE link to higher whole body- and/or skeletal muscle metabolic capacity. Even though the role of PDE in the skeletal muscle energy metabolism is not completely clear yet, the rather straight forward and uncomplicated way of muscle specific PDE measurement by ^{31}P MRS advocate further detailed and specific studies of this surrogate marker of training and metabolic status.

In conclusion, as a result of this non-invasive ^1H and ^{31}P MRS based study of skeletal muscle metabolic differences between endurance trained and normally active volunteers and multivariate analysis of skeletal muscle and whole body metabolic read-outs we cannot suggest single MRS based parameter for the exclusive biomarker of fitness and training status. It is rather a combination of different parameters, such as acetylcarnitine, PDE and PCr metabolism following the acute exercise challenge, which can be assessed during a single clinically acceptable multinuclear MRS session suggesting itself for further broad population cross sectional and/or focused interventional studies. In these further experiments, the special

focus should be on the specific role of training regiment, metabolic status, dietary supplementation and/or therapeutic intervention.

References

- Adams, S H et al. 2009. "Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid β -Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women 1 – 3." *the Journal of Nutrition* 139: 1073–81.
- Adhihetty, Peter J et al. 2003. "Plasticity of Skeletal Muscle Mitochondria in Response to Contractile Activity." *Experimental physiology* 88(1): 99–107.
- Amati, Francesca et al. 2011. "Skeletal Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance: Another Paradox in Endurance-Trained Athletes?" *Diabetes* 60(10): 2588–97.
- Anderwald, Christian et al. 2002. "Effects of Insulin Treatment in Type 2 Diabetic Patients on Intracellular Lipid Content in Liver and Skeletal Muscle." *Diabetes* 51(10): 3025–32.
- Baguet, Audrey et al. 2011. "A New Method for Non-Invasive Estimation of Human Muscle Fiber Type Composition." *PloS one* 6(7): e21956.
- Baguet, Audrey, Tine Bex, and Wim Derave. 2014. "A New Method for Non- Invasive Estimation of Human Muscle Fibre Type Composition in Athletics." 29(2): 7–16.
- Befroy, Douglas E et al. 2008. "Increased Substrate Oxidation and Mitochondrial Uncoupling in Skeletal Muscle of Endurance-Trained Individuals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(43): 16701–6.
- Bernús, G et al. 1993. "³¹P-MRS of Quadriceps Reveals Quantitative Differences between Sprinters and Long-Distance Runners." *Medicine and science in sports and exercise* 25(4): 479–84.
- Bogdanis, Gregory C. 2012. "Effects of Physical Activity and Inactivity on Muscle Fatigue." *Frontiers in physiology* 3: 142.
- Boicelli, C., A. Baldassarri, C. Borsetto, and F. Conconi. 1989. "An Approach to Noninvasive Fiber Type Determination by NMR." *International Journal of Sports Medicine* 10(1): 53–54.
- Borum, Peggy R. 1991. "CARNITINE." *Bol Asoc Med P R* 83(3): 134–35.
- Constantin-Teodosiu, D, S Howell, and P L Greenhaff. 1996. "Carnitine Metabolism in Human Muscle Fiber Types during Submaximal Dynamic Exercise." *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 80(3): 1061–64.
- Culbertson, Julie Y, Richard B Kreider, Mike Greenwood, and Matthew Cooke. 2010. "Effects of Beta-Alanine on Muscle Carnosine and Exercise Performance: A Review of the Current Literature." *Nutrients* 2(1): 75–98.
- Dambrova, M., and E. Liepinsh. 2015. "Risks and Benefits of Carnitine Supplementation in Diabetes." *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 123(2): 95–100.
- Damon, Bruce M., Alex C. Hsu, Heather J. Stark, and M. Joan Dawson. 2003. "The Carnosine C-2 Proton's Chemical Shift Reports Intracellular pH in Oxidative and Glycolytic Muscle Fibers." *Magnetic Resonance in Medicine* 49(2): 233–40.
- DeFronzo, R A et al. 1981. "The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization." *Diabetes* 30(12): 1000–1007.
- DeFronzo, Ralph A., and Devjit Tripathy. 2009. "Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes." *Diabetes care* 32 Suppl 2.
- Derave, Wim, Inge Everaert, Sam Beeckman, and Audrey Baguet. 2010. "Muscle Carnosine Metabolism and β -Alanine Supplementation in Relation to Exercise and Training." *Sports Medicine* 40(3): 247–63.
- Dubé, John J et al. 2008. "Exercise-Induced Alterations in Intramyocellular Lipids and Insulin Resistance: The Athlete's Paradox Revisited." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 294(5): E882-8.
- Fujimoto, Toshihiko et al. 2003. "Skeletal Muscle Glucose Uptake Response to Exercise in Trained and Untrained Men." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 35(5): 777–83.
- Goodpaster, B.H., J. He, S. Watkins, and D.E. Kelley. 2001. "Skeletal Muscle Lipid Content and Insulin Resistance: Vidence for a Paradox in Endurance-Trained Athletes." *J Clin Endocrinol Metab.* 86(12): 5755–5816.

- Guthrie, B M et al. 1996. "Endurance-Trained and Untrained Skeletal Muscle Bioenergetics Observed with Magnetic Resonance Spectroscopy." *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 21(4): 251–63.
- Hoff, Eike et al. 2013. "Noninvasive Monitoring of Training Induced Muscle Adaptation with 31P-MRS: Fibre Type Shifts Correlate with Metabolic Changes." *BioMed research international*
- Hooijmans, M.T. et al. 2017. "Elevated Phosphodiester and T2 Levels Can Be Measured in the Absence of Fat Infiltration in Duchenne Muscular Dystrophy Patients." *NMR in Biomedicine* 30(1).
- Hug, François et al. 2005. "Metabolic Recovery in Professional Road Cyclists: A 31P-MRS Study." *Medicine and science in sports and exercise* 37(5): 846–52.
- Hug, François et al. 2006. "Selective Training-Induced Thigh Muscles Hypertrophy in Professional Road Cyclists." *European Journal of Applied Physiology* 97(5): 591–97.
- Johansen, L., and B. Quistorff. 2003. "31P-MRS Characterization of Sprint and Endurance Trained Athletes." *International Journal of Sports Medicine* 24(3): 183–89.
- Just Kukurová, Ivica et al. 2016. "Improved Spectral Resolution and High Reliability of in Vivo 1 H MRS at 7 T Allow the Characterization of the Effect of Acute Exercise on Carnosine in Skeletal Muscle." *NMR in biomedicine* 29(1): 24–32.
- Kan, H. E. et al. 2010. "In Vivo 31P MRS Detection of an Alkaline Inorganic Phosphate Pool with Short T1 in Human Resting Skeletal Muscle." *NMR in Biomedicine* 23(8): 995–1000.
- Kautzky-Willer, Alexandra et al. 2003. "Increased Intramyocellular Lipid Concentration Identifies Impaired Glucose Metabolism in Women with Previous Gestational Diabetes." *Diabetes*
- Kemp, G J et al. 1993. "Quantitative-Analysis by P-31 Magnetic-Resonance Spectroscopy of Abnormal Mitochondrial Oxidation in Skeletal-Muscle during Recovery from Exercise." *NMR in Biomedicine* 6(5): 302–10.
- Klepočová, Radka et al. 2017. "Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal." *Investigative Radiology* 0(0): 1–7.
- Krssak, M et al. 1999. "Rapid Communication Intramyocellular Lipid Concentrations Are Correlated with Insulin Sensitivity in Humans : A 1 H NMR Spectroscopy Study."
- Kushmerick, M J, T S Moerland, and R W Wiseman. 1992. "Mammalian Skeletal Muscle Fibers Distinguished by Contents of Phosphocreatine, ATP, and Pi." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(16): 7521–25.
- Layec, Gwenael et al. 2010. "Comparative Determination of Energy Production Rates and Mitochondrial Function Using Different 31P MRS Quantitative Methods in Sedentary and Trained Subjects." *NMR in Biomedicine* 24(4): n/a-n/a.
- Lindeboom, Lucas et al. 2014. "Long-Echo Time MR Spectroscopy for Skeletal Muscle Acetylcarnitine Detection." *The Journal of clinical investigation* 124(11): 4915–25.
- van Loon, Luc J. C. et al. 2004. "Intramyocellular Lipid Content in Type 2 Diabetes Patients Compared with Overweight Sedentary Men and Highly Trained Endurance Athletes." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 287(3).
- Machann, Jürgen, Hans Häring, Fritz Shick, and Michael Stumvoll. 2004. "Intramyocellular Lipids and Insulin Resistance." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 6(4): 239–48.
- McCully, K. K. et al. 1989. "Wrist Flexor Muscles of Elite Rowers Measured with Magnetic Resonance Spectroscopy." *Journal of Applied Physiology* 67(3).
- Meyer, R. A., T. R. Brown, and M. J. Kushmerick. 1985. "Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance of Fast- and Slow-Twitch Muscle." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 248(3).
- Mingrone, Geltrude. 2004. "Carnitine in Type 2 Diabetes." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033(1): 99–107.
- Moon, Richard B., and John H. Richards. 1973. "Determination of Intracellular pH by 31P Magnetic Resonance." *J. Biol. Chem.* 248(20): 7276–78.
- Pan, J W, J R Hamm, D L Rothman, and R G Shulman. 1988. "Intracellular pH in Human Skeletal Muscle by 1H NMR." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(21): 7836–39.
- Pesta, D. et al. 2013. "Different Metabolic Responses during Incremental Exercise Assessed by Localized 31P MRS in Sprint and

- Endurance Athletes and Untrained Individuals.” *International Journal of Sports Medicine* 34(8): 669–75.
- Pette, D. 1998. “Training Effects on the Contractile Apparatus.” *Acta Physiologica Scandinavica* 162(3): 367–76.
- Popadic Gacesa, J., F. Schick, J. Machann, and N. Grujic. 2016. “Intramyocellular Lipids and Their Dynamics Assessed by 1H Magnetic Resonance Spectroscopy.” *Clinical Physiology and Functional Imaging* 36: 1–9.
- Ren, Jimin, A Dean Sherry, and Craig R Malloy. 2011. “1H MRS of Intramyocellular Lipids in Soleus Muscle at 7T: Spectral Simplification by Using Long Echo Times without Water Suppression.” *Magnetic Resonance in Medicine* 64(3): 662–71.
- Saltin, Bengt et al. 1977. “Fiber Types and Metabolic Potentials of Skeletal Muscles in Sedentary Man and Endurance Runners.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 301(1 The Marathon): 3–29.
- Seiler, Sarah E. et al. 2015. “Carnitine Acetyltransferase Mitigates Metabolic Inertia and Muscle Fatigue during Exercise.” *Cell Metabolism* 22(1): 65–76.
- Staron, Robert S. et al. 2000. “Fiber Type Composition of the Vastus Lateralis Muscle of Young Men and Women.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48(5): 623–29.
- Szendroedi, Julia et al. 2011. “Skeletal Muscle Phosphodiester Content Relates to Body Mass and Glycemic Control.” *PloS one* 6(7): e21846.
- Takahashi, Hideyuki et al. 1996. “Relationships between Fiber Composition and NMR Measurements in Human Skeletal Muscle.” *NMR in Biomedicine* 9(1): 8–12.
- Tarnopolsky, M. A. et al. 2006. “Influence of Endurance Exercise Training and Sex on Intramyocellular Lipid and Mitochondrial Ultrastructure, Substrate Use, and Mitochondrial Enzyme Activity.” *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292(3): 35–43.
- Taylor, D J et al. 1986. “Energetics of Human Muscle: Exercise-Induced ATP Depletion.” *Magnetic resonance in medicine* 3(1): 44–54.
- Thamer, Claus et al. 2003. “Intramyocellular Lipids: Anthropometric Determinants and Relationships with Maximal Aerobic Capacity and Insulin Sensitivity.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(4): 1785–91.
- Tušek Jelenc, Marjeta et al. 2016. “Feasibility and Repeatability of Localized ³¹P-MRS Four-Angle Saturation Transfer (FAST) of the Human Gastrocnemius Muscle Using a Surface Coil at 7 T.” *NMR in Biomedicine* 29(1): 57–65.
- Valkovič, Ladislav, Barbara Ukropcová, et al. 2013. “Interrelation of 31P-MRS Metabolism Measurements in Resting and Exercised Quadriceps Muscle of Overweight-to-Obese Sedentary Individuals.” *NMR in Biomedicine* 26(12): 1714–22.
- Valkovič, Ladislav, Marek Chmelík, et al. 2013. “Time-Resolved Phosphorous Magnetization Transfer of the Human Calf Muscle at 3 T and 7 T: A Feasibility Study.” *European Journal of Radiology* 82(5): 745–51.
- Valkovič, Ladislav et al. 2016. “Skeletal Muscle Alkaline Pi Pool Is Decreased in Overweight-to-Obese Sedentary Subjects and Relates to Mitochondrial Capacity and Phosphodiester Content.” *Scientific Reports, Nature* (December 2015): 1–9.
- Valkovič, Ladislav, Marek Chmelík, and Martin Krššák. 2017. “In-Vivo 31P-MRS of Skeletal Muscle and Liver: A Way for Non-Invasive Assessment of Their Metabolism.” *Analytical Biochemistry*.
- Vandenborne, K et al. 1995. “Energy-Rich Phosphates in Slow and Fast Human Skeletal Muscle.” *The American journal of physiology* 268(4 Pt 1): C869-76.
- Vanhamme, Leentje, Aad van den Boogaart, and Sabine Van Huffel. 1997. “Improved Method for Accurate and Efficient Quantification of MRS Data with Use of Prior Knowledge.” : 35–43.
- Wray, S. 1988. “Smooth Muscle Intracellular pH: Measurement, Regulation, and Function.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 254(2).

6. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend werden hier die Ergebnisse aller drei Studien diskutiert, da sich durch die Art der Untersuchungen eine auf sich aufbauende Struktur ergibt sind dementsprechend die Resultate der ersten Studien teilweise Grundlage der folgenden Untersuchungen bilden.

Die grundlegende Frage nach dem „Wie“ reguliert eine Muskelzelle die Menge eines jeweiligen Substrates zur Energiegewinnung, und „Wodurch“ wird die Bevorzugung eines speziellen Substrats, wie Kohlenhydrate oder Fettsäuren zur oxidieren ausgelöst. In der Wissenschaft wird diese Frage oft mit der metabolischen Flexibilität erklärt und es sind zahlreiche Untersuchungen diesbezüglich vorhanden (Muoio D. , 2014; Galgani, Moro, & Ravussin, 2008; van de Weijer, et al., 2013). Die Fähigkeit einer Muskelzelle je nach Belastung und Ernährungszustand von einer vornehmlichen Fettsäureoxidation auf den Kohlenhydratstoffwechsel umzusteigen, und inwieweit ein Fließgleichgewicht zwischen diesen beiden Energiereserven besteht war unsere basale Grundlage um Untersuchungen zwischen Normalgewichtigen, Übergewichtigen und ausdauertrainierten Menschen durchzuführen.

Als klassische Faktoren für die Fähigkeit Glucose aufzunehmen und zu oxidieren ist die Tatsache, dass je weniger Muskelglykogen vorhanden ist desto mehr Glucose „aufgenommen bzw. angefordert“ wird (Lai, Zarrinpashneh, & Jensen, 2010). Dahingehend ist der Kohlenhydratstoffwechsel auch einer der Hauptfaktoren für die Insulinsensitivität und ausschlaggebend für die insulinunabhängige Glucoseaufnahme (O'Neill, 2013). Bei der Oxydation der Fette jedoch spielen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle, so müssen neben der Anzahl der Mitochondrien (Civitarese, et al., 2007). Auch die Ausstattung der Mitochondrien mit Enzymen mit der Fähigkeit zur aeroben Verstoffwechselung (Schmidt, Athenstaedt, Koch, Ploier, & Daum, 2013), und die Menge der Transportenzyme zu den Mitochondrien hin (van de Weijer, et al., 2013) berücksichtigt werden.

Wie bereits eingangs erwähnt, stellt die Möglichkeit der nicht invasiven MR Spektroskopie und die Quantifizierung des Acetylcarnetin eine beeindruckende neue Möglichkeit dar.

Während die ³¹P-MRS Methode erstmals von (Taylor, 2000) beschrieben zur Bestimmung der relativen Konzentrationen der Phosphate des Energiestoffwechsels, bereits etabliert ist wurde durch den Einsatz des MR tauglichen Ergometers der FA Ergospect (Innsbruck, Österreich) auch die Möglichkeit der Untersuchung während Belastung möglich (Meyerspeer, Krssák, & Moser, 2003; Schocke, et al., 2004).

In der ersten Untersuchung wurde festgestellt, dass die Kombination von erhöhtem BMI und sesshaftem Lebensstil zu signifikanten Unterschieden im alkalischen Pi-Pool in der Skelettmuskulatur sowie in der Konzentration von PDE, dem Pi-zu-ATP-Stoffwechselfluss und der mitochondrialen Kapazität führt. Darüber hinaus wurden signifikante Korrelationen zwischen der Konzentration von PDE, dem alkalischen Pi₂ / Pi-Verhältnis und zur ruhenden Pi-zu-ATP-flussrate gemessen

Der Zusammenhang der zwischen der Q_{max} und dem BMI in dieser Studie gefunden wurde, kann durch die verminderte körperliche Aktivität bei übergewichtigen Personen erklärt werden. Eine durchgeführte

Regressionsanalyse zeigt eine primäre Verbindung von Qmax mit anderen Parametern des Muskelstoffwechsels und nicht mit dem BMI, und steht damit in Übereinstimmung mit einer anderen in-vitro-Studie welche ebenfalls keine Unterschiede in der mitochondrialen Kapazität bzw. Atmungsfähigkeit und dem BMI zwischen schlanken und fettleibigen Probanden mit ähnlichem Trainingsstatus festgestellt hat (Fisher-Wellman K. H., 2014). Anders verhält es sich jedoch bei Menschen die eine Gewichtsreduktion ausschließlich durch ein Diät erreicht hatten. Dabei sank der BMI, wogegen die mitochondriale Kapazität keine Veränderung erfahren hat. Dies steht im Gegensatz zu Personen, bei denen die Kombination aus Diät und Bewegung einen Anstieg der mitochondrialen Kapazität bewirkte. (Toledo, et al., 2008)

Bei vorliegender Ob/Sed Gruppe wurden im Vergleich zur L/Ac-Gruppe signifikant höhere myozelluläre PDE-Werte gefunden. Dies wurde mit der positiven Korrelation zwischen [PDE] und BMI weiter unterstützt. (vgl. (Szendroedi, Schmid, Chmelik, Krssak, & Nowotny, 2011)). Es gibt eine Korrelation der [PDE] und dem Alter wie (Satrustegui, Berkowitz, Boden, Donlon, & McLaughlin, 1988) berichten. Allerdings zeigte die in vorliegender Untersuchung durchgeführte Regressionsanalyse, dass anstatt des Alters, die körperliche Aktivität und der BMI, in erster Linie die PDE-Werte beeinflussen können. Wir vermuten, dass dies auf die erhöhte spektrale Auflösung des 7 T MR - Systems, welches in vorliegender Studie verwendet wurde zurückzuführen ist.

Auch zeigt vorliegende Untersuchung, dass die gemessenen [PDE] hauptsächlich auf [GPC] zurückzuführen sind, und GPE (Glycerophosphoethanolamin) nur einen geringen Einfluss hat.

Tatsache ist, dass die [GPC] die für die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen verantwortlich sind aufgrund der Trennung in den PDE-Signalen in den vorherigen Studie, welche mittels 3 T durchgeführt wurde, nicht sichtbar waren (Szendroedi, Schmid, Chmelik, Krssak, & Nowotny, 2011). Somit war das Verhältnis von alkalischem Pi2 zu cytosolischem Pi (Pi_2 / Pi) in der Ob / Sed-Gruppe im Vergleich zur L / Ac-Gruppe niedriger. Eine Untersuchung von (van Oorschot, et al., 2013) berichtete über eine Abhängigkeit von Pi_2 / Pi , gemessen im M. vastus lateralis im Vergleich von Läufer mit normal aktiven Personen. Auch unsere Ergebnisse deuten auf eine solche Abhängigkeit des Pi_2 / Pi -Verhältnisses im Skelettmuskel hin, wobei in vorliegender Studie zusätzlich eine lineare Korrelation zwischen dem BMI und Pi_2 / Pi gefunden wurde.

Dennoch haben die Ergebnisse unserer Regressionsanalyse nur [GPC] und Qmax als primäre Prädiktoren des Pi_2 / Pi gezeigt. Die zwischen den Gruppen gefundenen Unterschiede in Pi_2 / Pi lassen sich direkt den Veränderungen in [Pi2] zuordnen, die im Vergleich zur Ob / Sed-Gruppe ebenfalls deutlich höher in der L / Ac-Gruppe waren. Obwohl die mittleren FATP-Werte unserer Ob / Sed-Gruppe ($\text{FATP} = 0,25 \pm 0,06 \text{ mM.s}^{-1}$) noch über den verminderten Werten liegen, die zuvor bei Patienten mit Typ-2-Diabetes ($\text{FATP} = 0,21 \pm 0,05 \text{ mM.s}^{-1}$) 25 gemessen wurden, zeigt die körperliche Inaktivität zusammen mit dem Übergewicht unserer Untersuchungsgruppe eine signifikante Reduktion des myozellulären Pi-to-ATP-Stoffwechsels im Vergleich zu L / Ac-Gruppe.

Es wird vermutet, dass die alkalische Pi2-Resonanz die mitochondriale Dichte im Muskelgewebe darstellt, und wesentlich von regelmäßigen körperlichen Aktivität bedingt wird (van Oorschot, et al., 2013).

Diese Beziehung zum Trainingsstatus konnten auch wir in der hier vorliegenden Studie bestätigen, da die [Pi2] sowie Pi2 / Pi positiv mit dem maximalen oxidativen Fluss (Q_{max}) korrelierten (erhoben während der dynamischen Belastung via Ergometer). Auch besteht eine Korrelation mit dem kATP und FATP. Auch die lineare Korrelationen zwischen Q_{max} und den metabolischen Parametern, gemessen durch ST-Experimente in Ruhe (d.h. KATP und FATP) aus den früheren Studie mit Übergewichtigen (Valkovič, et al., 2013) konnten wir bestätigen. Darüber hinaus identifiziert eine multivariate Regressionsanalyse [Pi2] und FATP als unabhängige Prädiktoren von Q_{max} , was auf die Verwendung von hochspektral aufgelösten statischen 31P-MRS bei 7 T zurückzuführen ist. Darüber hinaus wurden die Hauptindikatoren der Gesamtsumme der [PDE] analysiert und alle [PDE] -Korrelationen waren auch für [GPC] signifikant. Unsere Ergebnisse deuten auf das Potenzial der Verwendung von [PDE] oder, wenn unterscheidbar (d.h. bei 7 T) direkt, die [GPC], als asurrogate Biomarker des Skelettmuskel Energiemetabolismus hin. Obwohl derzeit nicht ganz klar ist, was GPC mit dem Muskel-Energiemetabolismus verbindet, unterstützen frühere Studien dieses Ergebnis (Wokke, et al., 2014; Sleight, et al., 2012; McCully, Mulcahy, Ryan, & Zhao, 2011)

Die Ergebnisse dieser hier beschriebenen ersten Studie unterstützen daher bisherige Berichte über Korrelationen zwischen den metabolischen Bedingungen in Ruhe und während dynamischer Belastung gegen einen Widerstand durch ein Ergometer, und liefern zusätzliche Informationen durch die Analyse von Pi2 / Pi und GPC

Was die technischen Einschränkungen unserer Studie anbelangt, so ist zu beachten, dass, trotz sorgfältigster Positionierung der Probanden im MR-System ggf. einige kleine Misslokalisierungen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten. Bezüglich der Positionierung der Oberflächenspule am M. quadrizeps wurde die individuellen Anatomie zwar berücksichtigt, es kann jedoch insbesondere bei großen Oberschenkelumfängen zu minimalen Ungenauigkeiten kommen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden jedoch erweiterte Einzelvoxel-Lokalisierungen verwendet (Tušková, et al., 2016). Als Schlussfolgerung zur ersten Untersuchung kann zusammenfassend gesagt werden. Dass die Gruppe der Übergewichtigen und vielsitzende Personen im Pre-Diabetiker Status eine erhöhte Konzentration von Glycerophosphocholin, eine geringere Menge an alkalischem Pi, einen langsameren Pi-zu-ATP-Wechselrate verbunden mit einer verminderten mitochondrialen Kapazität im Vergleich zu schlanken aktiven Individuen zeigen. Die Parameter des myozellulären Metabolismus welche in Ruhe und während der Belastung via Ergometer gemessen wurden, deuten darauf hin, dass hoch spektral aufgelöste statische 31P-MRS- und Konzentrationssättigungs Messungen im Ruhezustand als Marker des muskelmitochondrialen Metabolismus dienen.

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen interessierte uns demnach neben dem Kohlenhydratstoffwechsel aufgrund der Untersuchungsergebnisse auch der Mechanismus des Fettstoffwechsels. Da es in Untersuchungen via 7T möglich wurde auch das Acetylcarnitin frei zu isolieren (Lindeboom L., et al., 2014; Tušková, et al., 2016), wurden in Folge detailliertere Untersuchungen durchgeführt.

Die von uns analysierten Konzentrationen des Acetylcarnitin wurden in zwei Skelettmuskelgruppen, dem M. vastus lateralis (VL) und dem M. soleus (SOL) untersucht. Die Tatsache, dass im VL wesentlich höhere Konzentrationen von Acetylcarnitin als im SOL-Muskel vorliegen besteht in der Zusammensetzung der Muskelfasern in den jeweiligen Muskeln. Durch Biopsien wurde von (Gollnick, Sjödin, & Karlsson, 1974)

nachgewiesen, dass es einen annähernd gleichen Anteil an langsam zuckenden Fasern und schnell zuckenden Fasern im VL gibt, wohingegen der SOL-Muskel überwiegend aus langsam zuckenden Fasern besteht. Darüber hinaus war die Aktivität der glykolytischen Enzyme niedriger in langsam wachsenden Fasern (Gollnick, Sjödin, & Karlsson, 1974). Basierend auf den höheren Konzentrationen und dem erweiterten dynamischen Bereich erschien uns der M. vastus lateralis als besser geeignet für unsere Querschnittsuntersuchungen. Die Annahme, dass die Acetylcarnitinkonzentrationen bei ausdauertrainierten Athleten höher sind, da diese vermutlich über eine verbesserte Fettoxidation verfügen, stützt sich auf die Untersuchungen von Horowitz und Klein, welche den Fettstoffwechsel bei Ausdauertraining untersucht hatten (Horowitz & Klein, 2000). Da Ausdauertraining auch die Fettoxidation verstärkt und unter anderen die Prozesse der Pyruvat-Dehydrierungsaktivität aktiviert, was wiederum zu einer erhöhten Mitochondrienanzahl führt, entsteht auch eine vermehrte Bereitstellung von Acetyl-Coenzym A wodurch der Acetylcarnitinspiegel erhöht wird (Roepstorff, et al., 2005). Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede bei ausdauertrainierten Athleten in der Carnitin-Acetyl-Coenzyme-A-Transferase-Aktivität bei der Umwandlung von Acetyl-Coenzym A in membranpermeables Acetylcarnitin nachgewiesen (Lindeboom, et al., 2014).

In unserer ersten Studie zur genauen Bestimmung des Acetylcarnitin vgl. (Tušková, et al., 2016) wurden zwei Gruppen von Freiwilligen untersucht. Eine Gruppe bestand aus gesunden Personen ohne regelmäßig durchgeführte körperliche Aktivität. Die Probanden der zweiten Gruppen waren nach eigenen Angaben an mindestens drei Tagen der Woche körperlich aktiv, so dass man von regelmäßiger körperlicher Aktivität sprechen kann. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Gruppe der regelmäßig körperlich aktiven Personen signifikant höhere Acetylcarnitinkonzentrationen im VL vorlagen im SOL-Muskel kann diesbezüglich jedoch nur von einem Trend gesprochen werden. Dies steht in Einklang mit einer früheren Studie von Lindeboom und Mitarbeitern welche die Acetylcarnitinkonzentration mit dem Trainingsstatus, einer erhöhten Insulinsensitivität und einer höheren in vivo-mitochondrialen Funktion assoziierten (Lindeboom, et al., 2014). Interessant war, dass die Ergebnisse der wiederholten Skelettmuskel-Acetylcarnitin-Messungen während des Tages differierten. Wir führten ¹H MRS-Messungen in den frühen Morgenstunden (nüchtern über Nacht), nach dem Frühstück, nach dem Mittagessen und später, am Nachmittag durch. Die Skelettmuskel Acetylcarnitin-Konzentrationen am Morgen waren höher als am Nachmittag und nach dem Mittagessen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass 10-minütige Bewegung mit hoher Intensität den Skelettmuskel-Carnitin-Pool verändern und dadurch die Bildung von Acetylcarnitin erhöhen können (Brass, 2000), was zu seiner anschließenden Akkumulation des Acetylcarnitin führt (Stephens, Constantin-Teodosiu, & Greenhaff, 2007). Für unsere Untersuchung wählten wir deshalb eine hochintensive Belastung für den VL-Muskel (durch 10 min. kontinuierliche tiefes Kniebeugen) aus, um den Effekt einer physischen Belastung auf die Konzentration des Acetylcarnitinspiegels im Skelettmuskel zu bestimmen. Eine Erhöhung des Acetylcarnitinspiegels wurde dabei bei jedem der fünf Testteilnehmer nachgewiesen. Eine wiederholte Messung welche ungefähr 15 Minuten nach der Beendigung der Belastung durchgeführt wurde, zeigte einen ebenso schnellen Abfall der Acetylcarnitinkonzentration in der Nachbelastungsphase. Diese Acetylcarnitin-Depletion, oder Auswaschung stimmt mit den Ergebnissen von Seiler et al. überein, welche zu denselben Resultaten bei ausdauertrainierten Probanden kamen (Seiler, et al., 2015).

Trotzdem können wir aus unseren Ergebnissen keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen über exakte tägliche Veränderungen und die Wirkungsauswirkungen auf die Skelett-Acetylcarnitinkonzentration ziehen, da unsere Studie nur eine begrenzte Anzahl von Probanden umfasste und hauptsächlich auf die methodischen Aspekte der Acetylcarnitin-Detektion und -Quantifizierung in zwei verschiedenen Bereichen ausgerichtet war. Demnach sind weitere Untersuchungen über den Einfluss der Nahrungsaufnahme, der Diätzusammensetzung, des Geschlechts, des Alters und verschiedener pathophysiologischer Zustände mit einer größeren Anzahl von Probanden notwendig.

Aufgrund der Tatsache, dass bei körperlicher Aktivität eine Anpassung des Muskelstoffwechsels sich grundsätzlich im Kohlenhydrat- wie auch im Fettstoffwechsel bemerkbar macht, haben wir in der letzten Studie die Probandengruppen in ausdauertrainierte Triathleten und Personen mit regelmäßiger körperlicher Aktivität aufgeteilt, um eventuelle Veränderungen bei exzessiven und Hochausdauerbelastungen in Korrelation zu setzen. Eine weitere Untersuchung von untrainierten Personen hätte in diesem Setting ausschließlich zur Bestätigung weitreichender anderer Untersuchungen geführt, welche einen positiven Beleg für regelmäßige körperliche Aktivität bereits bestätigt haben (Amati, Dube, Shay, & Goodpaster, 2008; Pedersen, Nielsen, Lamb, & Stephenson, 2004). Auch kurzzeitige Belastungen wie in unserem Studienprotokoll bezüglich der Ergometerbelastung von 6 min bei Personen ohne regelmäßige körperliche Aktivität und bei prä-Diabetes Typ2 Personen wohl keine Veränderungen in der ATP Synthese aufgezeigt hätten (Kacarovsky-Bielez, et al., 2009). Verschiedenste Untersuchungen der letzten Jahre stellten jedoch fest, dass durch regelmäßiges Ausdauertraining die Fähigkeit Fett als Triglyceride zu speichern verbessert wurde und gleichzeitig eine Verbesserung der Glucoseaufnahmefähigkeit und Insulinsensitivität erfolgte (Meex, et al., 2010).

In unserer Studie zeigte sich daher, dass in der Triathlet-Gruppe neben der 42% höheren VO_{2max} , ein um 50% höherer IMCL-Gehalt im vastus lateralis-Muskel. Auch eine um 12% niedrigere PCr-Konzentration und ein um 16% niedrigeres $[PCr] / [Pi]$ -Verhältnis in Ruhe, gemeinsam mit einem um 2% höherer pH-Wert in der Gruppe der ausdauertrainierten Triathleten am Ende der Belastung zeigen die Unterschiede. Auch besaßen die Triathleten eine um 35% schnellere PCr-Resyntheserate (τPCr) sowie eine um 29% höhere Mitochondrienkapazität (Q_{max}) als die Gruppe der regelmäßig Aktiven. Auch konnten signifikant höhere Niveaus von IMCL im M. vastus lateralis in der Gruppe der Triathleten gefunden werden. Normalerweise wird ein erhöhter Lipidgehalt in der Skelettmuskulatur mit der Insulinresistenz bei menschlicher Adipositas und T2DM assoziiert. Dies steht jedoch in Übereinstimmung mit Untersuchungen von ausdauertrainierte Athleten, wobei nachgewiesen wurde, dass diese einen IMCL-Gehalt ähnlich dem, von Patienten mit T2DM-Patienten ist (Dubé, et al., 2008). Dies wurde bereits als Paradoxon des Athleten beschrieben, dass trotz einer höheren Menge an IMCL im Skelettmuskeln keine Beeinträchtigung der Insulinsensitivität beobachtet wurde (van Loon, et al., 2004; Tarnopolsky, et al., 2007). Das höhere Niveaus der IMCL in der Gruppe der Triathleten könnte daher als Folge für den erhöhten Bedarf an Muskelfettsäuren, die für die Oxidation während langanhaltender Belastung gesehen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von (Gacesa, Schick, Machann, & Grujic, 2016) die besagen das die Insulinsensitivität

durch die oxidative Kapazität des Skelettmuskels beeinflusst werden kann. Diese Beobachtung stimmt mit unserer signifikanten Wechselwirkung zwischen IMCL-Gehalt und $VO_2\text{max}$ überein und wurde bereits von (Machann, Häring, Schick, & Stummvoll, 2004; Thamer, et al., 2003; Machann, et al., 2011) beschrieben.

Im Zusammenhang mit einer höheren Menge an IMCL im Skelettmuskel in der Gruppe der Triathleten und der Vorstellung einer verbesserten Fettsäureoxidation durch Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetylcarnitin waren die Unterschiede im Acetylcarnitinspiegel der beiden Gruppen von besonderen Interesse. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Da bislang nur wenige Studien diese Unterschiede in den Konzentrationen von Acetylcarnitin / Carnitin untersuchen können hierzu auch keine Literaturvergleiche angestellt werden. Gesichert ist jedoch der Unterschied in der Konzentration von Acetylcarnitin in Bezug auf Patienten mit der Diagnose von T2DM (Adams, et al., 2009; Dambrova & Liepinsh, 2015; Dambrova und Liepinsh 2015; Mingrone, 2004). Allerdings wurde eine etwas größere Acetyl-Carnitin-Konzentration in langsam zuckenden Fasern beobachtet, möglicherweise wegen des größeren Potentials für die Fettoxidation bei diesem Muskelfasertyp vgl. (Constantin-Teodosiu, Howell, & Greenhaff, 1996) welche eine höhere Konzentration von Acetylcarnitine in der Gruppe der Triathleten nahelegen würden. Da wir jedoch in allen bisherigen Studien in der jeweils regelmäßig aktiven Probandengruppen signifikant höhere Acetylcarnitine-Konzentration im M. vastus lateralis-Muskel messen konnten, wobei die Konzentrationen im M. soleus sich eher gleich verhalten hatten (Klepočová, et al., 2017), nehmen wir an, dass eine Erhöhung des Acetylcarnitinspiegel sich demnach nicht proportional zur Leistungsfähigkeit ($VO_2\text{max}$) verhält. Auch (Lindeboom, et al., 2014) und (Seiler, et al., 2015) fanden in ihren Untersuchungen nur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der inaktiven und regelmäßig aktiven Probanden. Da die vorliegende Untersuchung bislang die einzige welche mit hochausdauertrainierten Testpersonen durchgeführt wurde, kann derzeit nur vermutet werden, dass sich der Acetylcarnitinspiegel durch vermehrtes Training nicht beeinflussen lässt, die positive Wirkung auf die Gesundheit jedoch schon bei regelmäßiger Aktivität signifikant erhöht ist. Selbstverständlich sind dahingehend weitere Untersuchungen notwendig, um den Ganzkörper-Acetylcarnitinfluss beim Menschen besser zu verstehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungsmethoden via 7T MR (^{31}P -MRS & ^1H MRS) hervorragende Instrument zur nicht invasiven Bestimmung des Muskelstoffwechsels sind. Gerade im Forschungsfeld bezüglich der eingangs beschriebenen Entstehungen modernen Zivilisationskrankheiten mit ihren komplexen Wirkmechanismen bieten diese Verfahren eine adäquate Möglichkeit der Untersuchung. Insbesondere bei Untersuchungen der Anpassungsmechanismen von körperlicher Aktivität und deren gesundheitsfördernden Wirkung ermöglichen diese Methoden neue Forschungsfelder, um komplexere Zusammenhänge besser zu verstehen.

7. Literaturverzeichnis

- Achten, J., & Jeukendrup, A. (24 2003). Maximal fat oxidation during exercise in trained men. *Int J Sports Med*, S. 603 - 608 .
- Adams, S. H., Hoppel, C. L., Lok, K. H., Zhao, L., Wong, S. W., Minkler, P. E., . . . Garvey, W. T. (Jun 139(6) 2009). Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *Journal Nutrition*, S. 1073-81. doi:10.3945/jn.108.103754.
- Allen, D., Lamb, G., & Weserblad, H. (88 2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*, S. 287-322.
- Amati, F., Dube, J. J., Shay, C., & Goodpaster, B. H. (105(3) 2008). Separate and combined effects of exercise training and weight loss on exercise efficiency and substrate oxidation. *J Appl Physiol*, S. 825-31.
- Anderson, E., Lustig, M., Boyle, K., Woodlief, T., Kane, D., Lin, C., . . . Neuffer, P. (119(3) 2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*, S. 573-81.
- Baguet, A., Everaert, I., Achten, E., Thomis, M., & Derave, W. (43(1) 2012). The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. *Amino Acids*, S. 13-20.
- Bahr, R., Hostmark, A., & Newsholme, E. (143(1 1991). Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines. *Acta Physiol. Scand.* 1991;143(1):105-115., S. 105-115.
- Bahr, R., Høstmark, A., Newsholme, E., Grønnerød, O., & Sejersted, O. (143 1991). Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines. *Acta Physiol Scand*, S. 105-115.
- Bate-Smith, E. (1983). The buffering of muscle in rigour: protein, phosphate and carnosine. *J Physiol*, S. 336-343.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Biochemie*. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Bieber, L. (57 1988). Carnitine. *Annu. Rev. Biochem*, S. 261-283.
- Blancquaert, L., Everaert, I., Missinne, M., Baquet, A., Stegen, S., Volckaert, A., . . . Henauw, S. (49(3). Mar 2017). Effects of Histidine and β -alanine Supplementation on Human Muscle Carnosine Storage. *Med. Sci Sports Exerc*. doi:10.1249/MSS.0000000000001213.
- Bogner, W., Chmelik, M., Andronesi, O., Sorensen, A., Trattig, S., & Gruber, S. (2011). In Vivo 31P Spectroscopy by Fully Adiabatic Extended Image Selected In Vivo Spectroscopy: A Comparison Between 3 T and 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine*.
- Bogner, W., Chmelík, M., Schmid, A., Moser, E., Trattig, S., & Gruber, S. (2009). Assessment of 31P relaxation times in the human calf muscle: A comparison between 3 T and 7 T in vivo†. *Magn Reson Med*.
- Boldyrev, A. (77 2012). Carnosine new concept for the function of an old molecule. Biochemistry. *Biochemistry*, S. 313 - 326.
- Boldyrev, A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 2013; 93(4): 1803–1845. *Physiol. Rev.* 2013; 93(4): 1803–1845.
- Brass, E. P. (72 2000). Supplemental carnitine and exercise. *Am J Clin Nutr*, S. 618-623.
- Bremer, J. (1983). Carnitine Metabolism and Functions. *Physiology Reviews*, 63, 1420-1480. *Physiology Reviews* 63, S. 1420 - 1480.
- Civitarese, A. E., Carling, S., Heilbronn, L. K., Hulver, M. H., Ukropcova, B., Deutsch, W., . . . Ravussin, E. (Vol 4 2007). Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans. *Plos Medicine* , S. 485-493. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040076>
- Constantin-Teodosiu, D., Howell, S., & Greenhaff, P. (8(3) 1996). Carnitine Metabolism in Human Muscle Fiber Types during Submaximal Dynamic Exercise. *Journal of applied physiology* , S. 106-64. Von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89647> abgerufen
- Cordente, A., López-Viñas, E., Vázquez, M., Swiegers, J., Pretorius, I., Gómez-Puertas, P., . . . Serra, D. J. (279 2004). Redesign of carnitine acetyltransferase specificity by protein engineering. *Biol. Chem*, S. 3899–33908.
- Dambrova, M., & Liepinsh, E. (E123(2) 2015). Risks and Benefits of Carnitine Supplementation in Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* , S. 95-100.
- De Palo, E., Gatti, R., Crivellaro, C., & et.al. (1987). Plasma carnitine and acetyl-carnitine levels at different times of the day. *Clin. Physiol. Biochem* 1987;5(2):95-102, S. 95 - 102.
- DeFronzo, R., Bonadona, R., & Ferrannini, E. (15 1992). Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. . *Diabetes Care*, S. 318-368.
- Dellomonaco, C., Clomburg, J. M., Miller, E. N., & Gonzalez, R. (Aug 2011). Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*, S. 355-9. doi:10.1038/nature10333.
- Demsey, J. A., Amann, M., Harms, C. A., & Wetter, T. J. (6 2012). Respiratory System Limitations to Performance in the Healthy Athlete: Some Answers, More Questions! *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, S. 146–147.
- Derave, W., Everaert, I., Beekman, S., & Baguet. (40(3) 2010). Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Med.*, S. 247 - 263.

- Derave, W., Oezdemir, M., Harris, R., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., . . . Achten, E. (103(5) 2007). Beta-alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J. Appl. Physiol.*, S. 1736–1743.
- Deutsch, A., & Eggleton, P. (32 1938). The titration constants of anserine, carnosine and some related compounds. *Biochem Journal*, S. 209–211.
- Dubé, J. J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F. G., Sauers, S. E., & Goodpaster, B. H. (May 24(%) 2008). Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, S. E882–8. doi:10.1152/ajpendo.00769.2007
- Everaert, I., Mooyaart, A., Baguet, A., Zutinic, A., Baelde, H., Achten, E., . . . Derave, W. (20(4) 2011). Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*, S. 1221–1229.
- Fisher-Wellman, K. H. (63 2014). Mitochondrial respiratory capacity and content are normal in young insulin-resistant obese humans. *Diabetes*, S. 132–141.
- Fisher-Wellman, K., Gilliam, L., Lin, C., Cathey, B., Lark, D., & Neuffer, P. (65 2013). Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. *Free Radic Biol Med*, S. 120–8.
- Gacesa, P. J., Schick, F., Machann, J., & Grujic, N. (Feb 2016). Intramyocellular lipids and their dynamics assessed by 1H magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Physiology and Funktional Imaging*. doi:10.1111/cpf.12346
- Galgani, J. E., Moro, C., & Ravussin, E. (Nov. 2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, S. 1009–17. doi:10.1152/ajpendo.90558.2008. Epub 2008 Sep 2.
- Godall, M. (178 1956). Carnosine phosphates as phosphate donor in muscular contraction. *Nature*, S. 539–540.
- Gollnick, P. D., Sjödin, B., & Karlsson, J. (348 1974). Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch.*, S. 247–255.
- Groop, L., Bonadonna, R., & Del Prato, S. (1990). Effect of prolonged overnight fasting on energy metabolism in non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects. *Acta Endocrinol*, S. 123(1):30–6.
- Groop, L., Bonadonna, R., DelPrato, S., Ratheiser, K., & DeFronzo, R. (123 1990). Effect of prolonged overnight fasting on energy metabolism in non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects. *Acta Endocrinol*, S. 30–36.
- Gulewitch, W. (1911). Zur Kenntnis der Extraktstoffe der Muskeln. Über die Konstitution des Carnosine. . (H.-S. Z. 73, Hrsg.) *Ztschr Physiol Chem*, S. S434–S443, 1911.
- Hargreaves, M. (2012). The metabolic systems: carbohydrate metabolism. In P. Farrell, M. Joyner, & V. Caiozzo, *Advanced exercise physiology*. 3–391: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Hettinger, T., & Hollmann, W. (2000). *Sportmedizin, Grundlagen für Arbeit, Training und Präventivmedizin*. 4. Auflage. Stuttgart.
- Hill, C., Harris, R., Kim, H., Harris, B., Sale, C., Boobis, L., . . . Wise, J. (32(2) 2007). Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*, S. 225–233.
- Hohmann, A., Lames, M., & Letzelter, M. (2007). *Einführung in die Trainingswissenschaft*. Wiebelsheim: Limpert.
- Hood, D. A. (90 2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. . *J Appl Physiol* (1985), S. 1137–1157.
- Horowitz, J. F., & Klein, S. (Aug 72 2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *American Journal of clinical Nutrition*, S. 558–63.
- Hultman, E., & Sahlin, K. (8 1980). Acid-base balance during exercise. *Exercise Sports Sci Rev*, S. 41–128.
- Jaspers, R., Zillikens, M., Friesema, E., delli Paoli, G., Bloch, W., Uitterlinden, A., . . . de Lange, P. (Jan 31(1) 2017). Exercise, fasting, and mimetics: toward beneficial combinations? *FASEB J*, S. 14–28. doi:doi: 10.1096/fj.201600652R. Review. PubMed PMID: 27729415.
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (47 2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. . *Essays in Biochemistry*. doi:10.1042/bse0470069
- Just-Kukurová, I. (2016). Improved Spectral Resolution and High Reliability of in Vivo 1 H MRS at 7 T Allow the Characterization of the Effect of Acute Exercise on Carnosine in Skeletal Muscle. *NMR in biomedicine* 29(1), S. 24–32.
- Kacerovsky-Bielez, G., Chmelik, M., Ling, C., Pokan, R., Szendroedi, K., Farukuoye, M., . . . Roden, M. (Jun 58 (6) 2009). Short-term exercise training does not stimulate skeletal muscle ATP synthesis in relatives of humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, S. 1333–41. doi:10.2337/db08-1240. Epub 2009 Mar 5.
- Kelley, D. E., & Mandarino, L. J. (49(5) 2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, S. 677–683.
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., & Ritov, V. B. (51 2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. . *Diabetes*, S. 2944–2950.
- Kemp, G. J. (1993). Quantitative-Analysis by P-31 Magnetic-Resonance Spectroscopy of Abnormal Mitochondrial Oxidation in Skeletal-Muscle during Recovery from Exercise. *NMR in Biomedicine* 6(5), S. 302 - 10 .

- Kemp, G. J., & Radda, G. K. (10 1994). 7. Kemp, G. J. & Radda, G. K. Quantitative interpretation of bioenergetic data from ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q*, S. 43-63.
- Kemp, G., Meyerspeer, M., & Moser, E. (2007). Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed*. 2007 Oct; 20(6):555-65.
- Kendrick, I., Kim, H., Harris, R., Kim, C., Dang, V., Lam, T., . . . Wise, J. (106 (1) 2009). The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *Eur. J. Appl. Physiol.*, S. 131-138.
- Klepočová, R. P., Valkovic, L. P., Gajdošík, M. P., Hochwartner, T. M., Tschan, H. P., Krebs, M. M., . . . Krák, M. P. (2017). Detection and Alterations of Acetylcarnitine in Human Skeletal Muscles by ¹H MRS at 7 T. *Investigative Radiology*.
- Krebs, M., & Roden, M. (11(7) 2004). Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *skeletal muscle*, S. 901-8.
- Lai, Y. C., Zarrinpashneh, E., & Jensen, J. (108 2010). Additive effect of contraction and insulin on glucose uptake and glycogen synthase in muscle with different glycogen contents. *J Appl Physiol*, S. 1106-15.
- Lindeboom, L., Nabuurs, C. I., Hoeks, J., Brouwers, B., Phielix, E., Kooi, M. E., & Schrauwen-Hinderling, V. B. (4915-4925. 124(11) 2014). Long-echo time MR spectroscopy for skeletal muscle acetylcarnitine detection. . *The Journal of Clinical Investigation*.
- Lindeboom, L., Nabuurs, C., Hoeks, J., Brouwers, B., Phielix, E., Kooi, M., . . . Schrauwen-Hinderling, V. (Nov 2014). Long-echo time MR spectroscopy for skeletal muscle acetyl-carnitine detection. *J Clin Invest*. 2014 Nov;124(11):4915-25. doi: 10.1172/JCI74830. Epub 2014 Oct 1.
- Little, J. (2011). Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *J Appl Physiol*, S. 1554–1560.
- Machann, J., Etzel, M., Thamer, C., Haring, U. H., Claussen, C. D., Fritsche, A., & Schick, F. (Feb24(1) 2011). Morning to evening changes of intramyocellular lipid content in dependence on nutrition and physical activity during one single day: a volume selective ¹H-MRS study. *MAGMA*, S. 29-33. doi:10.1007/s10334-010-0233-8.
- Machann, J., Häring, H., Schick, F., & Stummvoll, M. (239-48. 6(4) 2004). Intramyocellular Lipids and Insulin Resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*.
- Mailloux, R., J. X., & Willmore, W. (Dec.19;2 2013). Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol.*, S. 123-39.
- Mannion, A., Jakeman, P., Dunnett, M., Harris, R., & Willan, P. (64(1) 1992). Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, S. 47-50.
- Mayer, T., Lucia, A., Earnest, C., & Kindermann, W. (2005). A conceptual framework for performance diagnosis and training prescription from submaximal gas exchange parameters - theory and application. *Int J Sports. International Journal Sports Medicine* 26, S. 38 - 48.
- McCully, K. K., Mulcahy, T. K., Ryan, T. E., & Zhao, Q. (2011). 35. McCully, K. K., Mulcahy, T. K., Ryan, T. E. Skeletal muscle metabolism in individuals with spinal cord injury. *J Appl Physiol*, S. 143-8.
- McGarry, J., Sen, A., Esser, V., Woeltje, K., Weis, B., & Foster, D. (73 1991). New insights into the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *Biochemie*, S. 77-84.
- McInnes, J. (2013). Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutrition & Metabolism*. doi:10.1186/1743-7075-10-63
- Meex, R. C., Schrauwen-Hinderling, V. B., Moonen-Kornips, E., Schaart, G., Mensink, M., Phielix, E., . . . Hesselink, M. K. (59(3) 2010). Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. *Diabetes*, S. 572-9.
- Meyer, T., & Kindermann, W. (50 1999). Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO₂max). *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, S. 185 - 196.
- Meyerspeer, M., Krssák, M., & Moser, E. (498(49/4) 2003). Relaxation times of ³¹P-metabolites in human calf muscle at 3 T. *Magn Reson Med*, S. 620-5.
- Meyerspeer, M., Scheenen, T., Schmid, A., Mandl, T., Unger, E., & Moser, E. (2011). Semi-LASER localized dynamic ³¹P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at ultra-high magnetic field. *Magnetic Resonance in Medicine*, S. 65(5), 1207–1215. ht.
- Mingrone, G. (2004). Carnitine in Type 2 Diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, S. 99-107. Von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591007> (October 6, 2015). abgerufen
- Moon, Richard, B., & Richards, J. (1973). Determination of Intracellular pH by ³¹P Magnetic Resonance. *J. Biol. Chem* 248(20), S. 7276–78.
- Morino, K., Petersen, K. F., & Schulman, G. I. (55 Suppl 2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*, S. S9–S15.
- Munk, K., Abröhl, C., Kurt, T., Langer, T., & Nethe-Jaenchen, R. (2008). *Biochemie - Zellbiologie*. Thieme.

- Muoio, D. (159 (6) 2014). Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock. *Cell*, S. 1253-1262. doi:http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.034
- Muoio, D. M., Noland, R. C., Kovalik, J. P., Seiler, S. E., Davies, M. N., Debalsi, K. L., & Mynatt, R. L. (15(5) 2012). Muscle-Specific Deletion of Carnitine Acetyltransferase Compromises Glucose Tolerance and Metabolic Flexibility. *Cell Metabolism*, S. 764-777.
- Noland, R., Koves, T., Seiler, S., Lum, H., Lust, R., Ilkayeva, O., . . . Muoio, D. J. (284 2009). Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *Journal of Biological Chemistry*, S. 22840 - 22852.
- O'Neill, H. M. (37 2013). AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes Metab J*, S. 1-21.
- Pagel-Langenickel, I. B. (Aug 2008). PGC-1 α Integrates Insulin Signaling, Mitochondrial Regulation, and Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, S. 283(33). doi:10.1074/jbc.M800842200
- Pan, J., Hamm, J., Rothman, D., & Shulman, R. (85(21) 1988). Intracellular pH in human skeletal muscle by ¹H NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, S. 7836-7839.
- Paoletti, R., Poli, A., & Jackson, A. S. (2000). *Creatine: from basic science to clinical application* (Bd. Medical Science Symposia Series).
- Pedersen, T., Nielsen, O., Lamb, G., & Stephenson, D. (305 2004). Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science*, S. 1144-1147.
- Perseghin, G. e. (30 2007). Abnormal left ventricular energy metabolism in obese men with preserved systolic and diastolic functions is associated with insulin resistance. *Diabetes Care*, S. 1520-1526.
- Pesta D, V. P., Hoppel, F., Kobel, C., Kremser, C., Esterhammer, R., Burtscher, M., . . . Schocke, M. (2013). Different Metabolic Responses during Incremental Exercise Assessed by Localized ³¹P MRS in Sprint and Endurance Athletes and Untrained Individuals. *Int J Sports Med*.
- Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R. E., & Shulman, G. I. (54(3) 2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, S. 603-8.
- Phüler, A., Regitz, M., Schmid, & Bornscheuer, U. (1999). *Römp kompakt - Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*. Thieme.
- Pierre, G., Macdonald, A., Gray, G., Hendriksz, C., Preece, M. A., & Chakrapani, A. (Oct. 2007). Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, S. 815.
- Power, R., Hulver, M., Zhang, J., Dubois, J., Marchand, R., Ilkayeva, O., . . . Mynatt, R. (50 2007). Carnitine revisited: potential use as adjunctive treatment in diabetes. *Diabetologia*, S. 824-832.
- Rabol, R., Boushel, R., & Dela, F. (31 2006). Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*, S. 675-683.
- Ramsay, R., & Zammit, V. (Vol 25 (5-6) 2004). Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, S. 475 - 493.
- Randle, P., & et.al. (1(7285) 1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, S. 785-9.
- Reddy, V. P., Garrett, M. R., Perry, G., & Smith, M. A. (May (4) 2005). Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent. *Sci Aging Knowledge Environ*, S. 18.
- Ren, J., Sherry, A., & Malloy, C. (2010). ¹H MRS of intramyocellular lipids in soleus muscle at 7 T: spectral simplification by using long echo times without water suppression. *Magnetic Resonance in Medicine*, S. 662-71.
- Robinson, E. H., Stout, J. R., Miramonti, A. A., Fukuda, D. H., Wang, R., & Townsend, J. R. (11(1) 2014). High-intensity interval training and β -hydroxy- β -methylbutyric free acid improves aerobic power and metabolic thresholds. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, S. 16.
- Roepstorff, C., Halberg, N., Hillig, T., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Wojtaszewski, J. F., . . . Kiens, B. (Jan;288(1) 2005). Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, S. E133-42.
- Romijn, J., Coyle, E., Sidossis, L., & et.al. (265 1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, S. 380 - 91.
- Satrústegui, J., Berkowitz, H., Boden, B., Donlon, E., & Mclaughlin, A. (105-114. 42 1988). An in vivo phosphorus nuclear magnetic resonance study of the variations with age in the phosphodiester content of human muscle. *Mech Ageing Dev*.
- Scharhag-Rosenberger, F. (Jahrgang 61, Nr. 6 2010). Spiroergometrie zur Ausdauerleistungsdiagnostik. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*.
- Scharhag-Rosenberger, F. (2012). Fettstoffwechseltraining / Training to Enhance Fat Metabolism. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*.
- Schmidt, C., Athenstaedt, K., Koch, B., Ploier, B., & Daum, G. (Vol 288 2013). Regulation of the Yeast Triacylglycerol Lipase Tgl3p by Formation of Nonpolar Lipids. *The Journal of Biological Chemistry*. *The Journal of Biological Chemistry*, S. 19939-19948.

- Schocke, M. E., Esterhammer, R., Kammerlander, C., Rass, A., Kremser, C., Fraedrich, G., . . . Greiner, A. (Jan 22(1) 2004). High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in humans measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy (³¹P MRS). *Magn Reson Imaging*, S. 109-15.
- Schroder, L., Schmitz, C., & Bachert, P. (102 2008). Carnosine as molecular probe for sensitive detection of Cu(II) ions using localized (1)H NMR spectroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, S. 174-183.
- Scott, W., Stevens, S., & Binder-Macleod. (November 2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy*, 81, S. 1810-1816.
- Seiler, S. E., Koves, T. R., Gooding, J. R., Wong, K. E., Stevens, R. D., Ilkayeva, O. R., . . . Muoio, D. M. (22 2015). Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and muscle fatigue during exercise. *Cell Metab.*, S. 65-76.
- Seiler, S. E., Martin, O. J., Noland, R. C., Slentz, D. H., DeBalsi, K. L., Ilkayeva, O. R., & Muoio, D. M. (55(4) 2014). Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity. *Journal of Lipid Research*, S. 635-644. .
- Sleigh, A., Stears, A., Thackray, K., Watson, L., Gambineri, A., Nag, S., & Savage, D. B. (97(3) 2012). Mitochondrial oxidative phosphorylation is impaired in patients with congenital lipodystrophy. *Sleigh, A., Stears, A., Thackray, K., Watson, L., Gambineri, A., Nag, S., ... Savage, D. B. (2012). Mitochondrial Oxidative Phosphorylation The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, S. E438-E442. doi:10.1210/jc.2011-2587
- Smekal, G. (2004). Kompendium der Sportmedizin. Physiologie, Innere Medizin und Pädiatrie. In R. Pokan, H. Förster, P. Hofmann, H. Hörtnagl, E. L. Kurkowski, & M. Wonisch, *Kompendium der Sportmedizin. Physiologie, Innere Medizin und Pädiatrie* (S. 88 - 89). Berlin-Heidelberg New York : Springer, .
- Stephens, F. B., Constantin-Teodosiu, D., & Greenhaff, P. L. (581(Pt2) 2007). Stephens, F. B., Constantin-Teodosiu, D., & Greenhaff, P. L. (2007). New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 2), 431-444. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.125799> doi: <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.125799>
- Szendroedi, J., Schmid, A. I., Chmelik, M., Krssak, M., & Nowotny, P. (6 2011). Skeletal Muscle Phosphodiester Content Relates to Body Mass and Glycemic Control. *PLoS One*.
- Tallon, M., Harris, R., Boobis, L., Fallowfield, J., & Wise, J. (19(4) 2005). The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. *J Strength Condit Res*, S. 725-729.
- Tarnopolsky, M. A., Rennie, C. D., Robertshaw, H. A., Fedak-Tarnopolsky, S. N., Devries, M. C., & Hamadey, M. J. (March 2007). Influence of Endurance Exercise Training and Sex on Intramyocellular Lipid and Mitochondrial Ultrastructure, Substrate Use, and Mitochondrial Enzyme Activity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, S. R1271-R1278. doi:10.1152/ajpregu.00472.2006
- Taylor, D. J. (4/4 2000). Clinical utility of muscle MR spectroscopy. *Semin Musculoskelet Radiology*, S. 481-502.
- Thamer, C., Machann, J., Bachmann, O., Haap, M., Dahl, D., Wietek, B., . . . Stumvoll, M. (Apr88 2003). Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *Journal Clin. Endocrinol. Metab.*, S. 1785-91.
- Toledo, F. G., Menshikova, E. V., Azuma, K., Radiková, Z., Kelley, C. A., Rittov, V. B., & Kelley, D. E. (57 2008). Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes*, S. 987-994.
- Tušek Jelenc, M. e. (2016). Feasibility and Repeatability of Localized ³¹P-MRS Four-Angle Saturation Transfer (FAST) of the Human Gastrocnemius Muscle Using a Surface Coil at 7 T.” <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm>. *NMR in Biomedicine* 29(1), S. 57-65. doi:<http://doi.wiley.com/10.1002/nbm>
- Tušková, R., Valkovič, L., Gajdošík, M., Heckmann, T., Bachl, N., Tschan, H., . . . Krššák, M. (2016). ¹H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7T. In *www.ismrm.org (Hrsg.), 24 Annual Meeting & Exhibition*, (S. Abstract 4521). Singapore.
- Tušková, R., Valkovič, L., Gajdošík, M., Heckmann, T., N.Bachl, Tschan, H., . . . Krššák, M. (2016). ¹H MRS can detect and quantify acetylcarnitine in different human skeletal muscles at rest at 7T. *ISMARM Annual Meeting & Exhibition* (S. Abstract No. 4521). Singapore: ISMARM.ORG.
- Ukropec, J. e. (114 2008). Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health. *Arch Physiol Biochem.*, S. 357-368.
- Valkovič, L., & Chmelík, M. (2013). “Time-Resolved Phosphorous Magnetization Transfer of the Human Calf Muscle at 3 T and 7 T: A Feasibility Study.” 82(5): 745-51. *European Journal of Radiology*.
- Valkovič, L., Chmelík, M., Ukropcová, B., Heckmann, T., Bogner, W., Frollo, I., . . . Trattnig, S. (2016). Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. *Scientific Reports*.
- Valkovič, L., Ukropcová, B., Chmelík, M., Baláž, M., Bogner, W., Schmid, A. I., . . . Krššák, M. (26 2013). Interrelation of ³¹P-MRS metabolism measurements in resting and exercised quadriceps muscle of overweightto-obese sedentary individuals. *NMR Biomed*, S. 1714-1722.

- Valkovič, L., Ukropcová, B., Chmelík, M., Baláž, M., Bogner, W., Schmid, A., . . . Krššák, M. (2013). Interrelation of 31P-MRS Metabolism Measurements in Resting and Exercised Muscle of Overweight-to-Obese Sedentary Individuals. *NMR Biomed.*
- van de Weijer, T., Sparks, L., Phielix, E., Meex, R. C., van Herpen, N. A., Hesselink, M. K., . . . Schrauwen-Hinderling, V. B. (8(2) 2013). Relationships between mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051648>
- van Loon, L. C., Koopman, R., Manders, R., van der Wengen, W., Gerrit, P., van Kranenburg, H., & Keizer, H. A. (Aug Vol.287no3 2004). Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, S. E558-E565. doi:10.1152/ajpendo.00464.2003
- van Loon, L., Greenhaff, P., & Constantin-Teodosiu, D. (356 2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, et al. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol.*, S. 295 - 304.
- van Oorschot, J. W., Schmitz, J. P., Webb, A., Nicolay, K., Jeneson, J. A., & Kan, H. E. (Sep 30;8(9) 2013). 31P MR spectroscopy and computational modeling identify a direct relation between Pi content of an alkaline compartment in resting muscle and phosphocreatine resynthesis kinetics in active muscle in humans. doi:doi: 10.1371/journal.pone.0076628. eCollection 2013.
- Vanhamme, L., Boogaart, A. v., & Huffel, S. V. (129(1 1997). Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *Journal Magnetic Resonance*, S. 35-43.
- Weineck, J. (2009). *Optimales Training*. Spitta.
- Wells, G. D. (35 2008). Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can J Neurol Sci*, S. 31-40.
- Wokke, B. H., Hooijmans, M. T., van den Bergen, J. C., Webb, A. G., Verschuuren, J. J., & Kan, H. E. (27 2014). Muscle MRS detects elevated PDE/ATP ratios prior to fatty infiltration in Becker muscular dystrophy. *NMR Biomed.* 27, 1371–7 (2014). *NMR Biomed.*, S. 1371-7.
- Wong, G. K., Joo, D. T., & McDonnell, C. (65(2) 2000). Lipid resuscitation in a carnitine deficient child following intravascular migration of an epidural catheter. *Anaesthesia*, S. 192-195.
- Wong, G., & Crawford, M. (6 (114) 2011). Carnitine deficiency increases susceptibility to bupivacaine-induced cardiotoxicity in rats. *Anesthesiology.*, S. 1417-1424.
- Zhou, Y., & Grill, V. (44(4) 1995). Palmitate-induced beta-cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes*, S. 394-9.
- Zintl, F. (2009). *Ausdauertraining*. München: blv.

8. Abbildungsverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt (Fa. Ergospect etc.). Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“ Teile der Grafiken wurden aus eigenem Bildmaterial der Messungen erstellt bzw. wurden durch Bildmaterial ergänzt, da einige Abbildungen nur dadurch in den von mir angestrebten wissenschaftlichen Kontext verständlich werden.

ABBILDUNG 1: AXIAL AUFNAHMEN DER VOXELPLATZIERUNG IM M. VASTUS LATERALIS UND M. SOLEUS, (GRAFIK AUS EIGENEM BILDMATERIAL DER MESSUNGEN ERSTELLT)	7
ABBILDUNG 2: VERWENDUNG QUADSPECT ERGOMETER DER FA ERGOSPECT IN BAUHLAGE ZUR MESSUNGEN 31P MRS, (BILDMATERIAL MIT GENEHMIGUNG DER FA ERGOSPECT).	9
ABBILDUNG 3: SPEKTRUM DER ENERGIEREICHEN METABOLITEN ATP PCR UND PI (QUELLE: ERGOSPECT) UND PLATZIERUNG DES VOXELS IM M. VASTUS LATERALIS.....	10
ABBILDUNG 4: DIE ROLLE DES ACETYL-COA IN CITRATZYKLUS ZUR ENERGIEGEWINNUNG AUS KH UND FETTEN (QUELLE: NATURE REVIEWS/ ENDOCRINOLOGY)	11
ABBILDUNG 5: INHIBITION UND KOMPETITIVE HEMMUNG DER PHOSPHOFRUKTOKINASE DER PYRUVATDEHYDROGENASE UND DER HEXOKINASE (PHÜLER, REGITZ, SCHMID, & BORNSCHEUER, 1999)	12
ABBILDUNG 6 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER 2 HAUPTFUNKTIONEN KREATIN-PHOSPHAT (PCR)-SYSTEM IN EINER MUSKELFASER. DIE ERSTE IST DIE DES ZEITLICHEN ENERGIEPUFFERS FÜR DIE (ATP) REGENERATION. DIE ZWEITE HAUPTFUNKTION IST DER TRANSPORT VON ENERGIEREICHEM PHOSPHAT VOM MITOCHONDRIUM ZUR MYOFIBRILLE. (PAOLETTI, POLI, & JACKSON, 2000)	14
ABBILDUNG 7: FETTSÄURETRANSPORT IN DIE MITOCHONDRIALE MATRIX ÜBER "CARNITIN-SHUTTLE" (WONG, JOO, & MCDONNELL, 2000).....	15
ABBILDUNG 8: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DER MITOCHONDRIALEN FLEXIBILITÄT / INFLEXIBILITÄT JE NACH ENERGIEZUFUHR (MUOIO D. , 2014).	18
ABBILDUNG 9 DIE MÖGLICHEN WIRKMECHANISMEN DES CARNOSINES IN DER SKELETTMUSKULATURZELLEN: 1) PROTONENPUFFERUNG; 2) REGULATION BEI DER CALCIUMFREISETZUNG UND KALZIUMEMPFINDLICHKEIT; 3) PROTEKTIVE WIRKUNG GEGEN REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS); 4) CHELATBILDNER BEI VERSCH. METALLIONEN UND 5) EXTRAZELLULÄRE BEREITSTELLUNG VON HISTIDIN / HISTAMIN (BOLDYREV, ALDINI, & DERAIVE, 2013).	19