

Tilskudd av vitamin C og E påvirker ikke kapillarisering i m. vastus lateralis gjennom en periode med utholdenhetstrening.

Elisabeth Tallaksen Ulseth

Obligatorisk studentoppgave, profesjonsstudiet i medisin, 11. semester.

Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo.

26. september 2012.

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT	2
INNLEDNING	3
<i>Bakgrunn</i>	3
<i>Antioksidanter og trening</i>	3
<i>Angiogenese</i>	4
<i>Hvordan stimulerer utholdenhetstrening angiogenese i skjelettmuskulatur?</i>	5
<i>Antioksidanter og angiogenese – en sammenheng?</i>	6
<i>Målsetning</i>	6
<i>Hypotese:</i>	7
METODE	7
<i>Begrepsavklaring</i>	7
<i>Forsøkspersonene</i>	7
<i>Studiedesign</i>	8
<i>Treningsopplegget</i>	8
<i>Kosttilskuddene</i>	9
<i>Tagning av muskelbiopsier og behandling av disse:</i>	9
<i>Kutting av biopsiene</i>	10
<i>Fotografering av biopsiene:</i>	11
<i>Telling av kapillærer og celler med ulik fibertype:</i>	12
<i>Statistikk</i>	13
RESULTATER	13
<i>Tabell 1: Resultater fra prebiopsiene</i>	14
<i>Tabell 2: Resultater fra postbiopsiene</i>	15
<i>Tabell 3: Prosentvise endringer fra prebiopsiene til postbiopsiene</i>	16
DISKUSJON	16
<i>Oppsummering av resultat</i>	16
<i>Forventede endringer i placebo</i>	16
<i>Intervensjonsgruppa</i>	18
<i>Metodevurdering</i>	19
<i>Konklusjon:</i>	20
Takksigelser	20
Referanser	21

ABSTRACT

Background:

It has long been discussed whether supplementation of antioxidants promotes or inhibits adaptation to exercise. Regular exercise leads to increased oxidative stress in muscles through increased production of reactive oxygen species (ROS), and antioxidants have therefore been seen as a mean to counteract the potentially harmful effects of ROS. However, recent studies show that ROS regulate processes that are central in the adaptive responses of muscle cells. It is therefore possible that supplementation of antioxidants through inhibition of ROS may have a negative effect on adaptation to exercise and physical performance.

Objective:

Our aim was to investigate the effects of combined vitamin C and E supplementation on the adaptation to endurance exercise. More concrete, we have investigated the relationship between supplementation of 1000 mg vitamin C and 235 mg vitamin E per day and the change in capillary density of the vastus lateralis muscle.

Design:

The study was double-blinded and randomized. 46 young, healthy subjects were randomized into two groups; one intervention group who received supplementation of vitamin C and E, and one placebo group. Muscle biopsies were obtained before and after 12 weeks of endurance training. The biopsies were analysed for capillaries using a CD31 antibody, and muscle fiber type was decided using the SC71 antibody. VO_{2max} was measured before and after the training period.

Results:

The capillary density did not change significantly during the training period. No significant differences between the two groups were observed concerning changes in capillary density or change in VO_{2max} . VO_{2max} increased significantly in both groups during the training period.

Conclusions:

Based on our results, supplementation of vitamin C and E to young, healthy individuals has no effect on adaptation to endurance training.

INNLEDNING

Bakgrunn

Å forbedre fysisk prestasjonsevne er viktig for mange mennesker i ulike aldre og situasjoner. Gjennom regelmessig trening og sunn kost forsøker vi stadig å forbedre våre fysiske egenskaper; det være seg utholdenhet, styrke eller fleksibilitet. Naturlig nok har mye forskning blitt gjort på dette området for stadig å komme nærmere svaret på hva som er den ideelle oppskriften på en god fysikk og gode treningsresultater.

At et riktig og næringsrikt kosthold er viktig for treningsprogresjon og restitusjon, har lenge vært kjent. Et tilpasset inntak av makronæringsstoffer (fett, karbohydrater og proteiner) og mikronæringsstoffer som vitaminer og mineraler er etter all sannsynlighet av stor betydning for resultater av intensiv trening (1).

Sammenhengen mellom kosthold og treningseffekt har selvfølgelig blitt fanget opp av det kommersielle markedet, og flere og flere kosttilskudd som lover bedret effekt av trening, har blitt tilgjengelige både for eliteidrettsutøvere og mosjonister.

Mange kosttilskudd inneholder antioksidanter, for eksempel vitamin E eller C. Den generelle oppfatningen har lenge vært at antioksidanter har positive effekter på adaptasjon til trening, men senere tids forskning har stilt spørsmålsteget ved dette. I flere forsøk gjort på både dyr og mennesker har slike tilskudd vist seg å ha enten ingen effekt (2) (3) eller negativ effekt (4) (5) på ulike variabler som henger sammen med fysisk prestasjonsevne.

SARA-prosjektet ved Norges idrettshøgskole har hatt som formål å undersøke forholdet mellom treningsprogresjon og daglig inntak av antioksidanttilskudd. Denne studentoppgaven representerer den delen av prosjektet som ser på sammenhengen mellom daglig inntak av store doser vitamin C og E og endring i kapillarisering i m. vastus lateralis gjennom en periode med utholdenhetstrening.

Før prosjektet presenteres, er det nødvendig å se nærmere på eksisterende kunnskapsgrunnlag angående antioksidanter og deres sammenheng med trening, og på sammenhengen mellom fysisk aktivitet og endring i kapillarisering i skjelettmuskulatur.

Antioksidanter og trening

Redoksstatusen, dvs. balansen mellom pro-oksiderende og anti-oksiderende faktorer, endres under trening i samsvar med at cellens metabolisme og forbruk av oksygen øker. Som respons på muskelarbeid øker produksjonen av "reactive oxygen species" (ROS), noe som kan føre til oksidering og modifisering av lipider, nukleinsyrer og andre cellulære produkter (6). Disse tilsynelatende skadelige effektene har i flere studier blitt satt i sammenheng med blant annet histologiske endringer i skjelettmuskulatur og nedsatt muskelfunksjon (7) (8).

Oksidering av cellebestandeler som respons på trening har ført til videre forskning på antioksidanter. Dersom antioksidanter, som i prinsippet skal nøytralisere ROS, kan

forhindre noen av disse skadelige effektene, virker det logisk at tilskudd av disse vil føre til forbedret prestasjon under trening og konkurranser, samt raskere restitusjon.

Senere forskning har imidlertid vist at ROS spiller en rolle i å regulerer flere redoksprosesser som kontrollerer noen av de adaptive responsene i muskelcellene (9). Den intracellulære redoksstatusen har en viktig funksjon i regulering av gentranskripsjon og proteinsyntese, blant annet ved å regulere ulike transkripsjonsfaktorer (10) (11) (12). Dette kompliserer bildet og utforder den gamle oppfatningen av at ROS kun har skadelige effekter. Dersom ROS har en rolle i cellulære mekanismer som fører til adaptasjon til trening, kan nøytralisering av disse ved inntak av antioksidanter virke negativt på nettopp treningsadaptasjon, og dermed prestasjonsutvikling. Dette er undersøkt i flere studier, men resultatene spriker (2-5).

Om antioksidanter har en positiv, negativ eller nøytral effekt på treningsadaptasjon og fysisk prestasjonsevne er altså et spørsmål som det fremdeles ikke fins noe entydig svar på. Med tanke på at funnene på dette området spriker, synes det rimelig å påstå at det trengs mer forskning. Dette er også en konklusjon som trekkes i det mye av den eksisterende litteraturen som omhandler ROS, antioksidanter og sammenhengen mellom disse systemene og treningsadaptasjon (6, 8, 13).

Det er viktig å påpeke at det i denne oppgaven dreier seg om antioksidanter som kosttilskudd i tablettform, og ikke som en naturlig del av et variert kosthold. Det er også snakk om tilskudd gitt til relativt unge, friske individer som ikke har vitaminmangler i utgangspunktet.

Angiogenese

Begrepet angiogenese beskriver prosessen der nye kapillærer dannes fra eksisterende kapillærer. Angiogenese forekommer i flere fysiologiske, ikke-patologiske, prosesser i menneskekroppen. Vi kjenner for eksempel til ovariesyklus, placentautvikling og angiogenese i skjelettmuskulatur som respons på trening (14).

Angiogenese i skjelettmuskulatur er en sammensatt og komplisert prosess som ikke ennå er fullt ut forstått. Nydannelsen av kapillærer skjer på to måter, som i engelsk litteratur blir omtalt som "sprouting" og "intussusception". Begge prosessene har samme endepunkt: ekspansjon av kapillærnettverket som igjen gir større overflate for utveksling av oksygen og næringsstoffer mellom blod og celler.

Intussusception er prosessen der en enkelt kapillær splittes i to kapillærer ved at kapillæren folder seg mot sentrum i hele lengderetningen. Videre vil aktiverte endotelceller ekstendere intraluminært, og det blir dannet to fullverdige kapillærrør (14).

Sprouting brukes om prosessen der aktiverte endotelceller bryter ut fra en eksisterende kapillær og ekstenderer inn i omkringliggende matrix. Det dannes slik en strenglignende struktur som videreutvikles til en tube og forankres i ekstracellulær matrix. Den nydannede tuben må så komme i kontakt med en annen kapillær for å bli en del av kapillærnettverket (14).

Hvordan stimulerer utholdenhetstrening angiogenese i skjelettmuskulatur?

Regelmessig utholdenhetstrening fører til endringer både i det kardiovaskulære systemet og i skjelettmuskulaturen. Summen av disse endringene gir på sikt bedre prestasjonsevne, målt ved for eksempel et høyere VO_{2maks} eller lenger tid til utmattelse.

Skjelettmuskulaturen er et plastisk vev som tilpasser seg økte krav til funksjon på en imponerende måte. Regelmessig utholdenhetstrening fører til flere fysiologiske og biokjemiske adaptasjoner i muskulaturen, som igjen er basis for forbedring i prestasjon ved regelmessig trening (15). Særlig viktig er endringen fra fibertype IIb/IIId/x, som er rik på glykolytisk enzymer, men har relativt dårlig kapillærforsyning, til fibertype IIa, som er en mer oksidativ fibertype med bedre kapillærforsyning (16). Andre endringer er økt mitokondiebiogenese, økt insulinsensitivitet og, som vi skal se, økt angiogenese.

For å kunne tilføre ekstra oksygen og næringsstoffer som skjelettmuskulaturen trenger under trening, kreves det en økning i blodgjennomstrømning som ikke kan oppnås med økning i hjertets minuttvolum alene (17). En av de adaptive prosessene i skjelettmuskulaturen ved langvarig trening er derfor angiogenese og økt kapillarisering. Allerede på 70-tallet viste flere dyreforsøk at direkte motonevronstimulering ga dramatisk økning i kapillærtetthet (18) (19). Også i dyreforsøk der langvarig utholdenhetstrening har vært stimuli, har resultatene pekt i samme retning, om ikke i like stor grad som ved direkte motonevronstimulering (20) (21).

At utholdenhetstrening har et mer utviklet kapillærnettverk enn utrente, og at det er en klar sammenheng mellom regelmessig trening og stimulering av angiogenese i muskulatur, ser ut til å være godt forankret i litteraturen (22) (23) (24) (25, 26). Neste spørsmål blir derfor *hva* som får regelmessig trening til å stimulere angiogenesen.

Angiogenese induisert av utholdenhetstrening ser ut til å være stimulert av en kombinasjon av vekstfaktorer, hypoksi og metabolsk og mekanisk stress (14).

Av vekstfaktorer viktige i angiogenesen er "vascular endothelial growth factor" (VEGF) trukket frem som helt sentral (27). VEGF er en endotelial vekstfaktor som gjennom binding til reseptorene VEGF-1 og VEGF-2 stimulerer til endotelcelleproliferasjon, migrasjon og differensiering (28) (29). Flere studier viser at oppregulering av VEGF skjer i rottemuskel etter en enkelt økt med løping på tredemølle (30), og som følge av isolerte muskelkontraksjoner (27). Breen et al. fant at VEGF mRNA ble oppregulert 2-4 ganger i rottemuskelen etter trening, og holdt seg forhøyet i fire timer etter avsluttet økt (30). Oppregulering av VEGF mRNA er også observert i menneske etter utholdenhetstrening (31).

Hypoksi er et viktig stimulus til angiogenese i skjelettmuskulatur, og virker hovedsakelig gjennom oppregulering av VEGF. Shweiki et al. viste i 1992 at ved å senke pO_2 i en endotelcellekultur, oppreguleres VEGF med de følgene som er beskrevet over. Likeså ble VEGF-ekspresjonen mindre når pO_2 i cellekulturen økte (32). Dette har blitt vist også in vivo, ved at hypoksi fremprovoserte produksjon av vekstfaktorene VEGF, bFGF og TGF-beta 1 i rottemuskel, særlig når hypoksien var fremprovosert av trening (30).

På tross av at flere forsøk viser at VEGF står helt sentralt i linken mellom trening og angiogenese, er det fremdeles mange hull som må tettes før man kan etablere en komplett forståelsesmodell for hvordan fysiologisk angiogenese kontrolleres for å tilpasse seg kravene til aktiv muskulatur. Flere signalveier er aktive, men samspillet mellom systemene under ulike forhold er fremdeles uklart. Også på dette emnet konkluderer studiene med at det trengs mer kunnskap, gjerne i form av eksperimenter der man bruker knock-out mus for å kartlegge hvilke systemer som er ansvarlig for hvilke prosesser i dette komplekse samspillet (15) (14) (33).

Antioksidanter og angiogenese – en sammenheng?

Når kunnskapsgrunnlaget for antioksidanters effekt på utholdenhetstrening og for angiogenese og utholdenhetstrening er gjennomgått, er det interessant å gå videre og se på forbindelsen mellom disse. Vi har sett at antioksidanter kan påvirke muskelfiberens egenskaper, og dens adaptasjon til trening. Særlig er effekten på mitokondriemetabolismen undersøkt. Men kan det også tenkes at antioksidanter kan virke inn på noen av signalveiene som regulerer angiogenesen, for eksempel via VEGF, og dermed gi strukturelle endringer i muskulaturen?

Som allerede nevnt er de ulike kaskadene som regulerer VEGF-ekspresjon fremdeles ikke fullt ut forstått. Senere studier har imidlertid satt søkelyset på PGC-1alfa, en transkripsjons-koaktivator som regulerer gener involvert i energimetabolismen. Ved hypoksi spiller PGC-1alfa en viktig rolle i angiogenesen i skjelettmuskulatur ved å koaktivere en østrogenreseptor (ERRalfa) som igjen aktiverer genet som koder for VEGF (34). Dette er også sett i dyreforsøk, der man ved hjelp av knock-out mus har funnet at treningsindusert VEGF-ekspresjon og treningsindusert angiogenese hindres signifikant dersom man deleterer PGC-1alfa genet i muskulatur (35, 36).

Dersom vi forsøker å sette denne kunnskapen i sammenheng med antioksidantene, viser studier at ROS, nærmere bestemt hydrogenperoksid (H_2O_2), i kontraherende muskel er nødvendig for å oppregulere PGC-1alfa (15). Kan det da tenkes at tilskudd av antioksidanter fører til en hemming av PGC-1alfa ekspresjonen, som igjen vil føre til en hemming av treningsindusert angiogenese? På cellenivå er det absolutt mulig å tenke seg en slik sammenheng. Ingen studier er derimot gjort for å teste denne sammenhengen direkte, verken på dyr eller menneske.

Slik blir SARA-prosjektet ekstra interessant.

Målsetning

Etter gjennomgangen av kunnskapsgrunnlaget er det tydelig at daglige tilskudd av antioksidanter kan ha både positiv, negativ og ingen effekt på diverse fysiologiske prosesser som fører til treningsprogresjon. Det er fremdeles behov for mer kunnskap på området.

De overordnede målene for den delen av SARA-prosjektet som danner utgangspunktet for denne studentoppgaven har vært å:

- A) Se på om store daglige doser av vitamin C og E kan virke inn på adaptasjon til utholdenhetstrening, uttrykt ved kapillarisering i m. vastus lateralis hos forsøkspersonene.
- B) Relatere eventuelle endringer i kapillariseringen til eventuelle endringer i fibertypesammensetning.

Hypotese:

Daglig inntak av vitamin C og E (1000 mg og 235 mg per dag) hos unge, friske individer, vil slå av noen av de redox-sensitive signalveiene assosiert med adaptasjon til utholdenhetstrening, og derfor gi redusert økning i prestasjonsmål og redusert økning i kapillarisering i skjelettmuskulatur etter en treningsperiode, sammenlignet med placebo.

METODE

Begrepsavklaring

I eksisterende litteratur brukes ulike begreper for å uttrykke kapillærtetthet. Begrepet "capillaries around fibers" (CAF) er et absolutt begrep der man teller kapillærer rundt hver enkelt fiber. "Capillaries per fiber-ratio" (C/F-ratio), beskriver hvor mange kapillærer som i gjennomsnitt ligger an til og forsyner én fiber. Størrelsen regnes ut ved å dividere antall kapillærer i et område på antall fibre i samme område. Begrepet sier med andre ord ingenting om den enkelte fiber. Man kan også relatere CAF til fiberareal (CAF/area; CAFA). Det betyr at dersom fiberarealet øker mer enn antall nye kapillærer, for eksempel ved hypertrofi, vil denne verdien tilsi at kapillærtettheten faktisk har gått ned som følge av trening, selv om antall kapillærer er konstant. C/F, CAF og CAFA er begreper som kommer til å bli benyttet videre i oppgaven.

Forsøkspersonene

46 forsøkspersoner (19 kvinner og 18 menn) ble rekruttert til studien i to runder. Forsøkspersonene ble rekruttert fra Høgskolen i Østfold og Høgskolen på Lillehammer i første runde og fra Norges idrettshøgskole i andre runde. Inklusjonskriteriene for deltagelse var at forsøkspersonene måtte være i alderen 18-45 år og ha trent utholdenhet minimum én gang i uka og maksimum fem ganger i uka gjennom de siste seks månedene. De måtte være fri for skader i muskel- og skjelett-systemet.

Alle forsøkspersonene underskrev på skjemaet «Informert samtykke til deltagelse».

Før treningsperioden gjennomgikk alle forsøkspersonene en fire dagers kostregistrering. Informasjon om kosthold ble gitt av ernæringsfysiologer eller studenter i ernæringsfysiologi. Dette for å sikre positiv energibalanse i treningsperioden. Forsøkspersonene hadde gjennom studien enkelte restriksjoner på inntak av mat og drikke med høyt antioksidantinnhold (se vedlegg – skjema med

informasjon om kosthold). Bortsett fra disse restriksjonene spiste de som normalt, også i relasjon til treningsøktene.

Forsøkspersonene stoppet alt inntak av eventuelle kosttilskudd 14 dager før prosjektstart.

Studiedesign

Randomisert kontrollert dobbeltblindet studie. Før randomisering ble det målt VO_{2maks} på alle forsøkspersonene. De ble deretter randomisert inn i to grupper som var stratifisert etter kjønn og VO_{2maks} . Randomiseringen ble gjort ved hjelp av randomiseringsprogram.

De to gruppene fikk følgende tabletter daglig:

Gruppe 1: 1000 mg. vitamin C og 235 mg. vitamin E.

Gruppe 2: Placebo.

Tablettene ble produsert på bestilling av Norges idrettshøgskole spesielt til dette prosjektet (PETFA ab, del av Faun Pharmagroup, Sverige).

I løpet av treningsperioden var det seks forsøkspersoner som trakk seg fra forsøket, én grunnet manglende tid, én grunnet nyoppstått akne, én grunnet overtråkk og tre grunnet nyoppståtte smerter i akillessenen.

Denne studien fulgte de standardene som er satt av Helsinki deklarasjonen og forventet godkjenningen fra Den regionale etiske komite for Helse Sør-Øst før igangsetting.

Treningsopplegget

Forsøkspersonene gjennomførte et treningsopplegg med 3-4 økter i uka i totalt 12 uker (se tabell). Alle intervalløktene ble gjennomført som løpeøkter. Forsøkspersonene hadde anledning til å trene to økter styrketrening i uka i tillegg til treningsprogrammet og til å gjennomføre én langkjøringsøkt i uka som en annen treningsform enn løping.

Alle deltakerene ble utstyrt med en pulsklokke (Polar RS400, Finland) som de brukte under hver økt. De hadde også en elektronisk treningsdagbok (designet av Norges idrettshøgskole til dette prosjektet) som de oppdaterte jevnlig. I treningsdagboka ble de bedt om å registrere gjennomsnittspuls på øktene og subjektiv følelse av anstrengelse ved hjelp av Borg skala¹. I tillegg registrerte de inntaket av tilskudd i en egen sjekk-boks.

¹ Borg skala: Borg RPE (Ratings of Percieved Exertion) er en tallskala som er utviklet for å forsøke å standardisere den subjektive opplevelse av anstrengelse ved ulike grader av fysisk aktivitet. Skalaen går fra 6 til 20 hvor 6 indikerer at aktiviteten ikke er anstrengende og 20 at den er maksimalt anstrengende. Meget lett tilsvarer tall mellom 6 og 10, moderat intensitet tilsvarer 12-14 og anstrengende intensitet tilsvarer 15-16.

Midtveistester av $VO_{2\text{maks}}$ ble gjennomført etter at forsøkspersonene hadde fullført minimum 15 økter av treningsprogrammet. Posttester ble gjort etter at forsøkspersonen hadde fullført minimum 40 av øktene i treningsprogrammet.

Uke	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4
1-3	Kontinuerlig: 30 min: 82-87 % av HF max; 15-17 på Borg skala	Intervall: 4 x 4 min: > 90 % av HF max.; 16-18 på Borg skala	Kontinuerlig: 60 min: 72-85 % av HF max; 14-16 på Borg skala	
4-8	Kontinuerlig: 30 min: 82-87 % av HF max; 15-17 (18) på Borg skala	Intervall: 5 x 4 min: > 90 % av HF max.; 16-18 på Borg skala	Kontinuerlig: 60 min: 72-85 % av HF max; 14-16 på Borg skala	Intervall: 4 x 6 min: >90 % av HF max; 16-18 på Borg skala
9-12	Kontinuerlig: 30 min: 82-87 % av HF max; 15-17 (18) på Borg skala	Intervall: 6 x 4 min: > 90 % av HF max.; 16-18 på Borg skala	Kontinuerlig: 60 min: 72-85 % av HF max; 14-16 på Borg skala	Intervall: 5 x 6 min: >90 % av HF max; 16-18 på Borg skala

Tabell 2: Oversikt over de ulike øktene i treningsopplegget

Kosttilskuddene

Hver forsøksperson i utholdenhetsstudien inntok i løpet av treningsperioden to tabletter (én med vitamin C og én med vitamin E eller to med placebo) før og etter trening, altså totalt fire tabletter hver dag. På treningsfrie dager ble tilskuddene tatt morgen og kveld. Tablettene inneholdt henholdsvis 500 mg. vitamin C og 58 mg. vitamin E. Placebotablettene inneholdt cellulose og dikalsiumfosfat, og hadde helt likt utseende som tablettene med aktiv komponent. Forsøkspersonene fikk tilskudd for to uker av gangen og returnerte tomme bokser på sine skoler før de fikk tabletter for to nye uker.

Selv om dosen av både C og E-vitamin var vel innenfor grensen for hva som blir sett på som trygg, ble likevel forsøkspersonene bedt om å notere eventuelle bivirkninger i utdelte lister.

Tagning av muskelbiopsier og behandling av disse:

Muskelbiopsier ble tatt to ganger i forløpet, før og etter treningsperioden. Ved begge taggingene ble biopsiene tatt minst 48 timer etter siste treningsøkt for å sikre at eventuelle funn ikke kunne tilskrives forbigående akutte endringer i muskulaturen etter en økt.

Biopsiene ble tatt fra midtre del av m. vastus lateralis på høyre ben. Post-biopsien ble tatt ca. tre cm. proksimalt for pre-biopsien. Huden ble rensert med desinfiserende væske, og det ble satt lokalbedøvelse (Xylocain adrenalin, 10mg/ml + 5 µg/ml, AstraZeneca,

Södertälje, Sverige). Det ble lagt et 10-15 mm langt snitt i huden og i muskelfascien. Det ble tatt to biopsibiter med biopsinål (Pelomi, Albertsund, Danmark). Den første biten ble tatt i proksimal og den andre i distal retning. To muskelbiter på 50-100 mg ble hentet ut. Bitene ble vurdert, og den fineste biten der fibre lå parallelt ble skåret til med et barberblad. Biten ble så lagt i stabiliserende lim (Tissue-tek, O.C.T. compound, Sakura, Nederland) og fryst ned i isopentan som var nedkjølt av flytende nitrogen og holdt ca. – 190 grader. Deretter ble bitene lagret i en ultrafryser ved –80 grader, i beholdere merket med FP-nr.

Kutting av biopsiene

Biopsiene ble kuttet i en kryostat (Leica, CM3050, Nussloch GmbH, Tyskland) og lagt på Superfrost Plus mikroskopglass (Menzel-Gläser, Braunschweig, Tyskland). Kryostaten holdt en temperatur på –22°C for at snittene skulle holde formen og ikke bli ødelagt. To snitt fra pre- og to fra postbiopsien ble lagt på samme glass slik at pre- og postsnittene fikk nøyaktig samme kjemiske behandling. Ti glass med nabosnitt ble laget for hver forsøksperson. Glassene med muskelsnittene ble deretter lagret i ultrafryser (–80°C).

Merking av biopsiene med immunhistokjemi:

Snittene ble tint 30 minutter i romtemperatur før merking. Etter 15 minutter ble det lagt på en lipidbase (Vector laboratories, Burlingame) rundt de fire biopsiene på hvert objektglass. Dette for å lage en barriere slik at antistoffene som skulle tilsettes ville ligge direkte på snittene. Deretter ble snittene dekt med bovint serumalbumin (BSA), et plasmaprotein fra kveg som blokkerer uspesifikke bindinger på muskelvevet. Etter 30 minutter ble BSA ristet av glassene. Biopsiene ble så merket immunhistokjemisk i følgende trinn:

1) Primærantistoffet anti-CD31 fra mus (Dako, clone JC70A, ref. M0823) binder seg til kapillærer. Dette ble blandet med BSA i et blandingsforhold 1:200. Ca. 200 mikroliter av blandingen ble lagt på objektglassene med en pipette, og glassene inkubert i fuktekammer i kjøleskap til neste morgen. Fuktekammer ble brukt for å forhindre at antistoffblandingen skulle fordampe. Primærantistoffblandingen ble så ristet av, og glassene ble vasket i PBS-t. Vaskeprosessen foregikk ved at glassene ble satt i en glasskubbe med PBS-t på en vibrerende plate. PBS-t fungerer som vaskebuffer og inneholder fosfatbufret saltvann (som stabiliserer pH) blandet med 0.05 % tween 20. Etter 10 minutter ble PBS-t ristet av, og gjenstående dråper av PBS-t ble tørket bort med et fint tørkepapir (Kimteck Science, Precision Wipes Tissue Wipers, Kimberly-Clark, USA), slik at det ikke skulle påvirke neste antistoffprosess.

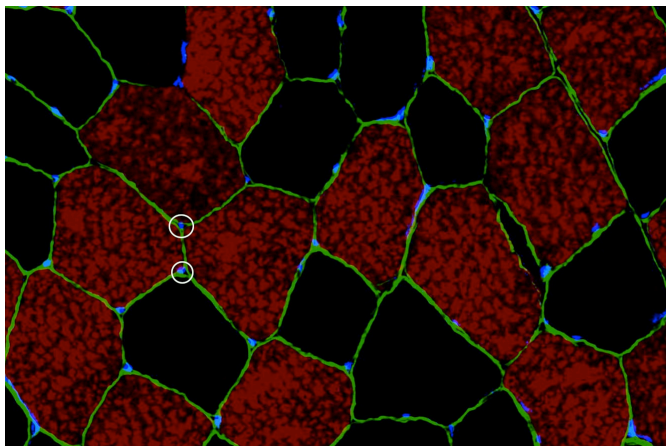
2) Sekundærantistoffet "alexa 594 rød, anti mus" (Invitrogen, ref: A11012, 1008646) ble blandet med BSA i forholdet 1:200 og lagt på glassene. Fra nå av ble glassene skjermet for lys i resten av prosessen. Dette fordi sekundærantistoffene har fluorokromer som blekner ved belysning. Glassene ble inkubert i fuktekammer i romtemperatur i 30 minutter. Glassene ble så vasket med PBS-t i 10 minutter.

Etter trinn 1) og 2) ble objektglassene fotografert for første gang i lysmikroskop for å få bilde av kun de merkede kapillærene. (Se avsnittet om fotografering av biopsiene).

3) Etter fotograferingen ble det andre og tredje primærantistoffet blandet sammen. Polyklonalt antistoff mot dystrofin fra kanin (Abcam, ab 15277-500, lot 831009) merker cellemembraner, og ble brukt for å kunne skille muskelfibrene ved senere mikroskopering. SC71 er et antistoff mot Myosin Heavy Chain II (MyHCII) (monoklonalt, mus) (Schiaffino, Padua universitet), og merker muskelceller med fibertype II. De to antistoffene ble blandet med BSA med fortykning henholdsvis 1:500 (dystrofin) og 1:1000 (SC71). Begge antistoffløsningene ble inkubert samtidig i to timer i fuktekammer i romtemperatur. Glassene ble så vasket 1x10 minutter i PBS-t.

4) Sekundærantistoff til dystrofin og MyHCII, SC71 ble så blandet med BSA. Vi brukte polyklonalt anti-kanin, "alexa 594" (rød) og monoklonalt anti-mus, "alexa 488" (grønn) (Invitrogen, ref:A11001, 1008801). Begge i blandingsforhold 1:200. Blandingen ble lagt på glassene og inkubert i fuktekammer i romtemperatur i 30 minutter. Deretter ble de vasket 10 minutter i PBS-t.

Til slutt ble monteringsmediumet Prolong Gold anti-fade med DAPI (Invitrogen) lagt på snittene og glassene montert med dekkglass. En dråpe monteringsmedium ble påført midt på glasset og dekkglasset ble så sluppet oppå. Glassene stod så lysfritt i romtemperatur til tørk over natten.



Bilde 1: Eksempelbilde satt sammen av tre ulike bilder med tre ulike filtre slik at de tre ulike merkingene blir tydelige. Muskelcellene er rammet inn av merkingen med anti-dystrofin (her i grønt). Type II-fibre er merket med anti-SC71 (her røde). Kapillærene er merket med anti-CD31 (her blå). De to ringene rammer inn to kapillærer med typisk plassering i hjørnene av muskelcellene.

Fotografering av biopsiene:

Fotograferingen av biopsiene foregikk også i to trinn. Første trinn foregikk etter at biopsiene var blitt merket med CD31 primær- og sekundærantistoff. Andre del foregikk etter at dekkglassene var ferdig montert.

- 1) Objektglassene ble lagt under lysmikroskop (Olympus BX61) med 10 x forstørrelse. Vi brukte et texas-rødt filter slik at kapillærene som var blitt merket

med rødt sekundærtantistoff lyste opp under mikroskopet. Vi fant et sted i biopsisnittene der det var lite skade og lite forurensning i merkingen. Deretter fotograferte vi denne delen av snittet og lagret bildet i en database etter FP-nr. Bildefilen ble merket med FP-nr, pre eller post og CD31.

- 2) Etter montering med DAPI la vi på ny objektglasset under mikroskopet. Vi fant frem CD31 bildet fra den aktuelle FP på en dataskjerm, og måtte med hjelp fra dette bildet finne tilbake til nøyaktig samme sted i biopsisnittet. Etter at nøyaktig samme sted var funnet, tok vi bilde med både texas-rødt filter og FITZ-filter (grønt) for å få de to andre merkingene (med hhv. antidystrofin- og SC71-antistoffene) til å lyse opp. Vi la deretter CD31-bildet og antidystrofinbildet oppå hverandre for å sikre at de avbildet nøyaktig samme sted av snittet. Også disse bildene ble lagret i en database etter FP-nr, og filene fikk navn etter FP, pre eller post og dystrofin eller MyHCII.

Telling av kapillærer og celler med ulik fibertype:

For å telle kapillærene hentet vi bildene inn i dataprogrammet TEMA (CheckVision, Hadsund, Danmark). Bildene ble hentet inn i tilfeldig rekkefølge, og under arbeidet visste vi fremdeles ikke hvilke FP som tilhørte hvilken gruppe. Se for øvrig vedlegg 2 for bilder.

Vi startet med å hente inn dystrofinbildet som viste muskelcellemembranene. Ved hjelp av en funksjon i TEMA brukte vi merkingen av cellemembranene til å lage en maske rundt muskelcellene. Masken inneholdt de cellene som skulle bli brukt i tellingen, og la grunnlaget for at TEMA senere kunne relatere kapillærer og muskelfibertype til hver enkelt muskelfiber.

TEMA ekskluderte automatisk celler som var skadet i kutting eller som var dårlig merket. I tillegg ekskluderte vi manuelt celler som i for stor grad hadde blitt kuttet i muskulaturens lengeretning, celler som lå an til arterioler eller venyler eller celler som lå an mot kanten av biopsien. I hver biopsi ønsket vi å ende opp med en maske som inneholdt over 100 celler som passet til inklusjonskriteriene. Denne masken ble automatisk tatt med videre i prosessen. De FP der biopsiene enten var skadet eller merkingen satt dårlig slik at for få celler ble godkjent, ble ikke brukt videre. Totalt ble tre FP forkastet på dette stadiet.

Etter at vi hadde laget en maske, hentet vi inn CD31-bildet som viste kapillærene og la masken over dette bildet. Vi fikk da et bilde av både muskelcellemembranene og kapillærene. Vi telte deretter kapillærer manuelt ved å klikke med musen på hver kapillær. TEMA summerte opp antall kapillærer per celle og antall kapillærer totalt for bildet. For at et merket område skulle bli telt som en kapillær ble følgende krav stilt: a) Merkingen lå i umiddelbar tilslutning til muskelcellens membran. B) Merkingen var av en viss størrelse som passet størrelsen på kapillærer. I praksis betydde dette at svært små eller svake merkinger ble forkastet som "støy" og ikke telt. Der biopsiene var kuttet slik at kapillærene kom på langs, ble disse konsekvent telt som kun én kapillær per muskelcelle den var i kontakt med.

Da denne tellingen er en subjektiv prosess, ble den utført to ganger av to ulike personer. Resultatene ble regnet som et gjennomsnitt av de to tellingene. Det ble først kontrollert at de to tellingene ikke var signifikant ulike

Til slutt hentet vi inn MyHCII-bildet og la masken over dette. TEMA skilte mellom intensiteten på SC-71 merkingen for å bestemme fibertype. Dataene vi fikk ut av TEMA var dermed muskelfibertypfordeling i prosent, muskelfiberareal av type I og type II fibre, totalt antall kapillærer, CAF, C/F-ratio, CAFA og hvordan kapillærtettheten forholdt seg til fibertypfordelingen.

Totalt ble tre FP forkastet underveis i prosessen. Altså sto vi igjen med 37 FP for statistiske vurderinger, 19 i intervensjonsgruppen og 18 i placebogruppen. Resultatene fra kapillærtellingen og fibertypetellingen ble deretter eksportert til Excel hvor videre utregninger ble gjort. Følgende parametre ble utregnet:

- Fiberareal
- Fibertypfordeling
- CAF, CAFA og C/F-ratio
- ...og disse relatert til fibertype

Som vedlegg 2 finnes bilder som er tatt ut fra TEMA og viser prosessen der kapillærer og fibertyper registreres.

Statistikk

Data fra TEMA ble direkte overført til Excel, og statistiske beregninger gjort der. Innad i hver gruppe ble endringer over treningsperioden vurderte med en to-sidig, parret T-test. Forskjeller mellom gruppene (%-endringer) ble testet med en to-sidig, uparret T-test. Ved alle analyser ble $P < 0,05$ satt som signifikansnivå. Resultatene (se også tabeller) er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik og med 95 % konfidensintervall.

RESULTATER

Det var ingen signifikante endringer i CAF, CAFA eller C/F-ratio gjennom treningsperioden, verken i intervensjonsgruppa eller placebogruppa. C/F-ratioen steg med 2,2 % [-5,4% - 9,7 %] (95 % K.I.) i intervensjonsgruppa, og sank med 1,3 % [- 8,0 % - 5,5 %] (95% K.I.) i placebogruppa.

Det var ingen statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene, verken i CAF, CAFA eller C/F-ratio i pre- eller postbiopsiene.

Det var signifikant flere kapillærer rundt fibertype I enn rundt fibertype II (CAF) både i gruppe 1 ($P = 0,00$) og i gruppe 2 ($P=0,03$) i prebiopsiene. I postbiopsiene har gruppe 1 fremdeles signifikant flere kapillærer rundt sine type I fibre enn sine type II fibre ($P= 0,00$). Forskjellen i CAF rundt de to muskelfibertypene i gruppe 2 er ikke lenger statistisk signifikant etter treningsperioden ($P=0,25$).

Sett under ett har gruppene en reduksjon i andelen fibertype I og en økning i andelen fibertype II fra prebiopsien til postbiopsien. Andelen type I-fibre synker med 6,2% [-14,4 % - 2,0 %] (95 % K.I.). Endringen er statistisk signifikant (P=0,02). Andelen type II-fibre øker med 13,0 % [3,5 % - 22,5 %] (95% K.I.). Endringen er grensesignifikant (P=0,06).

Gjennomsnittelig økning i VO_{2maks} i intervensjonsgruppa var 6 % [STD ±5]. Gjennomsnittelig økning i placebograppa var 5 % [STD ±6]. Verdiene for begge gruppene var signifikante (P=0,01).

Resultetene er under fremstilt i ulike tabeller. Forklaring i tekst under hver tabell.

Tabell 1: Resultater fra prebiopsiene

	Fibertype I		Fibertype II			Alle fibre		
	<i>CAF</i>	<i>CAFA</i>	<i>CAF</i>	<i>CAFA</i>	<i>% type II fibre</i>	<i>CAF</i>	<i>CAFA</i>	<i>C/F-ratio</i>
Gruppe 1: Vitamin C+E								
Gjennomsnitt	4.4	0.93	3.8	0.84	0.46	4.1	0.87	1.8
STD	0.91	0.21	0.95	0.21	0.12	0.88	0.20	0.42
95 % K.I.	4.0 - 4.9	0.83 - 1.03	3.4 - 4.2	0.75 - 0.93	0.41 - 0.51	3.7 - 4.5	0.78 - 0.96	1.6 - 2.0
Gruppe 2: placebo								
Gjennomsnitt	4.2	0.87	4.0	0.72	0.51	4.1	0.79	1.8
STD	0.79	0.18	0.69	0.16	0.13	0.72	0.16	0.39
95 % K.I.	3.8 - 4.5	0.79 - 0.95	3.6 - 4.3	0.65 - 0.79	0.45 - 0.57	3.8 - 4.4	0.72 - 0.86	1.6 - 2.0

Tabell 1: Oversikt over CAF, CAFA og prosent av fibertype II i prebiopsiene. C/F-ratio er regnet ut for type I- og type II-fibre samlet. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt av alle FP med standardavvik og 95 % konfidensintervall.

Tabell 2: Resultater fra postbiopsiene

	Fibertype I		Fibertype II			Alle fibre		
	CAF	CAFA	CAF	CAFA	% type II fibre	CAF	CAFA	C/F-ratio
Gruppe 1: Vitamin C+E								
Gjennomsnitt	4.4	0.88	3.8	0.83	0.50	4.1	0.84	1.8
STD	0.87	0.17	0.92	0.24	0.12	0.86	0.19	0.43
95 % K.I.	4.0 – 4.8	0.81– 0.95	3.4 – 4.2	0.72 – 0.94	0.45 – 0.55	3.8 – 4.5	0.75 – 0.93	1.6 – 2.0
Gruppe 2: placebo								
Gjennomsnitt	4.2	0.92	4.0	0.81	0.55	4.1	0.85	1.8
STD	0.66	0.34	0.91	0.55	0.10	0.76	0.45	0.40
95 % K.I.	3.9 – 4.5	0.76– 1.08	3.6 – 4.4	0.56 – 1.06	0.51 – 0.59	3.7 – 4.4	0.64 – 1.06	1.6 – 2.0

Tabell 2: Oversikt over CAF, CAFA og prosent av fibertype II i postbiopsiene. C/F-ratio er regnet ut for type I- og type II-fibrene samlet. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt av alle FP med standardavvik og 95 % konfidensintervall. C/F-ratioen er den samme som i prebiopsien, for begge gruppene.

Tabell 3: Prosentvise endringer fra prebiopsiene til postbiopsiene

	Fibertype I		Fibertype II			Alle fibre		
	CAF	CAFA	CAF	CAFA	% type II fibre	CAF	CAFA	C/F-ratio
Gruppe 1: Vitamin C+E								
Gjennomsnitt	-0.32	-1.3	2.8	1.1	11.9	1.1	-0.26	2.2
STD	12.8	25.3	16.7	29.9	27.6	13.8	27.1	16.7
T-test	0.65	0.37	0.79	0.75	0.15	0.99	0.54	0.80
95 % K.I.	-6.1 – 5.4	-12.7 – 10.1	-4.7 – 10.3	-12.3 – 14.6	-0.47 – 24.3	-5.0 – 7.3	-12.5 – 11.9	-5.4 – 9.7
Gruppe 2: placebo								
Gjennomsnitt	1.35	7.0	0.76	10.5	14.2	-0.28	7.7	-1.3
STD	13.6	35.9	14.4	57.0	32.3	12.7	46.0	14.7
T-test	0.96	0.57	0.77	0.50	0.22	0.82	0.54	0.59
95 % K.I.	- 4.9 – 7.6	-9.6 – 23.5	-5.9 – 7.4	-15.9 – 36.8	-0.73 – 29.1	-6.1 – 5.6	-13.6 – 28.9	-8.0 – 5.5

Tabell 3: Tabellen viser gjennomsnittene av de prosentvise endringene fra pre- til postbiopsiene. Alle verdier er i prosent. Vi legger merke til at endringen i CAF, CAFA og C/F-ratio for begge gruppene er svært beskjedne. To-halede uparrede T-tester er utført for å se om resultatene er statistisk signifikante, noe de ikke er.

DISKUSJON

Oppsummering av resultat

I den aktuelle studien fant vi ingen signifikant økning i kapillærtetthet i m. vastus lateralis, verken i intervensjonsgruppa eller placebograppa, etter en tolv-ukers periode med utholdenhetstrening. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Begge gruppene hadde en signifikant økning i prestasjon, målt som VO_{2maks} . Det var ikke signifikante forskjeller mellom gruppene i økning av VO_{2maks} . Begge gruppene slått sammen hadde en signifikant reduksjon i andel type I-fibre og en grensesignifikant økning i andelen type II-fibre.

Forventede endringer i placebo

Ved vurdering av resultatene er det mest overraskende funnet at vi ikke fant en signifikant økning i kapillærtetthet hos placebograppa. Flere tidligere studier har sett på økning i kapillærtetthet etter en treningsperiode (24-26). Jensen et al. så på endring i C/F-ratio i m. vastus lateralis etter en fire ukers treningsperiode, og fant en signifikant

økning (2.4 [\pm 0.1] versus 1.7 [\pm 0.1]) (24). Andre studier kan vise til resultater som alle er signifikante i samme retning (25, 26), men disse studiene er mindre sammenlignbare med den aktuelle studien på grunn av forsøkspersonenes alder og studiedesignet. Dersom vi likevel skal sammenligne vår studie med disse studiene, kunne vi forventet en økning i C/F-ratio i størrelsesorden 18-41 %, i placebograppa.

Forsøkspersonene hos Jensen et al. var seks unge, friske menn uten nevneverdig treningsbakgrunn (24). Daussin et al. brukte også elleve forsøkspersoner uten treningbakgrunn, disse var både menn og kvinner i 40-årene (25). Charifi et al. testet eldre menn i 70-årene (26), og resultatene fra denne studien blir derfor ikke like interessante for sammenligning.

Flere studier har tidligere vist at man kan forvente en høyere kapillærtetthet hos trente individer sammenlignet med utrente. Brodal et al. viste så tidlig som i 1977 at en gruppe utholdenhetstrente menn hadde høyere CAF (4,43 [\pm 0,19] hos utrente versus 5,87 [\pm 0,18] hos utholdenhetstrente), og høyere C/F-ratio (1,77 [\pm 0,10] hos utrente versus 2,49 [\pm 0,08] hos utholdenhetstrente, sammenlignet med en gruppe utrente menn i samme alder (22). I studien ble det benyttet biopsier fra m. vastus lateralis. I 2005 gjorde Zoladz et al. et lignende forsøk (23). De sammenlignet kapillærtetthet i vastus lateralis-muskulaturen til tre grupper unge menn med ulik treningsbakgrunn. Én gruppe var topprente utholdenhetsutøvere, én gruppe topprente sprintere og én gruppe utrente. Zoladz et al. fant at de to gruppene med trente studenter hadde høyere C/F-ratio enn de utrente (2,1 [\pm 0,4] versus 1,9 [\pm 0,3]), men de fant ingen signifikant forskjell mellom de to trente gruppene, på tross av en signifikant forskjell i fibertypesammensetning.

Ingen av studiene over (24-26) oppgir å ha testet tidligere utholdenhetstrente individer. Våre forsøkspersoner var derimot utholdenhetstrente. Med bakgrunn i ulik treningsbakgrunn, kunne man derfor tenke seg at individene i vår gruppe hadde en muskulatur med et annet utgangspunkt, og at de derfor ikke kunne oppnå endringer i muskulaturen i like stor grad som for eksempel gruppen testet av Jensen et al. (24). Dersom dette skulle være tilfelle, ville det blitt vanskelig å sammenligne våre forsøkspersoner med individene i tidligere utførte studier.

Dersom vi sammenligner tallene fra Brodal et al. (22) og Zoladz et al. (23) med C/F-ratioen til våre forsøkspersoner før intervensjonen, kunne vi, dersom resonnementet ovenfor skulle stemme, forvente å finne at våre forsøkspersoner hadde verdier tilsvarende de gruppene som er kategorisert som utholdenhetstrente hos Brodal et al. og Zoladz et al. Dette er imidlertid ikke tilfellet. Begge gruppene hadde en C/F-ratio før intervensjonen på 1.8, en verdi som ligger tettere opp mot de utrente gruppene hos Brodal et al. og Zoladz et al. og svært tett opp mot utgangsverdien hos Jensen et al. Dersom vi går ut i fra at metodene benyttet i de ulike studiene er sammenlignbare, har vi altså ikke grunnlag for å si at den manglende endringen i placebograppa skyldes en svært høy utgangsverdi hos våre forsøkspersoner.

Begge gruppene i den aktuelle studien hadde en signifikant økning i VO_{2maks} , noe som peker i retning av at de har hatt en klar forbedring i sin fysiske prestasjonsevne i løpet av intervensjonsperioden. Det virker logisk at dette burde gjenspeilet seg i kapillærtettheten. Siden ingen av gruppene har hatt en signifikant økning i

kapillærtetthet gjennom treningsperioden, kan det virke som utgangsnivået av kapillærtetthet i m. vastus lateralis ikke har vært noen begrensende faktor for å oppå en bedret prestasjon for våre forsøkspersoner.

Et annet interessant spørsmål blir derfor om intervensjonsperioden har vært for kort. Jensen et al. hadde en intervensjonsperiode på kun fire uker. Utgangsverdiene i denne studien var relativt like våre (se tidligere). Det virker derfor rimelig å si at en reell endring burde kunne blitt observert på tolv uker.

Et siste poeng er om metodene som er brukt i de tidligere studiene kan sammenlignes med vår metode. For denne aktuelle problemstillingen er særlig tellekriterier for kapillærer av stor betydning. Dette er nærmere kommentert under i avsnittet "Analyse av metode".

Intervensjonsgruppa

Hvis vi deretter ser på intervensjonsgruppa, er heller ikke endringen i kapillærtetthet der statistisk signifikant. Dette funnet stemmer med det som Yfanti et al. finner i sin studie, nemlig at tilskudd av antioksidanter ikke har noen effekt på adaptasjon til utholdenhetstrening (2). Yfanti et al. finner ingen forskjell mellom intervensjonsgruppen, som fikk vitamin C og E, og placebogruppen verken når det kom til verken prestasjonsparametre eller metabolske variabler. Yfanti et al. har derimot ikke sett på kapillærtetthet i muskulatur, og vi kan derfor ikke sammenligne resultatene direkte. Vi kan likevel si at resultatene går i samme retning, nemlig mot ingen forskjell.

Heller ikke Gomez-Cabrera et al. har sett på endring i kapillærtetthet i sin studie (5). Denne studien er et kombinert dyre- og menneskestudie der subjektene inntok vitamin C. Både hos mennesker og rotter økte VO_{2max} signifikant etter treningsperioden, men økningen hos intervensjonsgruppa var mindre enn økningen hos placebogruppa (11% økning hos intervensjonsgruppa versus 22% hos placebo; dog var det ikke statistisk forskjell mellom gruppene).

Ved undersøkelse av metabolske variabler hos dyrene fant Gomez-Cabrera et al. at vitamin C forhindret treningsindusert økning i cytokrom C, en markør på mitokondrielt innhold, ved å hindre treningsindusert oppregulering av PGC-1alfa. Signalveien knyttet til angiogenese (med VEGF som endeprodukt) ble ikke undersøkt. Gomez-Cabrera et al. konkluderte med at siden utholdenhetskapasitet er avhengig først og fremst av muskelcellenes oksidative kapasitet, uttrykt ved mitokondrielt innhold, vil vitamin C i store doser senke utholdenhetskapasiteten ved å redusere treningsindusert ekspresjon av transkripsjonsfaktorer som er viktige i mitokondriell biogenese. Gomez-Cabrera et al. mener derfor at vitamin C tatt som tilskudd kan fungere som en pro-oksidant in vivo.

Konklusjonen til Gomez-Cabrera et al. kan støttes av flere in vitro studier. I følge Wretman et al. vil tilskudd av antioksidanter (N-acetyl-cystein) slå av MAP-kinase-signalveien, som til vanlig blir satt i sammenheng med økt proteinsyntese og adaptasjon til trening (37). Flere andre studier har vist at tilførsel av store mengder antioksidanter ser ut til å kunne "slå av" flere cellulære antioksidantsystemer som normalt aktiveres for å skape den nødvendige redoksbalansen som er nødvendig for at kroppen skal ta seg inn etter en periode med økt oksidativt stress, som etter trening (38) (39) (40) (41).

Disse påstanden kan vi verken avkrefte eller bekrefte ved vår studie, men de kunne forklare våre funn hos intervensjonsgruppa.

Metodevurdering

Sammenlignet med tidligere studier har vår studie flere forsøkspersoner. Randomiseringen gjør gruppene sammenlignbare, men det at alder, kjønn og treningsstatus varierer innenfor gruppen vil potensielt gi svært ulike verdier innenfor gruppen, noe som kanskje vil gjøre det vanskelig å få signifikante verdier for gruppeforskjeller.

Både Jensen et al. (24), Charifi et al. (26) og Daussin et al. (25) brukte immunhistokjemisk metode og anti-CD31 for å merke kapillærer. Men de forklarer kvantifiseringen av kapillærene svært lite utdypende. Med unntak av Charifi et al., som har identifisert kapillærer etter størrelse, nevner ingen av studiene noe om inklusjonskriterier for hva de har valgt å telle som kapillærer. Antall analyserte muskelfibre varierer fra 70 hos Charifi et al. til 130 hos Jensen et al. Daussin et al. oppgir ikke hvor mange fibre de har analysert i hver biopsi. Ingen av studiene oppgir hvilke kriterier de har lagt til grunn for å inkludere muskelfibre. Dette gjør det vanskelig å sammenligne vår metode med dem som er brukt i de andre studiene, da den store usikkerheten, og potensielt unøyaktigheten, i vår metode ligger i den manuelle tellingen av kapillærene i TEMA før beregningene ble gjort i dataprogrammet. Dette er som sagt en subjektiv prosess i den forstand at man manuelt må velge hva man tolker som en kapillær. Vi forsøkte likevel å objektivisere prosessen mest mulig ved å ha klare inklusjonskriterier for hva vi tolket som en kapillær, og ved at to personer telte to ganger. Likheten mellom de to tellingene var tilfredsstillende. De andre studiene sier lite om hvordan de løste disse metodiske utfordringene. Fremtidige studier bør etterstrebe å finne en standardisert metode for kvantifisering av kapillærer.

I og med at kvantifisering av kapillærer i stor grad er subjektiv, kunne man tenkt seg at tellingen burde vært gjort etter en blindet protokoll. Dette kriteriet har ikke vi oppfylt, med tanke på at vi underveis i tellingen hadde mulighet til å finne ut om bildet vi arbeidet med var av en pre- eller post-biopsi. Det er likevel lite sannsynlig at dette har virket inn på resultatet. Alt som stemte med inklusjonskriteriene ble av to uavhengige personer telt som kapillærer, uavhengig av navn på filen. Beregningene er gjort automatisk i dataprogrammet, og er dermed ikke avhengig av blinding.

I den brukte metoden vil det alltid være en form for usikkerhet med tanke på uspesifikke merkinger. Dette forsøkte vi å unngå ved å forkaste de biopsiene som ikke hadde tydelige merkinger og ved å ha klare inklusjonskriterier.

Oppsummeringsvis er resultatene vanskelige å vurdere. Dels er dette fordi endringen i kontrollgruppen ikke er som forventet, dels fordi det foreligger et lite sammenligningsgrunnlag fra andres tidligere arbeider. Det grunnlaget som foreligger, gir ingen klarhet i hvorfor vi ikke fant den forventede endringen av kapillærtetthet i placebogruppa.

Når det gjelder intervensjonsgruppa, har tidligere resultater pekt i ulike retninger.

Man kan spørre seg hvorfor ulike studier kommer frem til ulike svar på denne problemstillingen. En generell observasjon er at det er vanskelig å vite hvordan forsøkspersonenes kosthold virker inn på resultatene, men med tanke på at redoksbalansen er et såpass komplisert system, virker det rimelig å foreslå både at mengden og sammensetningen av antioksidanter som forsøkspersonene normalt konsumerer daglig og "redoksbuffersystemer" i cellene vil være av stor betydning. Dette er derimot vanskelig å kartlegge tilfredsstillende.

Konklusjon:

Med en 12 ukers intervensjonsperiode har vi ikke holdepunkter for å si at tilskudd av antioksidanter i form av vitamin C og E har enten positiv eller negativ effekt på adaptasjon til utholdenhetstrening, bedømt på grunnlag av $VO_{2\text{maks}}$ og kapillærtetthet i muskulatur. Utfra denne studien har vi derfor ingen holdepunkter for å anbefale tilskudd av antioksidanter til verken idrettsutøvere eller den generelle befolkningen dersom formålet med tilskuddene er forbedret treningseffekt.

Etter det vi kjenner til, er det ikke tidligere gjort forsøk som ser på direkte sammenheng mellom tilskudd av antioksidanter og angiogenese i skjelettmuskulatur gjennom en periode med utholdenhetstrening. For å få mer klarhet på området trengs flere studier. Grunnleggende er det nødvendig med mer kunnskap om spesifikke cellulære signalveier som ved trening stimulerer angiogenesen – og reduserende og oksiderende stoffers innvirkning på disse signalveiene. Videre kan derfor studiedesign der man ser på hvordan antioksidanter kan påvirke disse spesifikke signalveiene, bli aktuelle, for eksempel i form av dyreforsøk der man gir tilskudd av vitamin C og E og undersøker både kapillærtetthet og ekspresjon av VEGF i muskulatur under og etter en treningsperiode. Generelt bør det utarbeides en standardisert metode som sikrer objektivitet i beregning av kapillærtetthet.

Takksigelser

Jeg vil takke Gøran Paulsen og Haakon B. Benestad for uvurderlig hjelp med denne oppgaven! En særlig takk rettes til Håvard Wiig for endeløs tålmodighet når det kommer til samspillet mellom undertegnede og diverse dataprogrammer.

Referanser

1. Rodriguez NR, DiMarco NM, Langley S. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *Journal of the American Dietetic Association*. 2009;109(3):509-27. Epub 2009/03/13.
2. Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen S, Nielsen AR, Mounier R, Mortensen OH, et al. Antioxidant supplementation does not alter endurance training adaptation. *Medicine and science in sports and exercise*. 2010;42(7):1388-95. Epub 2009/12/19.
3. Nalbant O, Toktas N, Toraman NF, Ogus C, Aydin H, Kacar C, et al. Vitamin E and aerobic exercise: effects on physical performance in older adults. *Aging clinical and experimental research*. 2009;21(2):111-21. Epub 2009/05/19.
4. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehntopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(21):8665-70. Epub 2009/05/13.
5. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(1):142-9. Epub 2008/01/08.
6. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*. 1993;25(2):218-24. Epub 1993/02/01.
7. Kuipers H. Exercise-induced muscle damage. *International journal of sports medicine*. 1994;15(3):132-5. Epub 1994/04/01.
8. Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, Starke-Reed P, Packer L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *The Journal of nutrition*. 1992;122(3 Suppl):766-73. Epub 1992/03/01.
9. Jackson MJ. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2005;360(1464):2285-91. Epub 2005/12/03.
10. Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296(1):C116-23. Epub 2008/11/14.
11. Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Molecular aspects of medicine*. 2002;23(1-3):209-85. Epub 2002/06/25.
12. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1067:425-35. Epub 2006/06/29.
13. Jackson MJ. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(9):1267-75. Epub 2009/09/15.
14. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2004;97(3):1119-28. Epub 2004/08/31.

15. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2011;110(1):264-74. Epub 2010/10/30.
16. Fitzsimons DP, Diffie GM, Herrick RE, Baldwin KM. Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 1990;68(5):1950-5. Epub 1990/05/01.
17. Andersen P, Saltin B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *The Journal of physiology*. 1985;366:233-49. Epub 1985/09/01.
18. Cotter M, Hudlicka O, Vrbova G. Growth of capillaries during long-term activity in skeletal muscle. *Bibliotheca anatomica*. 1973;11:395-8. Epub 1973/01/01.
19. Pette D, Smith ME, Staudte HW, Vrbova G. Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1973;338(3):257-72. Epub 1973/02/06.
20. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(5):C1342-8. Epub 2004/07/16.
21. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(5):H1668-78. Epub 2003/01/25.
22. Brodal P, Ingjer F, Hermansen L. Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. *The American journal of physiology*. 1977;232(6):H705-12. Epub 1977/06/01.
23. Zoladz JA, Semik D, Zawadowska B, Majerczak J, Karasinski J, Kolodziejcki L, et al. Capillary density and capillary-to-fibre ratio in vastus lateralis muscle of untrained and trained men. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2005;43(1):11-7. Epub 2005/05/06.
24. Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2004;557(Pt 2):571-82. Epub 2004/03/17.
25. Daussin FN, Zoll J, Dufour SP, Ponsot E, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, et al. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(1):R264-72. Epub 2008/04/18.
26. Charifi N, Kadi F, Feasson L, Costes F, Geysant A, Denis C. Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *The Journal of physiology*. 2004;554(Pt 2):559-69. Epub 2003/10/28.
27. Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, Greene AS. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation* (New York, NY : 1994). 2001;8(1):57-67. Epub 2001/04/12.
28. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, et al. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):5096-103. Epub 2000/02/15.
29. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-

- dependent. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(43):31047-54. Epub 1999/10/16.
30. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 1996;81(1):355-61. Epub 1996/07/01.
31. Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *The American journal of physiology*. 1999;276(2 Pt 2):H679-85. Epub 1999/02/10.
32. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5. Epub 1992/10/29.
33. Gavin TP. Basal and exercise-induced regulation of skeletal muscle capillarization. *Exercise and sport sciences reviews*. 2009;37(2):86-92. Epub 2009/03/24.
34. Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature*. 2008;451(7181):1008-12. Epub 2008/02/22.
35. Chinsomboon J, Ruas J, Gupta RK, Thom R, Shoag J, Rowe GC, et al. The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(50):21401-6. Epub 2009/12/08.
36. Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, et al. PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(3):C572-9. Epub 2009/12/25.
37. Wretman C, Lionikas A, Widegren U, Lannergren J, Westerblad H, Henriksson J. Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2001;535(Pt 1):155-64. Epub 2001/08/17.
38. Jackson MJ, Khassaf M, Vasilaki A, McArdle F, McArdle A. Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1031:158-68. Epub 2005/03/09.
39. Fehrenbach E, Niess AM. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise immunology review*. 1999;5:57-77. Epub 1999/10/16.
40. Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2009;39(8):643-62. Epub 2009/09/23.
41. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exercise immunology review*. 1999;5:22-56. Epub 1999/10/16.