

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

På bakgrunn av min idrettskarriere, kombinert med utdanning innen biologi og kjemi, søkte jeg om å få skrive min masteroppgave i biokjemi ved Norges idrettshøgskole (NIH). På laboratoriet på idrettshøgskolen, hvor jeg jobbet med antioksidanters påvirkning på utholdenhetskapasitet i musklene, møtte jeg mange utfordringer. Kombinasjonen biokjemi og idrettsprestasjon var utrolig lærerik og morsom å jobbe med. Antioksidanttilskudd for å heve idrettsprestasjoner er et tema som har vært mye i fokus, og som ikke er et ferdigutviklet forskningsområde. Derfor var det utrolig spennende å kunne jobbe og bidra innenfor dette feltet.

Laboratoriearbeidet ble utført ved seksjon for fysisk prestasjonsevne, NIH, Oslo, høst og vår 2011/2012. Uten hjelp hadde ikke oppgaven vært lett å gjennomføre, derfor vil jeg først takke mine veiledere:

- Professor Tor Lea, for praktiske tips, spesielt med skriving og struktur av oppgaven.
- Postdoktor Gøran Paulsen, for retting av oppgaven, og besvarelse av mine mangfoldige spørsmål.
- Professor Truls Raastad, for god veiledning i forkant av- og under arbeidsperioden.

Deretter vil jeg takke Ingrid Ugelstad, overingeniør på immunologilaboratoriet på NIH, for hjelp til protokoller og arbeidsutførelse på laboratoriet. Takk til alle som tok del i opplæringen min på laboratoriet; Christoffer, Camilla, Håvard og Hege for alle gode råd, tips, hjelp og støtte hele veien!

Til slutt, takk til mamma og pappa og min kusine Kathleen som tok seg bryet med å lese gjennom oppgaven, og min kjæreste Steffen som ga meg den beste støtten etter lange laboratedager og skrivekvelder!

Ås, 14. mai 2012.

Charlotte Buer

Sammendrag

Bakgrunn: Produsenter av antioksidanttilskudd har lenge hevdet at toppidrettsutøvere bør ta slike tilskudd for å bedre prestasjon, samt å øke helsegevinstene i forbindelse med utholdenhetstrening. De underliggende mekanismene og dokumentasjonene for disse påstandene er imidlertid uklare. Som en følge av utholdenhetstrening øker mitokondriekapasiteten, og dette medfører økt nivå av enzymer som er delaktig i regenerering av energi (ATP) og proteinsyntese. Antioksidanter har i noen studier imidlertid vist seg å hemme treningsindusert oppregulering av mitokondriekapasitet. To viktige enzymer i mitokondriene er HSP60 og COX4.

Formål: Formålet med studien har vært å undersøke om tilskudd av antioksidanter påvirket tilpasningsresponsen (nivå av COX4 og HSP60) i muskelen som følge av utholdenhetstrening.

Metode: På forhånd relativt godt trente forsøkspersoner (♀=24, ♂=29) ble randomisert inn i fire grupper, med jevn kjønnsfordeling. Intervensjonsperioden besto av 12 ukers utholdenhetstrening (intervall- og langkjøring, løping) med tilskudd av antioksidanter; C- og E-vitaminer (n=15), Smartfish (n=10), astaxanthin (n=12), og placebo (n=16). Membranfraksjon av vevsprøver fra *m. vastus lateralis* ble brukt til immunoblot av COX4 og HSP60. For å undersøke effekten av antioksidanttilskudd på aerob kapasitet, ble VO_{2maks} målt.

Statistikk: Det ble utført parete og uparete t-tester, i tillegg til Kruskal-Wallis test og korrelasjonstester (Pearson). Testene ble ansett som signifikant ved en p-verdi $\leq 0,05$, og som en tendens ved $0,10 \geq p > 0,05$. Beregninger ble utført i Excel og Prism5.

Resultater: I løpet av treningsperioden med antioksidanttilskudd økte proteinnivå av COX4 i placebogruppen (61 %), men ble redusert i gruppen med C- og E-vitamintilskudd (-19 %). Det var en tendens til økning (gjennomsnittlig på 6 %) i nivå av HSP60 når alle gruppene var samlet. Det var ingen andre signifikante endringer for COX4 og HSP60. Trening økte også VO_{2maks} i alle gruppene (gjennomsnittlig økning på 6,8 %), men det var ingen forskjeller mellom placebogruppen og gruppene med antioksidanttilskudd.

Konklusjon: Utholdenhetstrening økte som forventet proteinnivå av COX4, men tilskudd av C- og E-vitaminer syntes å hemme denne oppreguleringen. Det så ikke ut til at utholdenhetstreningen, med eller uten antioksidanttilskudd, hadde stor påvirkning på nivåene av HSP60. Utholdenhetstrening ga en forventet økning i VO_{2maks} , men antioksidanttilskuddene påvirket ikke denne økningen.

Abstract

Background: Manufacturers of antioxidant supplements have long argued that athletes should take antioxidant supplements to improve performance and to provide health benefits. The underlying mechanisms and documentations of these claims is however unclear. Endurance training increases mitochondrial capacity, and this leads to increased levels of enzymes that are involved in the regeneration of energy (ATP) and protein synthesis. Antioxidants have in some studies been shown to inhibit the exercise-induced up regulation of mitochondrial capacity. Two important enzymes in mitochondria are HSP60 and COX4.

Objective: The aim of this study was to investigate whether supplementation of antioxidants influence exercise-induced adaptation in muscles after a period of endurance training.

Method: Relatively well-trained subjects ($\text{♀}=24$, $\text{♂}=29$) were randomized into 4 groups with an equal distribution of gender. The intervention period included 12 weeks of endurance training (interval and long distance running) with supplements of; C- and E-vitamins (n=15), Smartfish (n=10), astaxanthin (n=12), or placebo (n=16). The membrane fraction of tissue samples from *M. vastus lateralis* were used for immunoblot analysis with antibodies for COX4 and HSP60. $\text{VO}_{2\text{max}}$ was measured to investigate the effects of antioxidant supplementation on aerobic power.

Statistics: There were performed paired and unpaired t-tests, in addition to Kruskal-Wallis test and correlation tests (Pearson). The tests were considered significant at a p-value < 0.05 , and as a tendency at $0.10 > p > 0.05$. Calculations were performed in Excel and Prism5.

Results: The endurance training program and the antioxidant supplements led to an increased protein content of COX4 in the placebo group (61 %), but a reduced content in the group with supplementation of C- and E-vitamins (-19 %). There was a tendency of an increased amount of HSP60 (average of 6 %) when the groups were collapsed, regardless of antioxidant supplements. Training increased $\text{VO}_{2\text{max}}$ in all groups (6.8 %), with no differences between the placebo group and the groups with antioxidant supplements.

Conclusion: As expected, endurance training increased the protein level of COX4, but supplements of C- and E-vitamins appeared to inhibit this up regulation. It did not seem that endurance training, with or without supplements of antioxidants influenced the levels of HSP60. Endurance training resulted in an expected increase in $\text{VO}_{2\text{max}}$, and the antioxidant supplements did not affect this increase.

Forkortelser

Forkortelser	Navn
ATP	Adenosintrifosfat
COX	Cytokrom c oksidase
HSP	Varmesjokkprotein/stressprotein
IgG	Immunoglobulin, klasse G
kDa	Kilo Dalton
NAD	Nikotinadenindinukleotid
NRF	Kjerne-respirasjonsfaktor
PGC-1 α	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1 α
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROI	Område av interesse
RONS	Reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS (-T)	Trisbufret saltvann (-Tween 20)
VO _{2maks}	Maks volum av oksygen

Innhold

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
Bakgrunn og teori	1
1.1 Mitokondrier og deres funksjon	1
1.1.1 COX-komplekset (cytokrom c oksidasekomplekset)	3
1.1.2 COX4	4
1.2 Utholdenhet og VO _{2maks}	6
1.3 Utholdenhetsarbeid kan føre til dannelsen av reaktive forbindelser	6
1.3.1 Stressproteiner – en forsvarsmekanisme mot reaktive forbindelser.....	8
1.3.2 HSP60	9
1.4 Antioksidanter, funksjon og trening	9
1.4.1 Vitamin C (askorbinsyre).....	11
1.4.2 Vitamin E (α-tokoferol).....	12
1.4.3 Smartfish	13
1.4.4 Astaxanthin.....	13
1.5 Problemstilling.....	14
2. Materialer og metode	16
2.1 Krav til forsøkspersonene	16
2.2 Tilskudd av antioksidanter.....	16
2.3 Treningsprotokollen.....	17
2.4 VO _{2maks} -test.....	17
2.5 Vevsprøver.....	18
2.6 Bakgrunnsinformasjon om forsøkspersoner	18
2.7 Laboratorieprotokoller.....	18
2.7.1 Homogenisering og ekstraksjon	18
2.7.2 Måling av proteinkonsentrasjoner i vevsprøvene	19
2.7.3 Elektroforese	19
2.7.4 Blotting	19

2.7.5 Inkubering med antistoffer	19
2.7.6 Bildefremkalling	20
2.8 Sensitivitet i metoden	20
2.9 Reproduserbarhet i metoden	21
2.10 Tolkning av resultater	22
2.11 Statistikk	22
3 Resultater	23
3.1 Endringer i VO_{2maks}	23
3.2 Immunoblotting (Western blot) av COX4 og HSP60	24
3.2.1 Endringer i proteinnivå av COX4 basert på netto lysintensitet	25
3.2.2 Endringer i proteinnivå av HSP60 basert på netto lysintensitet	27
3.2.3 Prosentvise endringer i proteinnivå av COX4 og HSP60	28
3.2.4 Korrelasjoner mellom endringer i proteinnivå av COX4 og HSP60	29
3.3 Samlede endringer i VO_{2maks} , og i proteinnivå av HSP60	30
4 Diskusjon	31
4.2 Endringer i proteinnivå av COX4 som følge av utholdenhetstrening	31
4.2.1 Effekt av antioksidanttilskudd på nivå av COX4	32
4.3 Endringer i proteinnivå av HSP60 som følge av utholdenhetstrening	33
4.3.1 Effekt av antioksidanttilskudd på nivå av HSP60	34
4.4 Endringer i VO_{2maks} som følge av utholdenhetstrening	36
4.4.1 Effekt av antioksidanttilskudd på VO_{2maks}	37
4.5 Utdrøinger med studien	38
4.6 Videre forskning	39
5 Konklusjon	41
Referanser	42
Vedlegg	57
Vedlegg 1: Dosering av antioksidant- og placebotilskudd	58
Vedlegg 2: Borgs skala	59
Vedlegg 3: Bergstrøms nåltekknikk	60
Vedlegg 4: Protokoll for Western blot	61
Vedlegg 5: Beregningsark for volum av prøver og buffere	69
Vedlegg 6: Tabell over prosentvise endringer i VO_{2maks} , COX4 og HSP60	70

Bakgrunn og teori

Flere idrettsutøvere tar antioksidanttilskudd med den hensikt å forebygge den antatt negative effekten av treningsindusert oksidativt stress, påskynde restitusjonstiden og forbedre prestasjonen (Maughan et al. 2007; Peternej & Coombes 2011). Flere studier har imidlertid vist at antioksidanttilskudd ikke bedrer treningsprestasjon (Bryant et al. 2003; Gaeini et al. 2006; Patil et al. 2009; Yfanti et al. 2010; Zoppi et al. 2006), og at de til og med kan ha negative effekter på helse og på treningsrespons (Gomez-Cabrera et al. 2008a; Ristow et al. 2009; Ristow & Zarse 2010; Strobel et al. 2011).

For å diskutere hvordan antioksidanter kan påvirke treningsinduserte responser, er det nødvendig å ha kunnskap om de biologiske prosessene i organismen, samt kunnskap om antioksidanter og deres funksjon.

1.1 Mitokondrier og deres funksjon

Antall mitokondrier i en muskelcelle påvirkes av muskelfibertypen og treningsstatusen til muskelen, men innenfor cellen lokaliserer mitokondriene seg i nærheten av et område hvor forbruket av energi er høyt (Alberts 2004; Åstrand & Rodahl 2003). Mitokondriene varierer i mengde etter muskelcellenes behov for oksidativ metabolisme (Dahl 2008). I en skjellettmuskelcelle, som ofte utsettes for utholdenhetstrening, vil antallet av mitokondrier kunne femdobles (Alberts 2004). Dette fører til at hvert gram muskelvev får større kapasitet for oksygenforbruk (Hood 2001). Økningen av mitokondrier og mitokondrielle proteiner blir kalt mitokondriell biogenese, og er en sentral tilpasning til utholdenhetstrening i muskulaturen som trenes (Hood et al. 2003; Hood & Saleem 2007; Ljubicic et al. 2010).

Mitokondriene inneholder en ytre membran og en indre membran, hvorav det intermembrane området ligger mellom disse (Alberts 2004; Mathews et al. 2000). Rommet innenfor den indre membranen, kalles for matriks (ibid).

I nesten alle én- eller flercellede organismer og mikroorganismer finnes mitokondriene, og de står for konsumering av over 90 % molekylært oksygen som blir utnyttet til energiomsetning (Alberts 2004; Dahl 2008; Mathews et al. 2000). Dette er i form av aerob energiomsetning

hvor energien fra for eksempel glukosemolekyler, som er den primære energikilden, overføres til adenosintrifosfat (ATP) (ibid).

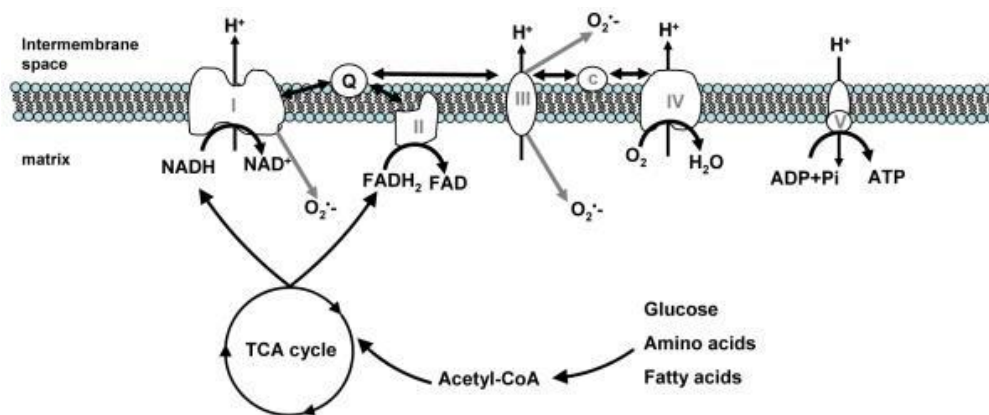
Molekyler i form av fettsyrer, aminosyrer og pyruvat, fra henholdsvis fett, proteiner og karbohydrater i kosten, passerer den indre mitokondriemembranen, og omdannes til acetylkoenzym A som inngår i en trikarboksylsyresyklus (TCA syklus) som finner sted i matriksen (Alberts 2004; Mathews et al. 2000). Acetylgruppene fra acetylkoenzym A blir oksidert, og karbonatomene blir skilt ut i form av karbondioksid (ibid).

Fra hvert molekyl av glukose som blir brutt ned i mitokondriene, blir det dannet 36 ATP-molekyler i en prosess kalt oksidativ fosforylering (Dahl 2008; Raven & Johnson 2002). Mathews et al. (2000) beskriver oksidativ fosforylering som en respirasjonskjede der det foregår elektrontransport som følge av respirasjon. Respirasjon i metabolsk sammenheng, er prosessen hvor cellulær energi dannes gjennom oksidasjon av molekyler fra næringsstoffer i maten. Oksygen er den siste elektronmottakeren i respirasjonen (ibid). Som en følge av oksidasjon, skjer det en overføring av energirike elektroner, som bruker NADH og FADH₂ som elektronbærere (Alberts 2004; Mathews et al. 2000). Elektronene transporteres til den indre membranen hvor elektrontransportkjeden/respirasjonskjeden foregår (ibid).

Elektrontransportkjeden sørger for at elektroner blir overført til oksygen, og er en del av en metabolsk reaksjonsvei som katalyseres av enzymkomplekser (Alberts 2004; Dahl 2008; Mathews et al. 2000). Muskelcellenes evne til å regenerere ATP øker som respons på utholdenhetstrening fordi enzymaktiviteten i alle ledd av energimetabolismen øker (Dahl 2008).

Fem enzymkomplekser inngår i respirasjonskjeden, hvorav det siste komplekset regenererer ATP gjennom oksidativ fosforylering (Campbell 1991; Lanza & Sreekumaran Nair 2010; Mathews et al. 2000). Tre av enzymkompleksene bidrar til å skape en protongradient over membranen; NADH dehydrogenasekomplekset (I), cytokrom b-c₁ komplekset (III), og cytokrom c oksidasekomplekset (IV) (ibid) (figur 1). Kompleks IV vil heretter bli kalt COX-komplekset. De tre multienzymkompleksene pumper protoner fra matriksen, over den indre membranen, og til det intermembrane område (Alberts 2004; Mathews et al. 2000). Imens blir elektroner fra NADH og FADH₂ transportert rundt i den indre membranen via enzymkompleksene (ibid). Når NADH donerer et hydridion (H⁻) til elektrontransportkjeden, er selve transporten i gang, og av denne reaksjonen skapes et proton (H⁺) og to elektroner. Det

er (I) som tar imot elektronene fra spaltingen av NADH til NAD^+ (Alberts 2004; Campbell 1991; Mathews et al. 2000). Elektronene som blir transportert i membranen, mister energi på veien (Alberts 2004). Når elektronene til slutt når COX-komplekset, reagerer de med oksygen som binder til seg hydrogen og danner vann (Alberts 2004; Dahl 2005; Mathews et al. 2000). Dette steget krever nesten alt av oksygen som blir inhalert (Alberts 2004). Lekkasje av elektroner i elektrontransportkjeden, kan føre til at det dannes reaktive forbindelser som kan være skadelige for cellen (omtales mer i kapittel 1.3) (Mathews et al. 2000; Sachdev & Davies 2008).



Figur 1. Respirasjonsskjeden og oksidativ fosforylering. Acetyl-CoA nedbrutt fra glukose, aminosyrer og fettsyrer, blir fraktet fra glykolysen inn i TCA syklusen, hvor elektronbærerne NADH, og FADH_2 går over til henholdsvis kompleks I og II. Videre følger trinnene i de respektive kompleksene. Nedbrytningen av næringsstoffene er komplett når oksygen i kompleks IV (COX-komplekset) blir redusert til vann, og ADP i kompleks V blir fosforylert, og det dannes ATP, som er energi tilgjengelig for cellen (Lanza & Sreekumaran Nair 2010).

COX-komplekset er et av fokusområdene i denne masteroppgaven, og skal derfor presenteres ytterligere.

1.1.1 COX-komplekset (cytokrom c oksidasekomplekset)

Nesten alt oksygen som inhaleres blir til slutt overført til det aktive setet til COX-komplekset (Alberts 2004). COX-komplekset mottar elektroner fra cytokrom c proteiner (Ljubicic et al. 2010; Mathews et al. 2000) (figur 1 merket med en c). Når elektronene blir tilført, doneres de videre til oksygen som blir redusert (O_2^-), og som øyeblikkelig reagerer med to hydrogenmolekyler (2H^+) og danner vann (H_2O) (Alberts 2004; Mathews et al. 2000). Hvis

ikke oksygenet blir fullstendig redusert, vil det dannes reaktive oksygenforbindelser (Williams et al. 2006). Mitokondriene har blitt sett på som hovedkilden til dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (Kohen & Nyska 2002). Fraksjonen av oksygen som blir transformert til reaktive oksygenforbindelser har imidlertid blitt målt til både ~0,15 % (St-Pierre et al. 2002) og 2-5 % (Boveris & Chance 1972; Boveris & Chance 1973) av det totalet konsumet av oksygen (VO_2). COX-komplekset spiller en meget viktig rolle ved at det hindrer reaktive oksygenforbindelser å komme fritt ut i cellen, og heller overfører de fleste av oksygenmolekylene til vann (Locke Marius 2002).

Det er 13 forskjellige polypeptider som danner COX-komplekset i mitokondriene til pattedyr (Grossman & Lomax 1997; Poyton et al. 1988; Zhang & Capaldi 1988). Tre underenheter av komplekset kodes av mitokondriets eget DNA, og disse spiller en rolle blant annet i protonpumping (reduksjon- oksidasjonsreaksjoner). De ti andre delene av COX-komplekset er kodet av cellekjernens DNA, de spiller en rolle i enzymaktivitet, og muligens i syntetisering av hele komplekset (ibid). Det har vist seg at forholdet ATP/ADP regulerer aktiviteten til COX-komplekset, hvorav binding av ADP stimulerer til aktivitet (ATP hemmer) (Arnold & Kadenbach 1999). Muskelarbeid forårsaker en voldsom økning i forbruk av ATP, som gjør at ADP-nivået blir høyt (Atherton et al. 2005).

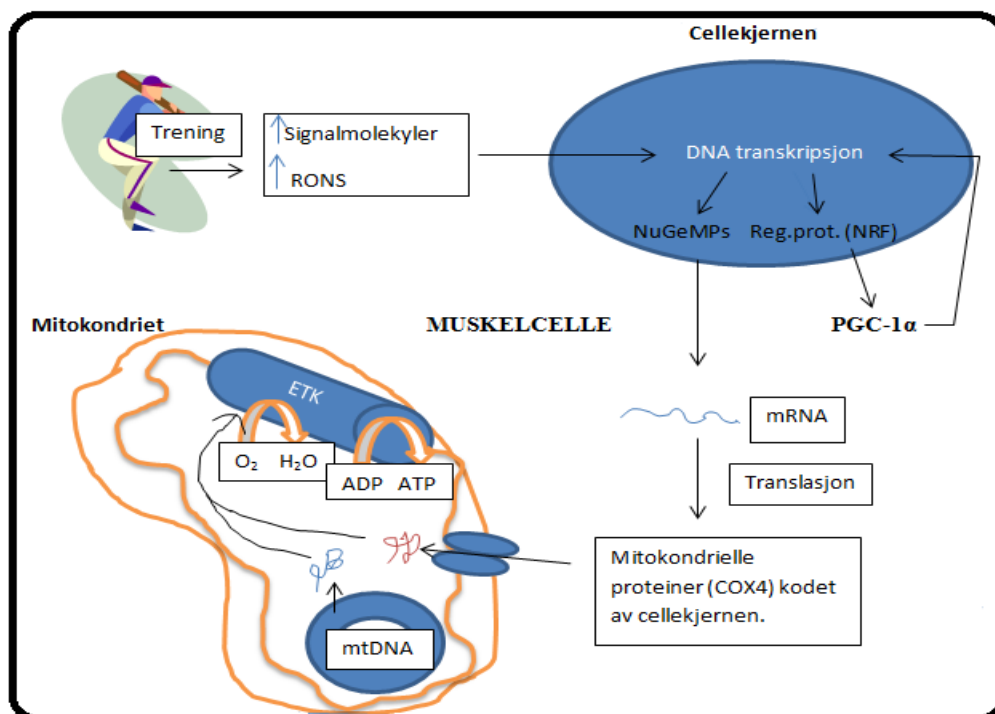
Proteiner som inngår i COX-komplekset blir brukt som markører for mitokondriell biogenese (Gordon et al. 2001). Cytokrom c oksidase 4 (COX4) analyseres i denne masteroppgaven, og har tidligere blitt brukt som en markør for mitokondriell oksidativ kapasitet i muskelen (Bengtsson et al. 2001).

1.1.2 COX4

COX4 er den største enheten i COX-komplekset som er kodet av cellekjernen (Grossman & Lomax 1997; Hüttemann et al. 2001). I den indre mitokondriemembranen har COX4 som funksjon å delta i katalyseringen av det siste leddet i elektronoverføringen i respirasjonskjeden (Campbell 1991; Grossman & Lomax 1997; Hüttemann et al. 2001; Mathews et al. 2000). Tidligere studier har vist at COX4 virker som en sensor for ATP/ADP ratio ved å binde adeninnukleotider (Arnold & Kadenbach 1999; Napiwotzki & Kadenbach 1998), som dermed tyder på at enzymaktiviteten av COX4 er regulert av energikravet til cellen (Hüttemann et al. 2001).

COX4, samt andre enheter av COX som er kodet av cellekjernens DNA, er funnet i alle vev i en organisme, selv om mengde mRNA for hver enhet varierer fra vev til vev (Lenka et al. 1998). I hjerte- og skjelettmuskulatur hvor energikravet er stort, har genene som koder for COX4 sterkest uttrykk (Virbasius & Scarpulla 1990). COX4 har flere isoformer i pattedyr, og tilsvarer COX 5 a og b i gjær hvor funksjonen varierer med konsentrasjonen av oksygen (Hüttemann et al. 2001).

I vår studie har endring i nivå av COX4 blitt brukt som en indikasjon på mitokondriell biogense. Som en følge av trening, spesielt aerob utholdenhetstrening, vil mitokondriell biogense øke (Hood & Saleem 2007; Ljubicic et al. 2010) (figur 2). Studier på rottehjerne (Zhang et al. 2012) og rottemuskulatur (Gordon et al. 2001), samt studier på menneskers mRNA-nivå (Cochran et al. 2010) og proteinnivå (Bengtsson et al. 2001; Little et al. 2010) har vist at trening medfører en økning i nivå av COX4.



Figur 2. Trening fører til en økning av signalmolekyler og reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser (RONS). Dette fører til translokasjon av PGC-1α fra cytosol til kjerne, som videre oppregulerer regulatoriske proteiner (reg.prot.), som for eksempel NRF, og kjernegener som koder for mitokondrielle proteiner (NuGeMPs). Oppregulering av NuGeMPs fører til en økning av mitokondrielle proteiner (COX4 blant andre), som fraktes inn i mitokondriet til elektrontransportkjeden (ETK).

NRF (kjerne-respirasjonsfaktor) er en transkripsjonsfaktor som regulerer COX4 (Ljubicic et al. 2010; Nancy J 1995; Scarpulla 2002; Virbasius & Scarpulla 1990), og har blitt antatt å medvirke i reguleringen av alle de kjernekodete enhetene av COX (Ljubicic et al. 2010; Scarpulla 2002). NRF blir oppregulert som respons på utholdenhetstrening (Ljubicic et al. 2010). PGC-1 α (peroksisom proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1 α) er et protein som virker som en koaktivator, og som spiller en viktig rolle i aktiveringen av NRF (Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999). En aktivering av PGC-1 α (translokasjon fra cytosol til kjerne) forbindes med en økning i mitokondriell biogenese (Little et al. 2010; Wright et al. 2007; Wu et al. 1999) (figur 2).

1.2 Utholdenhet og VO_{2maks}

Utholdenhet er definert som organismens evne til å arbeide med en relativ høy intensitet over lengre tid (McArdle et al. 2007). VO_{2maks} er et mål på organismens maksimale evne til å ta opp, transportere og utnytte oksygen per tidsenhet under et muskelarbeid (aerob regenerering av ATP) og måles i liter per minutt (l/min) eller milliliter per kilogram kroppsvekt per minutt (ml/kg/min) (Bassett & Howley 1997; Wagner 1996). VO_{2maks} kan relateres til mitokondriekapasitet, men når intensiteten på treningen blir så høy at VO_{2maks} oppnås, er det flere faktorer, spesielt transport av oksygen fra blod til muskler, som virker begrensende (Bassett & Howley 1997; Bassett & Howley 2000; Hill & Lupton 1923; Poole & Richardson 1997). Begrensningen av VO_{2maks} er fordelt på flere funksjonelle parametere som inngår i respirasjonssystemet, som partialtrykk av O₂ (pO₂), O₂-hemoglobin dissosiasjon, O₂ bindingshastighet, hjertefrekvens, kapillærtransport, og hastighet av mitokondrielt oksygenforbruk som en funksjon av ATP-regenerering (Dahl 2005; Hoppeler & Weibel 2000).

1.3 Utholdenhetsarbeid kan føre til dannelsen av reaktive forbindelser

Under en treningsøkt kan oksygenopptaket øke 20 ganger utover hvilenivå (Sen 1995). Denne økningen utgjør en 200 ganger økning (utover hvilenivå) av oksygenopptak i mitokondriene til de aktive musklene (Khassaf et al. 2003; Sen 1995). Under aerobe anstrengelser vil det dannes reaktive forbindelser i muskelcellene, og det er muligheter for at det oppstår et

oksidativt stress i kroppen (McArdle & Jackson 2000; McArdle et al. 2001; Niess & Simon 2007). Hvis det oksidative stresset blir for stort, kan det skade musklene ved å gjøre skade på cellestrukturen (lipider, membraner, proteiner, og DNA) (Halliwell 1994; Zoppi et al. 2006). Begrepet "oksidativt stress" ble omtalt allerede i 1978 av Dillard (1978) etter at det ble målt nivå av oksiderte fettsyrer (fettperoksidering) i utåndingsluften til personer, og i rottevev som følge av trening. Oksidativt stress har blitt beskrevet som når cellens homeostase (indre likevekt) er i ubalanse som en følge av at nivået av oksidanter overgår nivået av antioksidanter (Packer 1997; Sies 1991; Williams et al. 2006). Når jeg bruker begrepet oksidativt stress videre i denne oppgaven, refererer jeg til stress forårsaket både av nitrogen- og oksygenforbindelser.

Det er hovedsakelig superoksid og nitrogenoksid som dannes etter et muskelarbeid (Close & Jackson 2008; Patwell et al. 2004), og de hører til under fellesbetegnelsen RONS (reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser) (Powers & Jackson 2008; Yfanti et al. 2010). Både superoksid og nitrogenoksid er frie radikaler som er forløpere for andre reaktive forbindelser, som for eksempel hydrogenperoksid (H_2O_2), hydroksylradikaler (OH^\cdot) eller peroksinitritt, ($ONOO^\cdot$) (Close et al. 2005; Mathews et al. 2000; Vasilaki et al. 2006). Frie radikaler som RONS har ett eller flere uparede elektroner i sin ytre orbital (Alberts 2004; Dahl 2008). Forbindelser med uparede elektroner er kritiske for cellen fordi de lett kan ta opp elektroner fra andre forbindelser, og dermed danne flere reaktive forbindelser som kan oksidere og ødelegge membraner, proteiner og DNA (ibid). Det er atomet i sentrum som avgjør hvilket radikal det er, for eksempel en forbindelse med oksygen i sentrum og et uparet elektron i ytre orbital, utgjør et reaktivt oksygen-sentrert radikal (Karlsson 1997; Powers & Jackson 2008). Reaktive forbindelser har blant annet blitt sett på som en faktor til aldriingsprosessen i kroppen (Shigenaga et al. 1994). Skade fra RONS kan begrenses med cellenes egne forsvarsmekanismer og ved tilførsel av antioksidanter (Dahl 2008; Jackson 1987; Sastre et al. 1992).

I mange tilfeller kan RONS være nødvendige for cellene. I oversiktsartikkelen til Peternelj og Coombes (2011) presenteres flere studier som har vist at RONS er nødvendige for cellene i flere sammenhenger, blant annet i forbindelse med trening, hvor de trengs for å oppnå optimal muskelsammentrekning (Jackson 2008; Reid et al. 1993). Som en følge av trening, kan cellene tilpasse seg økningen av RONS ved at de blir mer resistente mot de skadelige

effektene som oppstår av oksidativt stress (Jackson et al. 2004; Niess & Simon 2007). Tilpasninger til treningsindusert RONS går ut på å oppregulere gener som styrer reduksjons- oksidasjonspotensialet (redokspotensialet) og antioksidantnivået i cellene (Gomez-Cabrera et al. 2008b; Ristow et al. 2009; Valko et al. 2007). Treningsindusert RONS har også vist seg å øke enzymaktivitet (Chang et al. 2007; Knez et al. 2007), stimulere til proteinturnover (utbytting av proteiner) (Pikosky et al. 2006), forbedre DNA-reparasjonssystemer (Okamura K et al. 1997; Radák et al. 2003), og øke mitokondriell biogenese (figur 2) (Gomez-Cabrera et al. 2008a; Ljubicic et al. 2010). Gomez-Cabrera et al. (2008b) mente at trening var en så sterk bidragsyter til oppregulering av egenproduserte antioksidanter at trening i seg selv kunne regnes som en antioksidant (mer om antioksidanter i kapittel 1.4).

En viktig del av treningsinduserte tilpasninger, er økning av stressproteiner i musklene (Fischer et al. 2006; Jackson et al. 2004; Khassaf et al. 2003), og denne tilpasningsresponsen som følge av trening utdypes under.

1.3.1 Stressproteiner – en forsvarsmekanisme mot reaktive forbindelser

Stressproteiner er en gruppe proteiner som kan beskytte en celle mot forandringer i cellen selv og i omgivelsene til cellen (Dahl 2005; Feige 1996). Forandringer i omgivelsene kan skade cellen hvis de ikke blir korrigert for. Noen stressproteiner finnes normalt i cellene, mens andre blir dannet som respons på at cellen blir utsatt for stress (ibid). Oksidering av muskelproteiner har vist seg å virke som signaler for uttrykk av enkelte stressproteiner og beskyttende enzymer (Locke Marius 2002; Morton et al. 2009c; Ornatsky et al. 1995; Takahashi et al. 1998). I muskler er det stort sett fibertyper med mange mitokondrier og høy oksidativ metabolisme som er utsatt for celledskade fra reaktive oksygenforbindelser (Dahl 2005). Muskler som aktiveres under utholdenhetstrening, har tilpasset seg et økt nivå av stress ved å øke innhold av stressproteiner i muskelcellene (Khassaf et al. 2001; Morton et al. 2009c).

Stressproteiner spiller vitale roller for cellens levedyktighet, blant annet fordi de inngår i mitokondriell biogenese (Locke Marius 2002; Morton et al. 2008). For å få en korrekt folding og translokasjon av nylige syntetiserte proteiner, er stressproteiner nødvendige (Jackson et al. 2004). Stressproteiner beskytter mot oksidativt stress som oppstår i muskelvev under trening, samt forebygger skade og opprettholder homeostase av oksidantnivået i cellene (Marber et al. 1995; Morton et al. 2009c; Pösö et al. 2002).

Høy treningsintensitet har blitt relatert til en økning av stressproteiner (Liu et al. 2000). I studien til Liu et al. (2000) ble det observert en økning av stressproteiner i samsvar med en økning av intensiteten, men da intensiteten avtok, til tross for at varigheten var lik, ble det ikke observert samme økning.

Stressproteiner blir også kalt varmesjokkproteiner av engelsk “Heat Shock Proteins” (HSPs). Klassifiseringen av stressproteiner er basert på deres molekylvekt i kiloDalton (kDa) (Morton et al. 2009c). HSP60 analyseres i denne masteroppgaven.

1.3.2 HSP60

HSP60 inngår i folding, sammensetning og stabilisering av nylige syntetiserte proteiner, og hjelper til med å transportere disse proteinene fra cytosol, og inn i mitokondriet (Karlin & Brocchieri 2000; Locke Marius 2002; Morton et al. 2009c). HSP60 hindrer også celledød (Gupta & Knowlton 2002), samt forebygger oksidativt stress i cellen (Karlin & Brocchieri 2000). Strukturelt sett er proteinet et oligomer på 60 kDa, hvorav hver monomer former en struktur bestående av tre domener med forskjellige funksjoner (ibid). Fordeling og aktivitet av HSP60 i cellen er hovedsakelig i mitokondriene (~80 %), men noe foreligger også i cytosol og i kjernefraksjon (Gupta & Knowlton 2002; Morton et al. 2009c).

Trening skaper et oksidativt stress som forårsaker at beskyttende enzymer og stressproteiner som HSP60 blir aktive i de vevene som har blitt utsatt for stresset (Khassaf et al. 2003; Morton et al. 2009c). Morton et al. (2008) utførte analyser av vevsprøver fra *m. vastus lateralis* hos trente og utrente menn, og fant da et 25 % høyere “hvilenivå” av HSP60 hos de trente individene. Hos de individene som på forhånd var godt trent, ble det heller ikke observert noen økning i proteinnivå av HSP60 som respons på en 45-minutters treningsøkt med høy intensitet (ibid).

1.4 Antioksidanter, funksjon og trening

En antioksidant er en forbindelse som, ved å oksidere seg selv, reduserer og dermed hindrer eller utsetter oksidasjon av andre stoffer som kan være skadelige for organismen (Karlsson 1997; Nes et al. 2006; Powers & Jackson 2008). Ofte er antioksidanten i en redusert form, og kan dermed donere et elektron til en ustabil forbindelse (ibid). Antioksidanter kan hindre oksidasjon av substrater ved å donere et elektron, eller de kan virke forebyggende ved å fjerne

et intermediat fra en reaktiv forbindelse, og dermed gjøre den mindre skadelig (Huang et al. 2005; Kohen & Nyska 2002).

Alle organismer som trenger oksygen, har en mekanisme for å beskytte seg mot frie radikaler som RONS (Mathews et al. 2000; McArdle et al. 2007; Nes et al. 2006).

Forsvarmekanismene foreligger både intracellulært og ekstracellulært, for eksempel i form av antioksidanter (Locke Marius 2002; Nes et al. 2006). Antioksidanter forekommer endogent hvis kroppen kan produsere de selv (eksempelvis superoksiddismutase, katalase og glutathionperoksidase), og eksogent hvis kroppen må få de tilført via kosten (eksempelvis vitamin C og E) (Locke Marius 2002).

Karlsson (1997) skriver at produksjon av reaktive oksygenforbindelser i kroppen vil under normale betingelser kunne kontrolleres av det naturlige antioksidantforsvaret. Mesteparten av RONS blir produsert i fettlagrene i kroppen og i cellemembraner, derfor spiller de fettløselige antioksidantene, som for eksempel vitamin E, en stor rolle i å bekjempe disse (Karlsson 1997; Mathews et al. 2000). RONS som ikke bekjempes i fettlageret, vandrer ut i det vandige miljøet hvor vannløselige antioksidanter som vitamin C befinner seg (ibid).

Det endogene antioksidantforsvaret har vist seg å bli forsterket ved å tilsette kosten antioksidanter (Alessio et al. 1997; Goldfarb et al. 2005; Nes et al. 2006). Utholdenhetstrening har også vist seg å oppregulere det endogene antioksidantsystemet (Gomez-Cabrera et al. 2008a; Knez et al. 2007; Viña et al. 2000).

For høyt nivå av RONS fra respirasjonen fører til skadelige biprodukter, likevel er de helt essensielle for at cellen skal kunne fungere optimalt (Peternelj & Coombes 2011). Hvorvidt antioksidanter påvirker treningsinduserte responser i muskelcellene, er et omfattende forskningsfelt, og skal nå presenteres kort.

Peternelj og Coombes (2011) så på over 150 studier som beskrev antioksidanters virkning på trening, hvor de fleste av studiene indikerte at antioksidantene dempet oksidativt stress. Det var likevel uenigheter om dette var positivt eller negativt med tanke på økt helsegevinst og forbedring i treningsprestasjon. Flestparten av studiene viste ingen effekt av antioksidanter på celleødeleggelse, inflammatoriske responser, eller muskeltrøtthet forårsaket av trening. Mange studier viste positive effekter ved bruk av antioksidanter, men flere nyere studier fant ødeleggende effekter på prestasjon og helse ved tilskudd av antioksidanter (ibid). Peternelj og

Coombes (2011) anbefalte ikke idrettsutøvere og mosjonister å bruke tilskudd, men heller ha et variert og balansert kosthold for å få tilstrekkelig med vitaminer, og dermed opprettholde en god antioksidantstatus i kroppen.

Zoppi et al. (2006) testet en gruppe som fikk C- og E-vitamintilskudd, mot en annen gruppe som fikk placebotilskudd. De fant at antioksidantene kunne forebygge celleskade, og dermed muligens hindre nedbrytning i musklene fordi det ble observert en mindre mengde fettperoksidering i gruppen med vitamintilskudd (ibid). Kanter et al (1993) derimot konkluderte med at et tilskudd av C- og E-vitaminer og β -karoten ikke hindret skadene fra treningsindusert oksidativt stress, til tross for at de senket markører for fettperoksidering.

1.4.1 Vitamin C (askorbinsyre)

I Nes et al. (2006) beskrives vitamin C som et reduksjonsmiddel som lett blir oksidert, og derfor en effektiv antioksidant. Vitamin C beskytter cellene mot oksidativ skade av for eksempel flerumettete fettsyrer, og vitaminene A og E. Den antatte viktigste rollen til vitamin C er å regulere redokspotensialet i cellene og dermed forebygge skade forårsaket av frie radikaler (ibid). Ved å redusere radikaler fra vitamin E, kan vitamin C resirkulere vitamin E fra dens oksiderte til dens aktive form (Niki 1987). Vitamin C fremmer også syntese av et stoff som heter karnitin, og som har som rolle å frakte lange fettsyrer gjennom mitokondriemembranen (ibid).

Anbefalt inntak av vitamin C er forskjellig fra land til land, men i Norge er den satt til 75 mg daglig (*Nordic nutrition recommendations: NNR 2004 : integrating nutrition and physical activity* 2004). Tusener av mennesker har tatt doser på 2-4 gram daglig over lengre perioder uten å observere bivirkninger (Nes et al. 2006). I noen tilfeller har et stort inntak av vitamin C ført til kvalme og diare, noe som kan tyde på at askorbinsyren blir omdannet til oksalsyre (ibid). Nyrestein er en mulig bivirkning ved inntak av flere gram askorbinsyre daglig (Drevon et al. 2007; Nes et al. 2006).

I studier der inntak av vitamin C har blitt gitt over en periode, med et avsluttende utholdenhetsarbeid, har antioksidanten både vist seg å dempe (Ashton et al. 1999; Thompson et al. 2001) og øke (Bryant et al. 2003) oksidativt stress i mennesker. Vitamin C har vist seg å virke både prestasjonsfremmende (Howald et al. 1975) og prestasjonshemmende (Gomez-

Cabrera et al. 2008a; Marshall et al. 2002) i forbindelse med utholdenhetskapasitet hos mennesker.

1.4.2 Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E fungerer som en antioksidant ved å hindre oksidasjon av fettsyrer og beskytter mot ødeleggelse av røde blodceller (hemolyse) (Campbell 1991; Nes et al. 2006). Karlsson (1997) poengterer at vitamin E er viktig for de hvite blodcellene, og for å opprettholde et godt immunsystem. Fritt oksygen (O_2) med sitt høye energinivå, kan skade DNA og skape mutagene forbindelser. Vitamin E har vist seg å virke nøytraliserende på O_2 (ibid). Vitamin E beskytter membranene i cellene våre, ved å hindre oksidativ nedbrytning av flerumettete fettsyrer (Jessup et al. 2003; Nes et al. 2006) og uskadeliggjøre fettløselige reaktive oksygenforbindelser (Jackson 1987). Inntak av vitamin E er direkte relatert til inntak av fett (Karlsson et al. 1993; Nes et al. 2006), og vitaminet forekommer også i den fettholdige delen av cellen (Drevon et al. 2007; Karlsson 1997). Etersom vitamin E blir resirkulert av vitamin C, er dens egenskaper som en antioksidant forsterket av vitamin C, spesielt under perioder med oksidativt stress (Powers et al. 2004). Det finnes minst 8 former av vitamin E, hvorav α -tokoferol virker som den sterkeste antioksidanten (ibid).

Anbefalt inntak av vitamin E i Norge er på 10 mg daglig for menn, og 8 mg for kvinner (Nes et al. 2006; *Nordic nutrition recommendations: NNR 2004 : integrating nutrition and physical activity* 2004). Det er ikke rapportert om forgiftningssymptomer av for mye inntak av vitamin E, men det er oppdaget at store doser gir en reduksjon i de hvite blodcellenes bakteriedrepende egenskaper (Nes et al. 2006).

Vitamin E har vist seg å dempe markører for oksidativt stress som er induisert av trening (Bryant et al. 2003; Jackson 1987; Jackson et al. 2004; Meydani et al. 1993; Rokitzki et al. 1994), derfor har det blitt anbefalt idrettsutøvere å vurdere et tilskudd av vitamin E. Jackson et al. (1987) viste at et lavt nivå av vitamin E i musklene, utsatte musklene for større skade som oppstod under stress (trening). De mente derfor at vitamin E spilte en viktig rolle for muskler som stadig ble utsatt for stress som kunne skade muskelvevet (ibid). Det er observert redusert utholdenhet hos dyr som har mangel på vitamin E (Quintanilha & Packer 1983). Til tross for at tilskudd med vitamin E har vist seg å forebygge reaktive forbindelser, er det usikkert om vitaminet har noen prestasjonsfremmende effekt; det finnes studier gjort på mennesker (Aguiló et al. 2007; Simon-Schnass & Pabst 1988), og dyr (Asha Devi et al. 2003; Novelli et

al. 1990) som viser at vitamin E virker prestasjonsfremmende, men det er også studier som viser at vitamin E virker prestasjonshemmende på mennesker (Gaeini et al. 2006; Patil et al. 2009; Rokitzki et al. 1994; Sharman et al. 1971), og dyr (deOliveira et al. 2003).

1.4.3 Smartfish

Juicen Smartfish er produsert av en norsk biokjemisk bedrift som heter Smartfish. Smartfish inneholder både aminosyrer og fettsyrer i tillegg til antioksidanter. Av 250 ml er det 94 % fruktjuice, og i tillegg er det tilsatt tokoferoler og 1,3 µg vitamin D. Drikken er en sammensetning av fem forskjellige frukter som gir opphav til flere vitaminkilder, likevel i liten grad per vitamin.

Smartfish inneholder 1000 mg av den ikke-essensielle aminosyren β-alanin (Mannion et al. 1992). I kroppen spiller β-alanin en viktig rolle i produksjon av karnosin som har vist seg å øke bufferkapasiteten i musklene (Mannion et al. 1992). β-alanin har derfor i flere sammenhenger vist seg å bedre anaerob utholdenhet (Artioli et al. 2010; Hoffman et al. 2008; Kern & Robinson 2011). Det er viktig å poengtere at i respektive studier fra kildene over, er det inntatt opp til 4-5 ganger så mye β-alanin enn det som er gitt til forsøkspersonene i vår studie.

I tillegg inneholder Smartfish 700 mg omega-3-fettsyrer (EPA og DHA). Studier viser en nedgang i fettprosent, samt bedret kardiovaskulær- og metabolsk helse ved inntak av omega-3-fettsyrer kombinert med trening (Hill et al. 2007; Raastad et al. 1997).

1.4.4 Astaxanthin

Astaxanthin er et rødt karotenoid, og opptrer i mange organismer som en naturlig antioksidant (Ikeuchi et al. 2006). I vår studie er kilden til astaxanthin mikroalgen *Haematococcus pluvialis*. Astaxanthin har antiinflammatoriske egenskaper (Bennedsen et al. 2000; Guerin et al. 2003), og har vist seg å være mer effektiv enn vitamin E i forebygging av fettoksidering (Kobayashi 2000; Naguib 2000)

Ved å tilsette astaxanthin, ble det observert økning i det endogene antioksidantforsvaret til rotter (Ranga Rao et al. 2010), og redusert treningsindusert muskelskade hos mennesker (styrkeutøvere) (Fry et al. 2004) og hos mus (Wataru et al. 2003). Astaxanthin har også vist seg å virke prestasjonsfremmende ved å øke VO_{2maks} hos syklister (Earnest et al. 2011), og redusere akkumulering av melkesyre hos utholdenhetsutøvere (1200 meter løping) (Sawaki et

al. 2002). I en studie av Ikeuchi et al. (2006) virket astaxanthin stabiliserende på membraner, forsinket muskeltrøtthet og førte til en forbedring i utholdenheten hos mus. Mus som fikk tilskudd av astaxanthin holdt ut svømmetreningen mye lenger. Forskjellen mellom gruppene kom trolig av at i gruppene med tilført astaxanthin, hadde dyrene både høyere verdier av plasmaglukose og ikke-esterifiserte fettsyrer (NEFA) enn kontrollgruppen, særlig var det forhøyede verdier av NEFA i gruppen som fikk mest astaxanthin (30 mg/kg). Dette ble forklart med at tilskudd av astaxanthin gjorde så musene favoriserte fettforbrenning, og dermed tok det lengre tid før glykogenlagrene ble tømt og til utmattelse inntraff (ibid).

I en klinisk studie ble det ikke observert noen negative helseeffekter ved inntak av en dose på 40 mg daglig i 4 uker (Kupcinskis et al. 2008). Denne dosen av astaxanthin er imidlertid 10 ganger høyere enn mengden som har blitt gitt i vår studie (4 mg).

1.5 Problemstilling

Det var ønskelig å undersøke om antioksidanter påvirket treningsinduserte endringer i muskelceller, og det ble da valgt å se på to mitokondrielle proteiner, COX4 og HSP60. Både COX4 og HSP60 ble begge forventet å øke i mengde som følge av en økning i mitokondriell biogenese etter en periode med utholdenhetstrening.

Problemstilling 1: Hvordan påvirkes nivåene av cytokrom c oksidase (COX4), som inngår i reduksjon av oksygen til vann, og regenerering av ATP, etter en periode med utholdenhetstrening og antioksidanttilskudd?

Problemstilling 2: Hvordan påvirkes nivåene av "Heat Shock Protein 60" (HSP60), som er et hjelpeprotein under stress, etter en periode med utholdenhetstrening og antioksidanttilskudd?

Hypotese 1: Et daglig inntak av 1000 mg vitamin C og 235 mg vitamin E, over en 12 ukers periode med utholdenhetstrening, vil dempe den treningsinduserte økningen i proteinmengden av COX4 og HSP60 i musklene.

Hypotese 2: Et daglig inntak av 4 mg astaxanthin, over en 12 ukers periode med utholdenhetstrening, vil dempe den treningsinduserte økningen i proteinmengden av COX4 og HSP60 i musklene.

Selv om teorien viser at astaxanthin kan bedre prestasjon og hindre muskelskade i forbindelse med trening, er det likevel valgt å sette en hypotese som indikerer negativt utfall av tilskuddet. Vi vil teste ut om astaxanthins rolle som en antioksidant i nøytraliseringen av oksidativt stress er negativt, med tanke på at det oksidative stresset er nødvendig for at tilpasningene til treningen skal være optimal.

Det er antioksidanters påvirkning på utholdenhetstrening som er hovedfokuset for denne masteroppgaven. Etersom Smartfish er sammensatt av flere forskjellige næringsstoffer som vil kunne påvirke treningsinduserte responser, ble det valgt ikke å lage noen hypotese på dette produktet.

2. Materialer og metode

Studien ble utført som et dobbelblindet randomisert kontrollert studie. Det var 53 forsøkspersoner som gjennomførte to vevsprøver før og etter en intervensjonsperiode over 12 uker med utholdenhetstrening og tilskudd av antioksidanter eller placeboprodukter. Masteroppgaven er en del av et større prosjekt som startet i 2010 og som forkortes SARA (Smartfish, Antioxidant, Recovery and Adaptation). SARA-prosjektet er godkjent av Regional etisk komite for medisinsk forskning og går i korte trekk ut på å teste om antioksidanttilskudd påvirker tilpasninger til styrke- og utholdenhetstrening (hver for seg). Studien i denne masteroppgaven dreier seg kun om utholdenhetstrening, og er finansiert av SARA-prosjektet, NIH, Smartfish og Vitaelab.

2.1 Krav til forsøkspersonene

Det ble stilt krav til at forsøkspersonene hadde utøvd regelmessig utholdenhetstrening (1-4 ganger i uken) de siste 6 månedene. Personer som trente regelmessig 5 ganger i uken eller mer, fikk ikke lov til å delta. Kosttilskudd utover det som ble gitt i forbindelse med prosjektet, ble ikke akseptert. Det ble gitt restriksjoner i forhold til inntak av kaffe, te og juice; maks 4 kopper per dag og ikke mer enn to glass juice. Mana- og druejuice måtte utelukkes helt fra kosten. Fire dagers kostholdsregistrering ble gjennomført to ganger, og all trening ble ført i en elektronisk treningsdagbok. Forsøkspersonene måtte være mellom 18-45 år, og dokumentere at de var friske i en medisinsk egenerklæring.

2.2 Tilskudd av antioksidanter

Forsøkspersonene ble tilfeldig fordelt i fire grupper med forskjellig daglig kosttilskudd:

- C- og E-vitaminer (1 kapsel inneholdende: 1000 mg C-vitamin, og 235 mg E-vitamin).
- Placebo
- Smartfish (250 ml x 2)
- Astaxanthin (4 mg til frokost)

Detaljert informasjon og fordeling av tilskuddene finnes i vedlegg 1. C- og E-vitaminene ble gitt i samme kapsel, og dosen var henholdsvis > 13 og > 29 ganger høyere enn daglig anbefalt mengde i Norge. Astaxanthin er en antioksidant som finnes i blant annet alger. Smartfish er en drikk med kombinasjon av flere næringsstoffer.

2.3 Treningsprotokollen

Treningsprotokollen varte i 12 uker, med 3-4 økter per uke (figur 3). Treningsintensiteten (puls) varierte mellom øktene, og treningsmengden økte ved at det ble lagt til en treningsøkt etter tre uker, og at det ble utført flere drag per økt, etter 3 og 8 uker. I tillegg til det oppsatte treningsprogrammet, var det lov å trene to valgfrie treningsøkter. For å unngå skader, var det lov til å bytte ut en oppsatt treningsøkt med en annen valgfri økt med utholdenhetstrening, for eksempel fotball, orientering, svømming og liknende.

Uke	Periode	Dag#1	Dag#2	Dag#3	Dag#4
1.-3.	1	Langkjøring: 30 min: 82-87% av HFmaks; 15-17 på Borgs	Intervall: 4x4 min: >90% av HFmaks; 16-18 på Borgs	Langkjøring: 60 min: 72-82% av HFmaks; 14-16 på Borgs	
4.-8.	2	Langkjøring: 30 min: 82-87% av HFmaks; 15-17(18) på Borgs	Intervall: 5x4 min: >90% av HFmaks; 16-18 på Borgs	Langkjøring: 60 min: 72-82% av HFmaks; 14-16 på Borgs	Intervall: 4x6 min: >90% av HFmaks; 16-18 på Borgs
9.-12.	3	Langkjøring: 30 min: 82-87% av HFmaks; 15-17(18) på Borgs	Intervall: 6x4 min: >90% av HFmaks; 16-18 på Borgs	Langkjøring: 60 min: 72-82% av HFmaks; 14-16 på Borgs	Intervall: 5x6 min: >90% av HFmaks; 16-18 på Borgs

Figur 3. Treningsprotokollen til forsøkspersonene. Borgs skala finnes i vedlegg 2.

2.4 VO_{2maks}-test

Det ble gjennomført VO_{2maks}-tester av forsøkspersonene både før, underveis og etter treningsperioden. Testene ble utført på tredemølle ved løp til utmattelse. Med utgangspunkt fra en tilvendingstest ble det satt en startfart, og deretter økte arbeidsbelastningen med 1 km/t per minutt i tre minutter for så å øke kun ½ km/t per minutt. I tilvendingstesten startet kvinner på 8 km/t, og menn på 10 km/t. Deretter ble testen utført som beskrevet over. Da personen hadde nådd maksfart, som måtte holdes i 25 sekunder, ble det trukket fra 3 km/t, som ble startfarten på hovedtesten.

2.5 Vevsprøver

Før og etter treningsperioden på 12 uker, ble det tatt vevsprøver på 200-300 mg fra *m. vastus lateralis*. Forsøkspersonene fikk forbud mot å trene de to siste dagene forutfor vevsprøven. Området for snittet ble bedøvd og sterilisert, og vevstakingen ble gjennomført med Bergstrøms nålteknikk (vedlegg 3). Vevsprøven ble vasket i iskaldt fysiologisk saltvann for å skylle bort blod, og dissekert fri for eventuelt binde- og fettvev, samt blodkoageler. Vevsbiter på ca. 50 mg ble fryst ned i isopentan (på tørris) og oppbevart ved -80 °C i en ultrafryser.

2.6 Bakgrunnsinformasjon om forsøkspersoner

Det er viktig at gruppene ikke avviker mye fra hverandre med henhold til fysiske variabler som vekt, høyde, alder og VO_{2maks} . Tabellen under viser fordelingen av disse parameterne innenfor de fire gruppene.

Tabell 1. Antropometriske variabler og VO_{2maks} i de fire gruppene. Verdiene ble målt før treningsperioden, og inkluderer forsøkspersoner (n=53) som fullførte to vevsprøver.

	C- og E-vitamin	Placebo	Smartfish	Astaxanthin
Alder (år)	23,4 ± 3,7	22,7 ± 3,5	23,0 ± 5,6	24,8 ± 7,9
Høyde (cm)	177,4 ± 11,1	175,3 ± 10,1	177,6 ± 8,8	175,1 ± 9,0
Vekt (kg)	73,1 ± 13,0	70,6 ± 13,3	75,9 ± 10,3	70,0 ± 10,7
VO_{2maks} (ml/kg/min)	53,1 ± 9,3	53,0 ± 7,8	51,0 ± 7,7	53,0 ± 7,9
Kjønn	♂ = 8 ♀ = 7	♂ = 8 ♀ = 8	♂ = 6 ♀ = 4	♂ = 7 ♀ = 5

Verdiene er gjennomsnitt ± SD.

2.7 Laborieprotokoller

Arbeidet i denne masteroppgaven var hovedsakelig analyse av proteiner, men opparbeidelsen av vevsprøvene er likevel nevnt. En utarbeidet protokoll for immunoblotting (Western blot) finnes i vedlegg 4.

2.7.1 Homogenisering og ekstraksjon

Vevsprøvene ble homogenisert og ekstrahert i fire cellefraksjoner: membran-, cytosol-, cytoskjelett- og kjernefraksjon. I denne studien ble det kun benyttet membranfraksjoner av vevsprøvene. Cytosolfraksjonen ble testet, uten funn av COX4. Fremgangsmåte er i henhold til brukermanual for Proteo Extract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem).

2.7.2 Måling av proteinkonsentrasjoner i vevsprøvene

Proteinkonsentrasjon i alle fraksjoner ble målt med et modifisert Lowry-based detergent-compatible protein assay (Bio-Rad Laboratories). Det ble målt standardkurve med Bovine Gamma Globulin (BGG) Standard Set (Bio-Rad Laboratories). Alle fraksjoner, standarder, kontroller, og prøver, ble tilsatt og målt i triplikater på 5 µl (med krav til CV<10 %). Prøver ble oppbevart på ultrafryser, -80 °C inntil elektroforese.

2.7.3 Elektroforese

Gelelektroforese ble utført med henhold til produsentens anbefalinger for NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Midi Gel (Invitrogen). Fra målinger av proteinkonsentrasjoner, ble det beregnet volum av prøver og buffere ved hjelp av et beregningsark i Excel (vedlegg 5). Det ble benyttet vann fra ELGA vannrensessystem i alle eksperimenter. Prøver som skulle sammenliknes, ble applisert på samme gel, med lik mengde protein i prøver tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson. Proteinene ble separert i elektroforesekammer i 45 minutter, med en konstant spenning på 200 Volt.

2.7.4 Blotting

Prøvene ble overført til en PVDF-membran ved hjelp av et tørrblotsystem, iBlot™ (Invitrogen) i 6 minutter på 20 V.

Gelene ble farget med SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) for å kontrollere mengde gjenværende proteiner. Membranene ble blokkert med 5 % skummetmelk pulver-blanding (Merck) med TBS-T i 2 timer i romtemperatur, deretter ble de vasket med TBS-T og TBS.

2.7.5 Inkubering med antistoffer

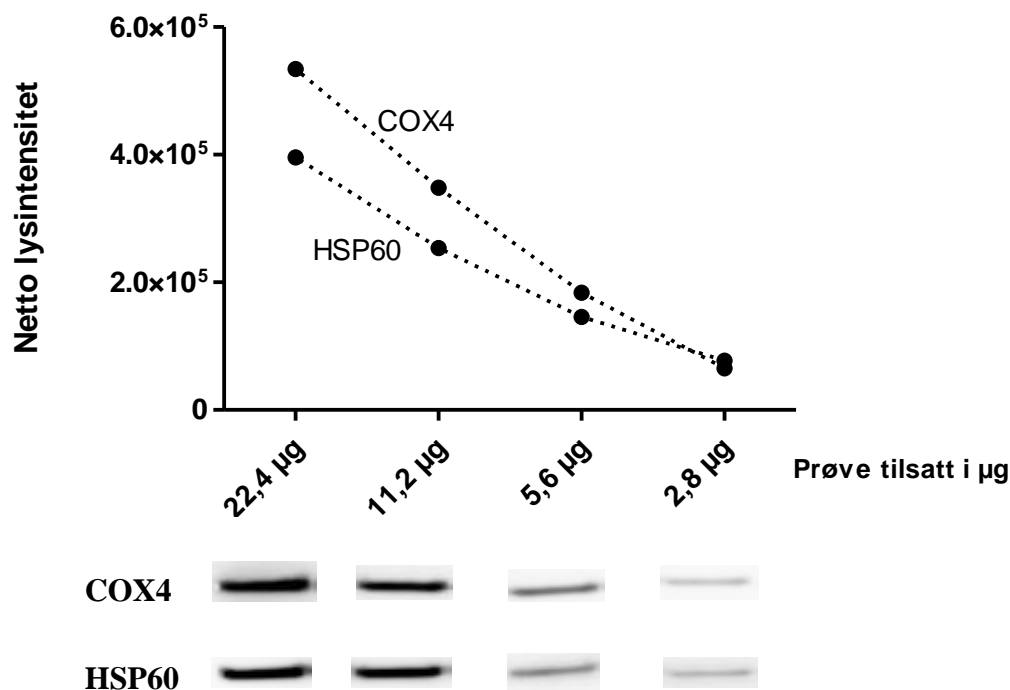
Det ble tilsatt primære antistoffer i fortyningene 1:1000 for COX4 (Abcam) og 1:4000 for HSP60 (Stressgen). Begge de primære antistoffene var monoklonale antistoffer produsert i mus. Inkubering med primære antistoffer varte over natt ved 4 °C. Membranene ble igjen vasket i TBS-T og TBS, før de ble tilsatt et polyklonalt sekundært geit anti-mus IgG i fortyningen 1:30 000, konjugert med enzymet pepperrot peroksidase (Thermo Scientific). Inkubering av membran og sekundært antistoff varte i 1 time i romtemperatur, før membranene igjen ble vasket i TBS-T og TBS, og dermed gjort klar til bildefremkalling.

2.7.6 Bildefremkalling

Membranene ble tilsatt et substrat (Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) før bildefremkalling. Bildet ble eksponert i “Kodak Image Station 2000R” med innstillinger for kjemiluminesens for deteksjon av proteinene. Som vektmarkør ble Magic Marker (Invitrogen) benyttet.

2.8 Sensitivitet i metoden

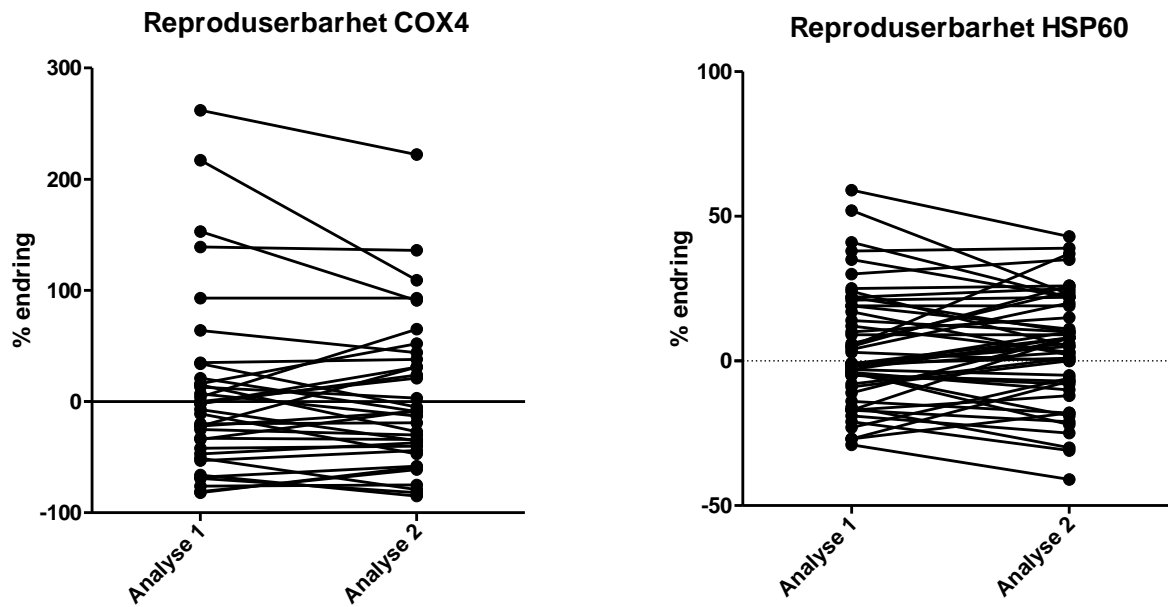
Måling av metodens sensitivitet ble gjort ved at vevsprøven til en tilfeldig forsøksperson ble tilsatt til gelen i paralleller i en to-fold fortynningsrekke. Størst mengde tilsatt protein var 22,4 µg, og minste mengde var 2,8 µg (figur 4).



Figur 4. Kurve for deteksjon og bilde av bånd for COX4 og HSP60, ved gitte mengder proteiner tilsatt til gelen før elektroforese og blotting. Bildet av båndene samsvarer med mengde protein som står skrevet over det respektive båndet. Ved 2,8 µg protein tilsatt, har båndene en netto lysintensitet på omtrent 100.000 som tilsvarer et lett synlig bånd (se bildet).

2.9 Reproduserbarhet i metoden

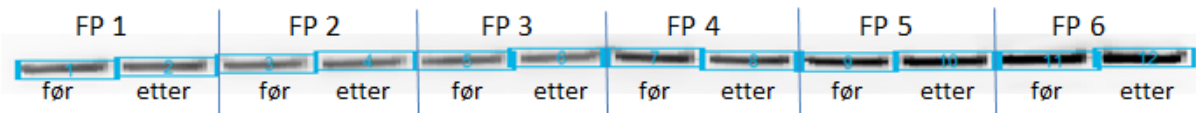
Alle vevsprøver ble analysert to ganger på forskjellige geler. Noen prøver er også analysert tre og fire ganger. Det er gjennomsnittet fra de to beste analysene som har blitt benyttet til å beregne endringer i proteinmengde fra før til etter treningsperioden (figur 5). Gjennomsnittlig differanse mellom analyse 1 og 2 ligger på 24 % (SD = 22) for COX4, og 10 % (SD = 8) for HSP60.



Figur 5. Reproduserbarhet av COX4 og HSP60. Analyse 1 og 2 indikerer henholdsvis prosentvis endring fra før til etter treningsperioden i to forskjellige analyser med samme betingelser. Merk at prosentskalaen varierer mye mellom COX4 og HSP60.

2.10 Tolkning av resultater

Resultatene ble tolket slik som beskrevet i manualen for Kodak 1D Software (versjon 3.6.1, Kodak). Ved hjelp av Carestream manual ROI (område av interesse), ble det målt netto lysintensitet som er piksler i båndet, korrigert for støy i bildet (figur 6). Det ble målt ROI av bånd før og etter treningsperioden for hver forsøksperson. Prosentvise endringer mellom prøver tatt før og etter treningsperioden, ble basert på endringer i netto lysintensiteter.



Figur 6. Membran med ROI som måler netto lysintensitet av proteinbånd med substrat. Det lages en ramme som kopieres til hvert bånd hvis mulig, slik at rammestørrelsen blir lik. Hele båndet må passe innenfor rammen. Hver forsøksperson har to bånd ved siden av hverandre som representerer et bånd før, og et bånd etter treningsperioden. FP=forsøksperson.

2.11 Statistikk

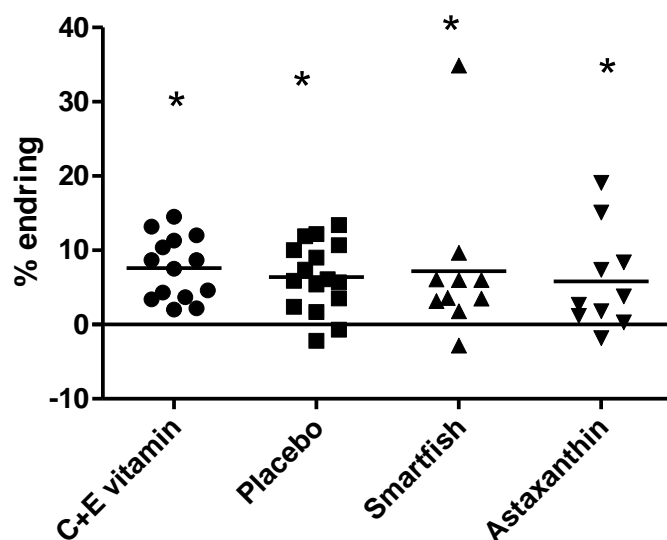
Hovedfokuset var å sammenlikne gruppen som fikk tilskudd av C- og E-vitaminer, mot gruppen som fikk placebotilskudd. Forsøkspersonenes endringer fra før til etter treningsperioden, ble testet med parvise t-tester, og forskjeller mellom to og to grupper ble testet med u-parete t-tester. Ved sammenlikning av alle gruppene (C- og E-vitamintilskudd, placebotilskudd, Smartfishtilskudd og astaxanthintilskudd), ble det brukt en ikke-parametrisk analyse (Kruskal-wallins test). Pearsons korrelasjonstest ble brukt mellom endringer i VO_{2maks} , COX4 og HSP60. Kalkuleringer ble gjort med Prism® (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) og Microsoft® Excel 2010, hvor data ble presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik. Endringer, forskjeller eller korrelasjoner ble ansett som signifikant for $p \leq 0,05$, og som en tendens hvis $0,10 \geq p > 0,05$.

3 Resultater

Hovedmålet med denne studien var å undersøke om tilskudd av antioksidanter over en 12 ukers periode med utholdenhetstrening, ville påvirke proteinnivåene av COX4 og HSP60 i en skjelettmuskel. Resultatene fra vevsanalysene presenteres nå sammen med endring i VO_{2maks} , for å gi et generelt bilde av den effekten utholdenhetstreningen har hatt i denne studien. En oversiktstabell over prosentvise endringer for COX4, HSP60 og VO_{2maks} finnes i vedlegg 6.

3.1 Endringer i VO_{2maks}

VO_{2maks} ble testet ved løping til utmattelse på tredemølle (se metode, 2.4). Basert på parete t-tester, viste alle gruppene signifikante endringer i VO_{2maks} fra før til etter treningsperioden (figur 7). Endringene var som følger: 7,6 % ($p < 0,0001$) i gruppen med tilskudd av C- og E-vitamintilskudd, 6,4 % ($p = 0,0003$) i placebogruppen, 7,2 % ($p < 0,05$) i gruppen med Smartfishtilskudd, og 5,8 % ($p < 0,05$) i gruppen med astaxanthintilskudd. Det var ingen av endringene i VO_{2maks} i intervensjonsgruppene som var signifikant forskjellige fra endringen i placebogruppen.



Figur 7. Prosentvise endringer i VO_{2maks} etter en treningsperiode på 12 uker med tilskudd av diverse antioksidanter. Horisontale streker indikerer gjennomsnitt. Signifikante endringer innenfor gruppen er merket med *.

Absoluttverdier av VO_{2maks} ble målt i l/min og ml/kg/min og vises i tabell 2.

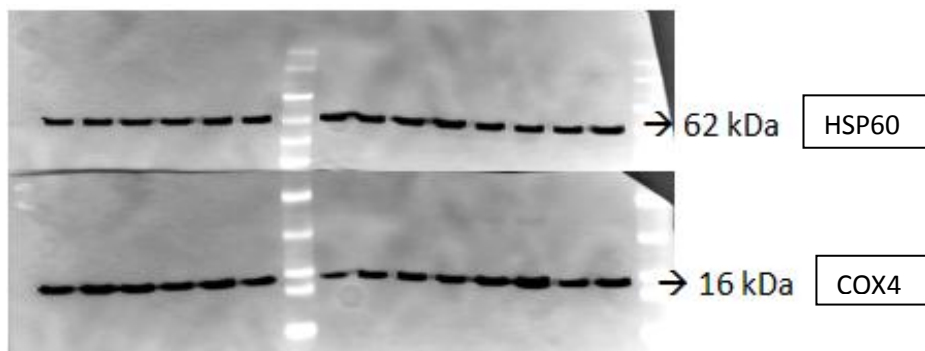
Tabell 2. Gjennomsnittlige absoluttverdier for VO_{2maks} i hver gruppe.

GRUPPE	VO_{2maks} (l/min)		VO_{2maks} (ml/kg/min)	
	FØR	ETTER	FØR	ETTER
C- og E-vitamin	3,9 ± 1,0	4,1 ± 1,0	53,1 ± 9,3	57,0 ± 9,7
Placebo	3,8 ± 1,0	4,0 ± 1,0	53,0 ± 7,8	57,0 ± 7,1
Smartfish	3,9 ± 1,7	4,0 ± 1,0	51,0 ± 7,7	55,0 ± 7,6
Astaxanthin	3,9 ± 0,8	4,0 ± 0,8	54,0 ± 5,8	57,0 ± 5,6

Verdiene er gjennomsnitt ± SD.

3.2 Immunoblotting (Western blot) av COX4 og HSP60

Basert på vevsprøvene som ble tatt før og etter treningsperioden, ble proteinnivåene (mengden) av COX4 og HSP60 fra *m. vastus lateralis* analysert ved å bruke western blotting som metode. Merk at det kun er membranfraksjonen av muskelcellene som har blitt analysert i denne masteroppgaven. Proteinene ble som forventet observert ved molekylvektene ~16 kDa for COX4 og ~60 kDa for HSP60 (figur 8).



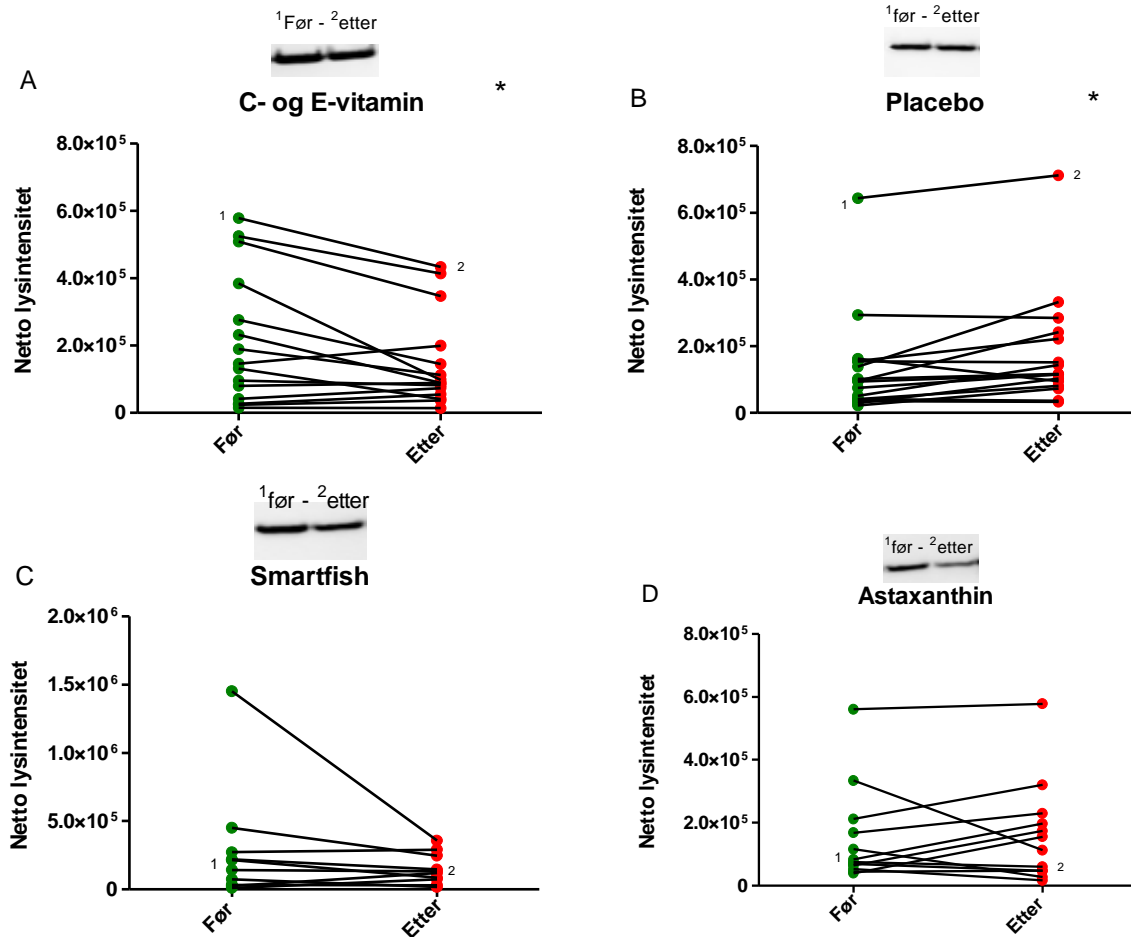
Figur 8. Membran med markør (Gene On) i hvitt, og proteinbånd av HSP60 (62 kDa) og COX4 (16 kDa) i svart. Membranen ble klippet i to fordi proteinbåndene av HSP60 ga generelt sterkere signaler og undertrykte dermed båndene av COX4 hvis proteinene ble tatt i samme bilde.

For å kunne måle effekten av de ulike antioksidanttilskuddene, ble gruppene med tilskudd av antioksidanter sammenliknet med, og testet opp mot placebogruppen.

3.2.1 Endringer i proteinnivå av COX4 basert på netto lysintensitet

Endringer i COX4-proteinnivå ble basert på endring i netto lysintensitet i bånd fra prøvene tatt før og etter treningsperioden (figur 9 A, B, C og D). Gruppen med C- og E-vitamintilskudd hadde en signifikant reduksjon i nivå av COX4 etter treningsperioden ($p < 0,05$; paret t-test; figur 9,A). Kontrollgruppen med placebotilskudd hadde en signifikant økning i nivå av COX4 etter treningsperioden ($p < 0,05$; paret t-test; figur 9, B). Gruppene med Smartfish- og astaxanthintilskudd hadde ingen signifikante endringer innenfor gruppene.

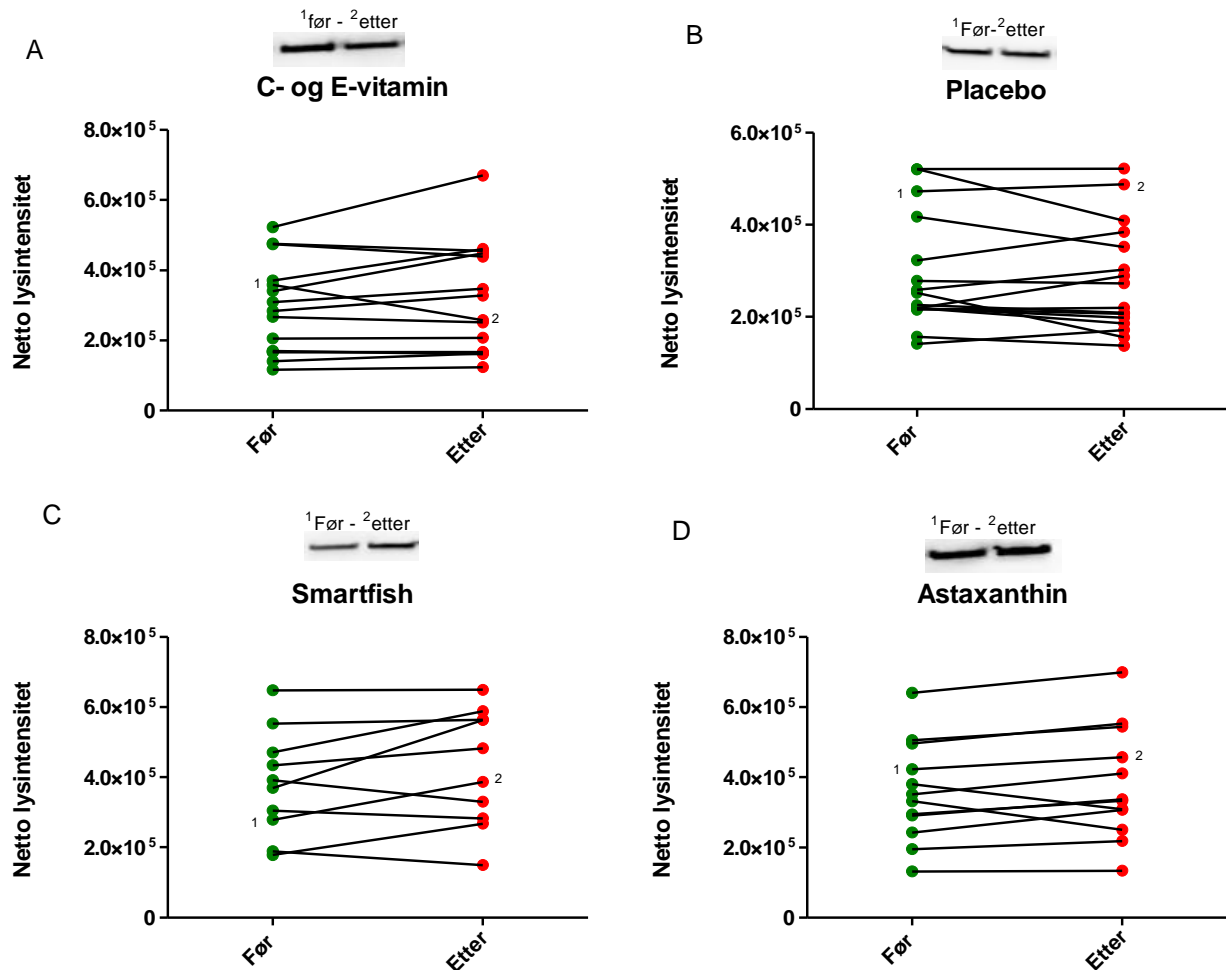
Det ble utført korrelasjonsanalyser mellom COX4 og VO_{2maks} for å undersøke om treningsperioden og antioksidanttilskuddene hadde påvirket de to parameterne i forskjellig grad. Endring i proteinnivå av COX4 i placebogruppen har en viss likhet mellom endringene i VO_{2maks} , men ingen korrelasjonstester mellom endringer på proteinnivå og VO_{2maks} var signifikante.



Figur 9 A, B, C, D. Western blot og netto lysintensitet av COX4 før og etter en 12 ukers treningsperiode hvor forsøkspersonene har fått antioksidant- eller placebotilskudd (A: C- og E-vitaminer, B: Placebo, C: Smartfish, D: Astaxanthin). En linje i grafen representerer endring for en forsøksperson fra før til etter treningsperioden. Signifikante endringer er merket med *. Båndene fra western blottingen indikerer netto lysintensitet før og etter treningsperioden for en tilfeldig valgt person innenfor tilhørende gruppe. De opphøyde tallene over båndene, kan spores til linjene på grafen. Proteinmengden av prøver tatt før og etter treningsperioden er lik, men mengden er ikke nødvendigvis lik fra person til person. Det er tilsatt maksimal proteinmengde i forhold til målte proteinverdier (se metode).

3.2.2 Endringer i proteinnivå av HSP60 basert på netto lysintensitet

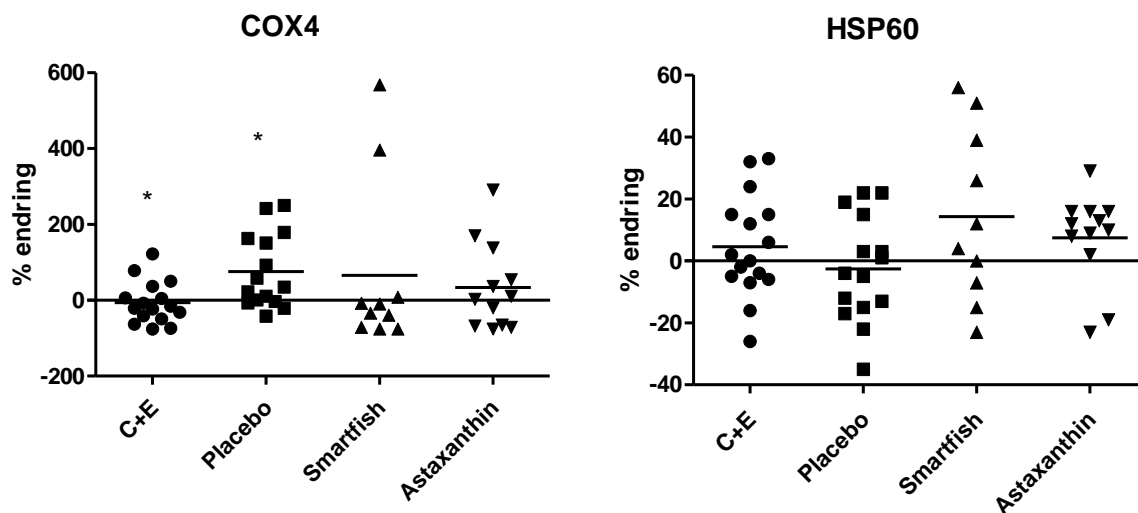
Det var ingen signifikante endringer i HSP60-nivå basert på netto lysintensitet innenfor gruppene med tilskudd av antioksidanter eller placeboprodukter (figur 10 A, B, C og D).



Figur 10 A, B, C, D. Western blot og netto lysintensitet av HSP60 før og etter en 12 ukers treningsperiode hvor forsøkspersonene har fått antioksidant- eller placebo tilskudd (A: C- og E-vitaminer, B: Placebo, C: Smartfish, D: Astaxanthin). En linje i grafen representerer endring for en forsøksperson fra før til etter treningsperioden. Det er ingen signifikante endringer. Båndene fra western blottingen indikerer netto lysintensitet før og etter treningsperioden for en tilfeldig valgt person innenfor tilhørende gruppe. De opphøyde tallene over båndene, kan spores til linjene på grafen. Proteinmengden av prøver tatt før og etter treningsperioden er lik, men mengden er ikke nødvendigvis lik fra person til person. Det er tilsatt maksimal proteinmengde i forhold til målte proteinverdier (se metode).

3.2.3 Prosentvise endringer i proteinnivå av COX4 og HSP60

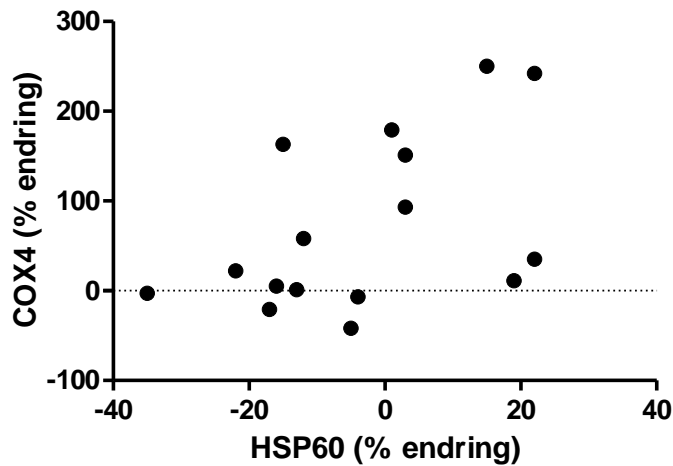
Det var en tendens til forskjell i COX4-nivå mellom alle fire gruppene ($p=0,07$, Kruskal-Wallis test) (figur 11), men det ble likevel valgt å gå videre med uparete-tester, for å se på forskjellen mellom intervensjonsgruppene i forhold til placebogruppen, da det var dette område som primært var av interesse. Den eneste signifikante forskjellen var proteinnivå av COX4 i gruppen med tilskudd av C- og E-vitaminer, som var signifikant forskjellig fra gruppen med placebotilskudd ($p<0,05$, uparet t-test) (Figur 11).



Figur 11. Prosentvise endringer i proteinmengde av COX4 og HSP60 i de fire forskjellige gruppene med tilskudd av diverse tilskudd av antioksidanter eller placebo. Signifikante endringer innenfor gruppene er merket med *. Intervensjonsgrupper som signifikant avviker fra placebogruppen, er merket med #.

3.2.4 Korrelasjoner mellom endringer i proteinnivå av COX4 og HSP60

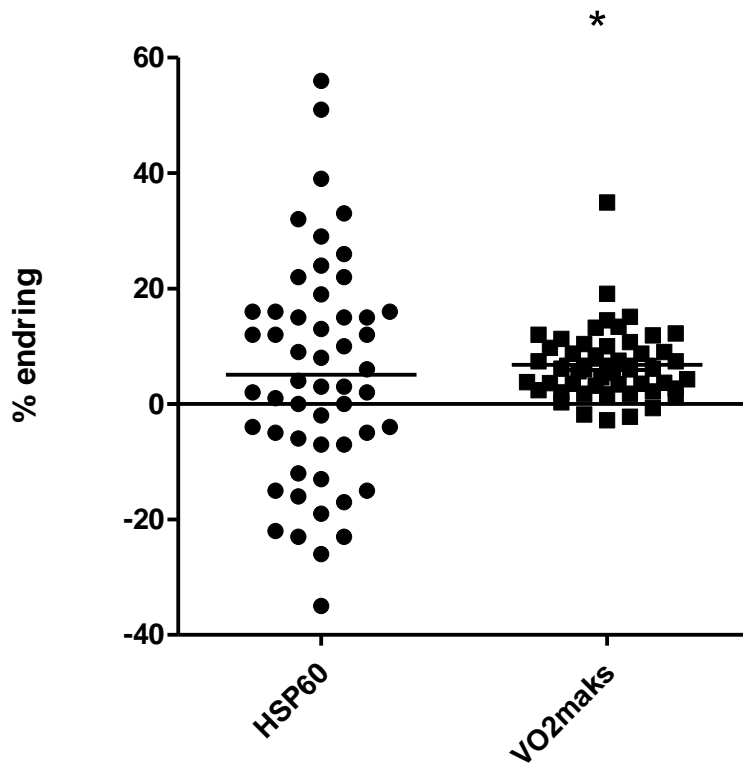
Korrelasjonsanalyser mellom HSP60 og COX4 ble gjennomført for å se om det var noen sammenheng mellom treningseffektene i de to mitokondrielle proteinene. Det var en korrelasjon mellom COX4- og HSP60-respons i placebogruppen ($p=0,05$; Pearson r -verdi=0,49; figur 12).



Figur 12. Korrelasjonsplot mellom prosentvis endring i proteinnivå av COX4 og HSP60 i placebogruppen.

3.3 Samlede endringer i VO_{2maks} , og i proteinnivå av HSP60

Ettersom det så ut til at endringene i VO_{2maks} og i HSP60-nivåene ikke ble påvirket av antioksidanttilskudd, var det interessant å undersøke den samlede responsen på utholdenhetstreningen, uavhengig av gruppeinndelinger. Da alle forsøkspersonene var samlet, var det en tendens til en gjennomsnittlig økning i proteinnivå av HSP60 på 6 % ($p=0,066$; paret t-test; figur 13). Forsøkspersonenes gjennomsnittlige endring i VO_{2maks} da alle gruppene var samlet, var på 6,8 % ($p<0,0001$; paret t-test; figur 13).



Figur 13. Alle forsøkspersonenes samlede endringer av HSP60 og VO_{2maks} . Horisontal linje representerer gjennomsnittet. Signifikant endring er merket med *.

4 Diskusjon

For å undersøke antioksidanters virkning på treningsinduserte responser i skjelettmuskulatur, ble det valgt å studere endringer i proteinnivå av COX4 og HSP60 etter 12 uker med utholdenhetstrening. Hypotesene var at antioksidantene ville hemme treningsinduserte økninger i proteinnivå av COX4 og HSP60.

I vår studie førte utholdenhetstreningen til en signifikant økning i VO_{2maks} , (6,8 %), uten forskjeller mellom grupper som fikk antioksidant- eller placebotilskudd. Det ble funnet en signifikant økning i proteinnivå av COX4 i kontrollgruppen (61 %), mens det faktisk var en reduksjon av proteinmengden i gruppen med C- og E-vitamintilskudd (-19 %). Samlet sett viste membranfraksjonens proteinnivå av HSP60 en tendens til økning (6,0 %), men det var ingen forskjeller mellom gruppene. I tillegg var det en positiv korrelasjon mellom endring i proteinnivå av COX4 og HSP60 i placebogruppen.

I denne oppgaven er det lagt mest vekt på endringene som har skjedd i gruppen med C- og E-vitamintilskudd, sammenliknet med placebogruppen. Smartfish er en juice med blanding av flere forskjellige antioksidanter i tillegg til fett- og aminosyrer. Ut i fra teorien, kan både β -alanin og omega-3 fettsyrer påvirke treningsinduserte endringer (Artioli et al. 2010; Hill et al. 2007; Hoffman et al. 2008; Kern & Robinson 2011), og det er derfor vanskelig å diskutere hvorvidt antioksidanter som en del av juicen bidrar til disse endringene i muskelen. Både astaxanthin og Smartfish testes ut for at produsenten vil se virkning av produktet, og ingen signifikante endringer på proteinnivå ble observert i gruppene med disse tilskuddene.

4.2 Endringer i proteinnivå av COX4 som følge av utholdenhetstrening

Det er kjent at utholdenhetstrening utløser endringer i nivå av proteiner og enzymer som inngår i respirasjonskjeden i mitokondriene, deriblant nivå av det mitokondrielle enzymet COX4 (Bengtsson et al. 2001; Hood & Saleem 2007; Little et al. 2010; Ljubcic et al. 2010). I vår studie ble derfor COX4 brukt som en markør for mitokondriell biogenese, og det var forventet å finne en økning i nivå av dette proteinet som respons på utholdenhetstreningen.

Studier på både dyr (Connor et al. 2001; Freyssen et al. 1999; Gordon et al. 2001; Zaid et al. 1999) og mennesker (Bengtsson et al. 2001; Cochran et al. 2010; Little et al. 2010; Vogt et al.

2001; Yfanti et al. 2010), indikerer at utholdenhetstrening, eller et utholdenhetsarbeid, fører til en kraftig oppregulering av oksidative enzymer som cytokrom c, citrat syntase, β -hydroksyacyl-CoA dehydrogenase og COX4. Studiene ble utført både på mRNA-nivå (Cochran et al. 2010; Vogt et al. 2001; Zaid et al. 1999) og på proteinnivå (Bengtsson et al. 2001; Connor et al. 2001; Freyssenet et al. 1999; Gordon et al. 2001; Little et al. 2010; Yfanti et al. 2010). Proteinnivåene av COX4 hadde en økning på 154 % i Bengtsson et al. (2001) sin studie, og 38 % i Little et al. (2010) sin studie, som begge var studier gjort på mennesker som trente utholdenhet av høy intensitet over en lengre periode (henholdsvis 4 og 2 uker).

I kontrollgruppen i vår studie ble det observert en signifikant økning på 61 % i proteinnivå av COX4 etter 12 uker med utholdenhetstrening. Dette funnet samsvarer med tidligere studier, og styrker hypotesen vår om at utholdenhetstrening fører til en økning i proteinnivå av COX4.

Det finnes også studier som ikke samsvarer med den økningen av COX4-nivå som ble observert i vår studie; Zoll et al. (2006) fant ingen endringer i proteinnivå av COX4 i muskelen (*m. vastus lateralis*) etter 6 uker med utholdenhetstrening hos langdistanseløpere. Etersom deltakerne i studien var godt trent på forhånd, antok forskerne at tilpasningsresponsene på treningen, deriblant nivåene av COX4, hadde nådd en øvre grense for oksidativ kapasitet i musklene (Puntschart et al. 1995; Zoll et al. 2006).

4.2.1 Effekt av antioksidanttilskudd på nivå av COX4

Resultatene fra vår studie tyder på at antioksidantene hemmet utviklingen av mitokondriell biogenese, fordi COX4 ble redusert med -19 % i forhold til en økning på 61 % i placebogruppen. Dette samsvarer med tidligere studier på rotter, hvor det ble observert ~ 20 % lavere nivå av cytokrom c i gruppen som fikk tilskudd av vitamin C (Gomez-Cabrera et al. 2008a). Det må nevnes at det i studien til Gomez-Cabrera et. al (2008a) ble målt nivå av cytokrom c i en annen cellefraksjon (cytosol) enn i vår studie (membran), og uten tilskudd av vitamin E. Strobel et al. (2011) utførte et forsøk på rotter som fikk tilskudd av store doser med vitamin E. Det viste seg at utholdenhetstreningen generelt førte til en økning av mitokondriell biogenese i rottene, ved å øke innhold av blant annet COX4, men vitamin E dempet denne treningsinduserte økningen (ibid).

Vår studie samsvarer derfor med tidligere funn, og styrker hypotesen vår om at antioksidanttilskudd hemmer den treningsinduserte økningen i proteinnivå av COX4. Det var

imidlertid kun gruppen som fikk tilskudd av C- og E-vitaminer som viste en signifikant reduksjon i forhold til placebogruppen i nivå av COX4, de andre gruppene med antioksidanttilskudd hadde ingen signifikante endringer.

I motsetning til funnene fra vår studie, viste Yfanti et al. (2010) at økningen i aktiviteten av oksidative enzymer (citrat syntase og β -hydroksyacyl-CoA dehydrogenase) ikke ble påvirket av daglige tilskudd på 500 mg vitamin C og 268 mg vitamin E, over en 16 ukers periode, som inkluderte 12 uker med utholdenhetstrening.

Så vidt det er meg bekjent, finnes det ingen studier som har målt COX4-respons i forbindelse med trening og tilskudd av astaxanthin, og resultatene fra vår studie viser ingen signifikante resultater i endringer av COX4-nivå i gruppen med astaxanthintilskudd. Det kan se ut som astaxanthin har en hemmende effekt i vår studie, ettersom økningen av COX4 er halvert (34 % økning) i forhold til placebogruppens økning (61 % økning), men for å bekrefte astaxanthins påvirkning, er det nødvendig å studere responsen fra flere forsøkspersoner.

4.3 Endringer i proteinnivå av HSP60 som følge av utholdenhetstrening

Utholdenhetstrening forårsaker et oksygenforbruk som påvirker homeostasen av redokspotensialet i cellene (Dröge 2002; Gomez-Cabrera et al. 2008b; Valko et al. 2007). Påvirkningen på homeostasen under en treningsøkt med utholdenhet, vil kunne føre til en økning av reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser (RONS) (ibid). En økning av treningsindusert RONS har blitt koblet til et økt uttrykk av stressproteiner, deriblant HSP60, i skjelettmuskulatur hos mennesker (Khassaf et al. 2001), og i skjelettmuskulatur hos mus (McArdle et al. 2001).

Studier på stressproteinresponser i dyr (Mattson et al. 2000; McArdle et al. 2001; Ornatsky et al. 1995) og i mennesker (Khassaf et al. 2001; Morton et al. 2009c) viser at HSP60-nivå øker etter en periode med utholdenhetstrening. Ornatsky et al. (1995) fant en økning i proteinnivå av HSP60 som respons på kronisk muskelkontraksjon hos rotter (3,2-9,3 ganger utover målt hvilenivå).

Tidligere studier har vist at godt trente individer har et høyere hvilenivå av stressproteiner, samt et bedre endogent antioksidantsystem enn utrente individer (Morton et al. 2008; Smolka

et al. 2000; Yfanti et al. 2010). Morton et al. (2009c) viste at nivå av stressproteiner i muskelvev var avhengig av både langvarig og nåværende treningsinnsats til det enkelte individet. Trente individer hadde en mindre respons på utholdenhetstreningen, trolig fordi musklene allerede hadde opparbeidet en tilpasning til trening som inkluderte høyere hvilenivå av stressproteiner (ibid). Etersom forsøkspersonene i vår studie har trent relativt mye på forhånd er det mulig at de allerede har høye nok verdier av HSP60.

Resultatene fra vår studie viser riktignok en tendens ($p = 0,066$) til treningsindusert økning i proteinnivå av HSP60 når alle gruppene er sett under et, men økningen er bare på 6 %. Dette funnet stemmer overens med tidlige funn, hvor treningsinduserte responser, som for eksempel nivå av oksidative enzymer (Yfanti et al. 2010; Zoll et al. 2006) og stressproteiner (HSP60) (Morton et al. 2008; Morton et al. 2009c) ikke forandret seg mye i på forhånd godt trente individer.

Når mitokondriell biogenese (COX4) øker som følge av utholdenhetstrening, øker også nivå av proteiner som deltar i transport over mitokondriemembranen, herunder HSP60 (Hood et al. 2003; Ornatsky et al. 1995). HSP60 sørger blant annet for korrekt folding av de nydannende proteinene (Karlin & Brocchieri 2000; Locke Marius 2002). Når mitokondrieaktiviteten øker, øker oksidasjon av molekyler (RONS) (Hargreaves & Spriet 2006), og dermed øker også nivå av stressproteiner (HSP60); som trolig reguleres av RONS (Khassaf et al. 2003). Det burde derfor være en sammenheng mellom oppregulering av COX4 og HSP60.

Resultatene fra vår studie viser en korrelasjon ($p = 0,05$) mellom endring i COX4-nivå og HSP60-nivå i placebogruppen. Dette samsvarer med teorien om at mitokondriell biogenese fører til økt nivå av stressproteiner (Locke Marius 2002; Morton et al. 2008).

4.3.1 Effekt av antioksidanttilskudd på nivå av HSP60

Det er få studier som viser signifikante endringer i HSP60-nivå som respons på utholdenhetstrening med antioksidanttilskudd. Det er derfor, i denne masteroppgaven, ofte referert til studier som har testet andre stressproteiner og endogene forsvarsmekanismer som har liknende funksjoner som HSP60. Khassaf et al. (2003) utførte en studie der 7 utrente individer (mennesker) fikk tilskudd av 500 mg vitamin C over en 8 ukers periode, hvorav HSP60 og HSP70 fra *m. vastus lateralis* ble målt etter et utholdenhetsarbeid. Individene med C-vitamintilskudd hadde en mindre økning av HSP70 etter utholdenhetsarbeidet enn

kontrollgruppen, men dette skyldtes trolig en økning i hvilenivå av både stressproteiner og andre beskyttende enzymer mot oksidativt stress (superoksid-dismutase og katalase). De fant derimot ingen signifikante resultater for HSP60 (ibid). Et liknende resultat vises i Jackson et al. (2004) hvor 22 utrente individer (mennesker) fikk tilskudd av 400 mg vitamin E over en 8 ukers periode. Tilskudd av vitamin E førte til et høyere hvilenivå av HSP70 (i *m. vastus lateralis*), og dermed en mindre respons på utholdenhetsarbeidet. Det var ingen signifikante endringer i HSP60-nivå, men endringen viste samme tendens som for HSP70 (ibid).

Våre resultater viser ingen forskjell i endring av HSP60-nivåene mellom gruppene som fikk tilskudd av antioksidanter og gruppen som fikk placebotilskudd. En mulig forklaring på dette, kan være at ettersom godt trente individer har tilvendt seg et høyt oksidativt stress, har de opparbeidet seg forsvarsmekanismer som gjør at redokspotensialet til cellen under hver treningsøkt ikke påvirkes like mye som hos utrente individer, som har et dårligere endogent antioksidantforsvar (Yfanti et al. 2010). Dette vil trolig kunne gi mindre virkning av antioksidantene hos trente individer, og større påvirkning hos utrente (ibid). Ingen av intervensjonsgruppene alene i vår studie viste signifikante endringer i nivå av HSP60, som mulig kan skyldes at det var for få forsøkspersoner inkludert i hver gruppe.

Det er imidlertid andre studier som viser direkte hemmende effekt av antioksidanttilskudd; Fischer et al. (Fischer et al. 2006) viste at tilskudd av α -tokoferol (294 mg), γ -tokoferol (87 mg) og vitamin C (500 mg) i 28 dager før et utholdenhetsarbeid, la en demper på økning av endogene forsvarsmekanismer hos mennesker i form av redusert nivå av HSP70 (Fischer et al. 2006). Gomez-Cabrera et al. (2008a) viste at et daglig inntak av 1000 mg vitamin C over en 8 ukers periode med utholdenhets trening, hemmet det endogene antioksidantforsvaret (mangan superoksid-dismutase og glutatjon peroksidase) hos rotter.

For å hindre oksidativt stress, jobber antioksidanter sammen i et nettverk for å opprettholde riktig balanse mellom reduserte og oksiderte substrater (Powers & Jackson 2008). Store doser med tilsatte antioksidanter i kosten, kan derfor tenkes å hjelpe systemet i å opprettholde balansen ved at flere oksidanter som oppstår under trening fjernes. Det kan også tenkes at tilskudd vil ødelegge homeostasen, ved at balansen ikke lenger er under kontroll, på grunn av for store mengder antioksidanter (ibid). Antioksidanter har i flere studier vist seg å øke markører for oksidativt stress etter utholdenhets trening (Close et al. 2006; Knez et al. 2007; Lamprecht et al. 2009; Nieman et al. 2004). I motsetning, har en kombinasjon av C- og E-

vitamintilskudd i forbindelse med utholdenhetstrening vist seg å dempe oksidativt stress og inflammasjon (Fischer et al. 2004; Schröder et al. 2000; Zoppi et al. 2006). I vår studie er det ingen markører som måler oksidativt stress direkte, men nivå av stressproteiner (HSP60) bør gi en indikasjon på nivå av oksidativt stress. Uansett vil høyt nivå av oksidanter påvirke homeostasen i cellene, og dette vil igjen kunne påvirke mengde HSP60 som skiller ut (Khassaf et al. 2003; Powers & Jackson 2008).

Astaxanthin har tidligere vist seg å dempe markører på oksidativt stress i mus i forbindelse med utholdenhetstrening (Ikeuchi et al. 2006). Ranga Rao et al. (2010) fant en økning av antioksidantzymer (katalase, superoksiddismutase, peroksidase) etter tilskudd av astaxanthin i rotter. I vår studie var det ingen signifikante forskjeller i HSP60-respons mellom kontrollgruppe og grupper som fikk tilskudd av astaxanthin.

Proteinnivåene av HSP60 i membranfraksjonen så altså ut til å øke moderat som respons på utholdenhetstrening, men antioksidantene hadde ingen påvirkning på denne økningen. Selv om antioksidantene ikke påvirket HSP60-respons i mitokondriene (membranfraksjon), har det tidligere i vår studie, av en annen masterstudent, blitt målt reduserte HSP60-nivåer i cytosolfraksjonen i gruppen som fikk tilskudd av C- og E-vitaminer. Dermed vil hypotesen om at antioksidanter hemmer treningsindusert økning av HSP60, kunne gjelde for cytosolfraksjonen, men ikke for membranfraksjonen i vår studie.

4.4 Endringer i VO_{2maks} som følge av utholdenhetstrening

Flere studier viser at utholdenhetstrening fører til en økning i VO_{2maks} hos mennesker (Aguiló et al. 2007; Arent et al. 2010; Gomez-Cabrera et al. 2008a; Hiruntrakul et al. 2010; Rankovic et al. 2010; Roberts et al. 2011; Santtila et al. 2008). Yfanti et al. (2010) gjorde en liknende studie som denne, der på forhånd trente menn syklet på høy intensitet 5 ganger i uken i 16 uker, hvorav VO_{2maks} økte med 20 %. I vår studie øker VO_{2maks} i kontrollgruppen, men i mindre grad (6,4 %) enn i studien til Yfanti et al. (2010).

Økningen i VO_{2maks} i vår studie er lavere enn økningen som ble observert i proteinnivå av COX4 (61 %). En årsak som kan skyldes denne store differansen er at VO_{2maks} ikke er direkte relatert til mitokondriekapasitet (Bassett & Howley 1997; Bassett & Howley 2000; Hill & Lupton 1923; Poole & Richardson 1997). Det er flere studier som har vist at det hovedsakelig

er transporten av oksygen til muskulaturen, og ikke mitokondriekapasiteten, som er den begrensende faktoren for VO_{2maks} (ibid).

Resultatet fra vår studie støtter funn fra 1981 (Davies et al.), hvor VO_{2maks} kun økte med 14 % til tross for en 100 % økning i oksidativ kapasitet i rottemuskulatur. I likhet med vår, og med Davies et al. (1981) sin studie, fant Gomez-Cabrera et al. (2008a) at rotter som trente utholdenhet i 6 uker, hadde en mindre økning i VO_{2maks} (17 %) enn økningen som indikerte oksidativ kapasitet i musklene, målt i cytokrom c (~150 %). Det var derfor ventet at økningen i nivå av det mitokondrielle enzymet COX4, ikke skulle samsvare med en like stor økning i VO_{2maks} som respons på utholdenhetstrening.

4.4.1 Effekt av antioksidanttilskudd på VO_{2maks}

Det framgår studier som viser at antioksidanter ikke påvirker endringer i VO_{2maks} (Aguiló et al. 2007; Arent et al. 2010; Gomez-Cabrera et al. 2008a; MacRae & Mefferd 2006; Roberts et al. 2011; Zhou et al. 2005). I en tilnærmet lik studie som vår studie, hvor C- og E-vitaminer ble gitt i en kombinasjon (henholdsvis 500 og 268mg/d) i 16 uker, hvorav 12 uker var utholdenhetstrening (sykling), ble det ikke observert noen forskjell i framgang av VO_{2maks} mellom gruppe med vitamintilskudd (17 % økning) og placebogruppe (20 % økning) (Yfanti et al. 2010). Etersom forsøkspersonene i vår studie er relativt godt trent fra før, forventes det generelt ikke store endringer i VO_{2maks} , til tross for antioksidanttilskudd.

Resultatene fra vår studie samsvarer med tidligere studier (Aguiló et al. 2007; Arent et al. 2010; MacRae & Mefferd 2006; Roberts et al. 2011; Yfanti et al. 2010; Zhou et al. 2005), og den viser at treningen i seg selv førte til en økning i VO_{2maks} på 5,8–7,6 % i alle gruppene.

I motsetning til vår studie, viste Kang et al. (2011) at en kombinasjon av C- og E-vitaminer (henholdsvis 800 og 214mg/d) over en periode på 30 dager, reduserte VO_{2maks} med -3,11 ml/kg/min hos menn som trente regelmessig (n= 59).

Selv om tidligere studier har vist at astaxanthin øker VO_{2maks} i forbindelse med utholdenhetstrening (Earnest et al. 2011), støtter ikke resultatene fra vår studie tidligere funn. Det er viktig å ta i betraktning at ulike resultater kan komme av forskjellig arbeidsbelastning, dose antioksidanter og treningsstatus til individene.

4.5 utfordringer med studien

En mulig svakhet med en slik type studie kan være enkeltindividets helsetilstand underveis i studien, og eventuell overtrening som påvirker restitusjon og utbytte av treningsøktene. Slike parametere ble ført i dagbok med tilhørende pulsregistrering, som gjorde at vi hadde oversikt på eventuelle avvik fra treningsprotokollen. Det er også individuelle forskjeller i respons på vitamintilskudd, med en variasjon på 20-80 % i absorpsjon og opptak (Nes et al. 2006). Opptak avhenger av fettinntaket i kosten, hvorav HDL-kolesterolet trolig frakter mer tokoferol enn LDL. Store mengder vitamininntak gjør at absorpsjonen minker i kroppen (ibid). Det er også individuelle forskjeller i proteinresponser, fordi responsene kan være avhengige av hormonelle forandringer i kroppen (Borrás et al. 2003; Paroo et al. 1999), og vil da variere mellom kjønn og individer. Morton et al. (2009b) fant kjønnsmessige forskjeller i treningsindusert HSP60-nivå i *m. vastus lateralis* etter 6 uker med utholdenhetstrening. Det optimale i vår studie, ville vært å utføre et kryssoverdesign, slik at de individuelle forskjellene ikke hadde variert fra gruppe til gruppe, men dette ville samtidig vært altfor tidkrevende og vanskelig å gjennomføre, blant annet med rekruttering av forsøkspersoner.

Type antioksidant (for eksempel om den er vann- eller fettløselig) kan spille en viktig rolle med hensyn på oksidativt stress (Bryant et al. 2003). I studien til Bryant et al. (2003) viste det seg at vitamin E senket markører for oksidativt stress, mens vitamin C førte til en økning av de samme markørene. En kombinasjon av C- og E-vitaminer derimot, viste seg ikke å ha noen effekt på oksidativt stress (ibid).

Løping som treningsmetode, inkluderer flere muskler enn *vastus lateralis* som er utgangspunktet for vevstakingen, og dette kan føre til unøyaktige resultater (Hargreaves & Spriet 2006). Morton et al. (2009a) analyserte vevsprøver fra både legg- (*gastrocnemius*) og lårmuskulatur (*vastus lateralis*) etter en periode med 6 uker utholdenhetstrening (løping), hvorav endring i nivå av COX4 var forskjellig mellom *gastrocnemius* (150 % økning) og *vastus lateralis* (118 % økning), men HSP60-nivåene hadde tilnærmet lik økning i begge musklene.

Western blotting er tidkrevende, og består av mange trinn (Lea 2006). Riktig inkubering med antistoff og enzymsubstrater er viktig for at proteinene som skal analyseres fester seg til membranen og kan detekteres. Valg av blokkeringsbuffer og blokkeringstid, er viktig for å hindre uspesifikk binding til membranen som kan skape bakgrunnsstøy i bildet (ibid). Det er

ikke fokusert på mulige feilkilder fra western blottingen, da reproduserbarheten, som gjenspeiler den tekniske utførelsen av hvert trinn i analyseprosessen, viser gode samsvar mellom de aller fleste analyser. Den gjennomsnittlige prosentvise forskjellen mellom to like analyser lå på 10,2 % for HSP60, og på 24,0 % for COX4. Feil som ble observert underveis, ble nøye korrigert for.

Vevsprøvene i vår studie har blitt tatt alt fra 1 til 5 dager etter siste treningsøkt, og denne tidsdifferansen kan gi opphav til forskjeller mellom forsøkspersoner når det gjelder proteinnivå i muskelen. Maksimal økning i HSP60-proteinnivå har tidligere blitt observert alt fra 1 til 6 dager etter endt treningsøkt, hvorav tiden var avhengig av individenes tidligere treningsstatus (Khassaf et al. 2001; Morton et al. 2006). Individuer som var godt trent, med et høyere hvilenivå av stressproteiner, hadde en mindre og tregere respons på utholdenhetsøkten (72 timer-6 dager). Individuer som var dårligere trent, med lavere hvilenivå av stressproteiner, hadde en raskere (24-48 timer) og større respons (ibid).

I vår studie måles mengde protein, men den direkte aktiviteten til proteinet måles ikke. Little et al. (2010) viste at det var samsvar mellom økning av aktivitet (29 % økning målt i mmol/kg protein/time) og økning i mengde av COX4 (38 % økning), derfor kan det antas at aktiviteten vil øke når mengden øker.

Tilfeldige variasjoner som avviker veldig fra gruppens gjennomsnitt, blir mer ødeleggende for resultatet når utvalget er mindre, dette gjelder spesielt i gruppene med astaxanthin- og Smartfishtilskudd som kun har 10-11 forsøkspersoner.

4.6 Videre forskning

Sammenlikninger mellom ulike studier er vanskelige fordi mange faktorer varierer. Dette er faktorer som treningsprotokoll, antioksidantdose, periode med antioksidanttilskudd, hvilken muskelgruppe som er eksaminert, samt utgangsnivå av stressproteiner. Alle disse faktorene spiller en rolle i treningsindusert regulering av proteinnivå i muskelen. Til tross for at det er få studier som har blitt gjort på mennesker, er det prøvd å sammenlikne med de studier som likner mest på vår studie. Funnene fra vår studie utelukker ikke muligheten for at antioksidanttilskudd kan ha andre effekter på proteinnivå hvis de gis til eldre eller mindre trente individer, eller individer som er i underskudd på vitaminer.

Til videre forskning vil det være interessant å gjøre analyser på nivå av proteiner både på utrente og trente personer, samt i forskjellige muskler, og mellom kjønn, for å se om responsen varierer. Videre vil det være interessant å teste ut om de forsøkspersonene som har trent mye (4 dager i uka), har en mindre økning enn forsøkspersonene som på forhånd har trent mindre (1 dag i uka). Det vil også være av interesse å måle tidsdifferanser for syntese og degradering av HSP60 som respons på utholdenhetstrening, for å finne en eventuell "optimal" tid for vevstaking i forhold til siste treningsøkt. I vår studie har det kun blitt målt proteinmengder, og det vil i videre forskning være interessant også å måle enzymaktivitet av COX4 og HSP60, samt andre enzymer som er medvirkende i mitokondriell biogenese.

En annen faktor som vil styrke resultatene er å måle forsøkspersonenes absorpsjon og opptak (i muskelen) av de ulike antioksidantene, samt å måle nivå av oksidativt stress direkte, for å kunne se om det er en sammenheng i nivå av stressproteiner og nivå av markører for oksidativt stress. Ettersom transkripsjonsfaktorer ofte aktiveres hurtigere som respons på trening og faller raskere tilbake til utgangsnivå, enn translasjonen av proteiner (Ljubacic et al. 2010), vil det også være interessant å måle den akutte treningsresponsen av transkripsjonsfaktorer og andre proteiner som regulerer COX4.

5 Konklusjon

Hypotese 1: Et daglig inntak av 1000 mg C-vitamin og 235 mg E-vitamin, over en 12 ukers periode med utholdenhetstrening, vil dempe den treningsinduserte økningen i proteinnivå av COX4 og HSP60.

Det stemte at C- og E-vitaminer blokkerte den treningsinduserte økningen av COX4-nivå, og dermed kan hypotesen beholdes for COX4. Det er derimot mer usikkert når det gjelder HSP60-nivå. Resultatene fra tidligere målinger av cytosolfraksjoner, avslørte at C- og E-vitaminene hemmet den treningsinduserte økningen i HSP60-nivå. Men da membranfraksjonen av cellen ble analysert, var det derimot ingen forskjeller i HSP60-nivå mellom gruppene som fikk antioksidanttilskudd og gruppen som fikk placeboprodukter.

Hypotese 2: Et daglig inntak av 4 mg astaxanthin, over en 12 ukers periode med utholdenhetstrening, vil dempe den treningsinduserte økningen i proteinnivå av COX4 og HSP60.

Det er ikke mulig å konkludere om virkningen av astaxanthin regulerte treningsinduserte endringer i nivå av COX4, da endringene ikke var signifikante. Endringer i nivå av HSP60 så ikke ut til å bli påvirket av astaxanthin, da alle gruppene viste samme tendens. Hypotesen kan ikke beholdes, og det er nødvendig med mer forskning på område, samt flere forsøkspersoner, for å kunne si noe om astaxanthins påvirkning på nivå av muskelproteiner.

Basert på resultatene fra vår studie og fra tidligere funn, er det foreløpig ikke noe som taler for å ta tilskudd av antioksidanter for å fremme muskulære tilpasninger til utholdenhetstrening.

Referanser

- Aguiló, A., Tauler, P., Sureda, A., Cases, N., Tur, J. & Pons, A. (2007). Antioxidant diet supplementation enhances aerobic performance in amateur sportsmen. *Journal of Sports Sciences*, 25 (11): 1203-1210.
- Alberts, B. (2004). *Essential cell biology*. New York: Garland Science. XXI, 740, [102] s. s.
- Alessio, H., Goldfarb, A. & Cao, G. (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr*, 7 (1): 9.
- Arent, S., Pellegrino, J., Williams, C., Difabio, D. & Greenwood, J. (2010). Nutritional supplementation, performance, and oxidative stress in college soccer players. *J Strength Cond Res*, 24 (4): 7.
- Arnold, S. & Kadenbach, B. (1999). The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Letters*, 443 (2): 105-108.
- Artioli, G., Gualano, B., Smith, A., Stout, J. & Lancha, A. J. (2010). Role of [beta]-Alanine Supplementation on Muscle Carnosine and Exercise Performance. *Med Sci Sports Exerc.*, 42 (6): 1162-73.
- Asha Devi, S., Prathima, S. & Subramanyam, M. V. V. (2003). Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. *Experimental Gerontology*, 38 (3): 285-290.
- Ashton, T., Young, I. S., Peters, J. R., Jones, E., Jackson, S. K., Davies, B. & Rowlands, C. C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *Journal of Applied Physiology*, 87 (6): 2032-2036.
- Atherton, P. J., Babraj, J. A., Smith, K., Singh, J., Rennie, M. J. & Wackerhage, H. (2005). Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *The FASEB Journal*.
- Bassett, D. & Howley, E. (1997). Maximal oxygen uptake: "classical" versus "contemporary" viewpoints. 29:591– 603, 1997. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29: 12.
- Bassett, D. & Howley, E. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc.*, 32 (1): 14.

- Bengtsson, J., Gustafsson, T., Widegren, U., Jansson, E. & Sundberg, C. (2001). Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflugers Arch.*, 443 (1): 5.
- Bennedson, M., Wang, X., Willén, R., Wadström, T. & Andersen, L. P. (2000). Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters*, 70 (3): 185-189.
- Borg, G. (1998). *Borg's Perceived exertion and pain scales*. Champaign, Ill.: Human Kinetics.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F. V. & Viña, J. (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (5): 546-552.
- Boveris, A. & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 128 (3): 13.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemistry Journal*, 134 (3): 12.
- Bryant, R., Ryder, J. W., Martino, P., Kim, J. & Craig, B. (2003). Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists. *J Strength Cond Res*, 17 (4): 792-800.
- Campbell, M. K. (1991). *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders College Publ. xxiii, 622, [57] s. s.
- Chang, C.-K., Huang, H.-Y., Tseng, H.-F., Hsuuw, Y.-D. & Tso, T. K. (2007). Interaction of vitamin E and exercise training on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscles. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18 (1): 39-45.
- Close, G., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., Holloway, C., McArdle, F. & Maclaren, D. (2006). Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. *Br J Nutr*, 95 (5): 5.
- Close, G. & Jackson, M. (2008). The use of in vivo microdialysis techniques to detect extracellular ROS in resting and contracting skeletal muscle. *Methods Mol. Biol.* (477): 13.
- Close, G. L., Ashton, T., McArdle, A. & Jackson, M. J. (2005). Microdialysis studies of extracellular reactive oxygen species in skeletal muscle: Factors influencing the reduction of cytochrome c and hydroxylation of salicylate. *Free Radical Biology and Medicine*, 39 (11): 1460-1467.

- Cochran, A. J. R., Little, J. P., Tarnopolsky, M. A. & Gibala, M. J. (2010). Carbohydrate feeding during recovery alters the skeletal muscle metabolic response to repeated sessions of high-intensity interval exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, 108 (3): 628-636.
- Connor, M. K., Irrcher, I. & Hood, D. A. (2001). Contractile Activity-induced Transcriptional Activation of Cytochrome c Involves Sp1 and Is Proportional to Mitochondrial ATP Synthesis in C2C12 Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (19): 15898-15904.
- Dahl, H. A. (2005). *Klar - ferdig - gå!: grunnbok i aktivitetsfysiologi*. Oslo: Cappelen akademisk forl. 248 s. s.
- Dahl, H. A. (2008). *Mest om muskel: essensiell muskelbiologi*. Oslo: Cappelen akademisk. 240 s. s.
- Davies, K., Packer, L. & Brooks, G. (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 209 (2): 15.
- deOliveira, S., Diniz, D. & Amaya-Farfan, J. (2003). Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. *Br J Nutr*, 89 (1): 7.
- Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E. & Tappel, A. L. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*, 45 (6): 927-932.
- Drevon, C. A., Bjørneboe, G.-E. A. & Blomhoff, R. (2007). *Mat og medisin: nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring*. Kristiansand: Høyskoleforl. 707 s. s.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95.
- Earnest, C. P., Lupo, M., White, K. M. & Church, T. S. (2011). Effect of Astaxanthin on Cycling Time Trial Performance. *Int J Sports Med*, 32 (EFirst): 882,888.
- Feige, U. (1996). *Stress-inducible cellular responses*. Basel: Birkhäuser Verlag. XII, 492 s. s.
- Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjöberg, L.-B. & Pedersen, B. K. (2004). Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 558 (2): 633-645.

- Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjöberg, L.-B., Febbraio, M. A. & Pedersen, B. K. (2006). Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. *Journal of Applied Physiology*, 100 (5): 1679-1687.
- Freyssenet, D., Connor, M. K., Takahashi, M. & Hood, D. A. (1999). Cytochrome c transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 277 (1): E26-E32.
- Fry, A., Schilling, B., Chiu, L., Hori, N. & Weiss, L. (2004). Fiber type-specific responses to perceptions of delayed onset muscle soreness with astaxanthin supplementation. *Med Sci Sports Exerc.*, 36 (5).
- Gaeini, A., Rahnama, N. & Hamedinia, M. (2006). Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress at rest and after exercise to exhaustion in athletic students. *J Sports Med Phys Fitness*, 46 ((3)): 458-61.
- Goldfarb, A., Bloomer, R. & McKenzie, M. (2005). Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 37 (2): 6.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J. & Viña, J. (2008a). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (1): 142-149.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. & Viña, J. (2008b). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (2): 126-131.
- Gordon, J. W., Rungi, A. A., Inagaki, H. & Hood, D. A. (2001). Selected Contribution: Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90 (1): 389-396.
- Grossman, L. I. & Lomax, M. I. (1997). Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1352 (2): 174-192.
- Guerin, M., Huntley, M. E. & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21 (5): 210-216.
- Gupta, S. & Knowlton, A. A. (2002). Cytosolic Heat Shock Protein 60, Hypoxia, and Apoptosis. *Circulation*, 106 (21): 2727-2733.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52 (8): 12.

- Hargreaves, M. & Spriet, L. L. (2006). *Exercise metabolism*. Champaign, IL: Human Kinetics. IX, 301 s. S.
- Hill, A. & Lupton, H. (1923). Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. . *Q.J.Med.*, 16: 36.
- Hill, A. M., Buckley, J. D., Murphy, K. J. & Howe, P. R. (2007). Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85 (5): 1267-1274.
- Hiruntrakul, A., Nanagara, R., Emashiti, A. & Borer, K. (2010). Effect of once a week endurance exercise on fitness status in sedentary subjects. *J Med Assoc Thai*, 93 (9): 4.
- Hoffman, J. R., Ratamess, N. A., Faigenbaum, A. D., Ross, R., Kang, J., Stout, J. R. & Wise, J. A. (2008). Short-duration β -alanine supplementation increases training volume and reduces subjective feelings of fatigue in college football players. *Nutrition Research*, 28 (1): 31-35.
- Hood, D. A. (2001). Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90 (3): 1137-1157.
- Hood, D. A., Adihetty, P., Colavecchia, M., Gordon, J., Irrcher, I., Joseph, A., Lowe, S. & Rungi, A. (2003). Mitochondrial Biogenesis and the Role of the Protein Import Pathway. *Med Sci Sports Exerc.*, 35 (1): 8.
- Hood, D. A. & Saleem, A. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17 (5): 332-337.
- Hoppeler, H. & Weibel, E. R. (2000). Structural and functional limits for oxygen supply to muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168 (4): 445-456.
- Howald, H., Segesser, B. & Körner, W. F. (1975). ASCORBIC ACID AND ATHLETIC PERFORMANCE. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 258 (1): 458-464.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- Hüttemann, M., Kadenbach, B. & Grossman, L. I. (2001). Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, 267 (1): 111-123.
- Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J. & Yazawa, K. (2006). Effects of Astaxanthin Supplementation on Exercise-Induced Fatigue in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (10): 2106-2110.

- Jackson, M. (2008). Free radicals generated by contracting muscle: By-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (2): 132-141.
- Jackson, M. J. (1987). Muscle damage during exercise: possible role of free radicals and protective effect of vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, 46 (01): 77-80.
- Jackson, M. J., Khassaf, M., Vasilaki, A., McArdle, F. & McArdle, A. (2004). Vitamin E and the Oxidative Stress of Exercise. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031 (1): 158-168.
- Jessup, J. V., Horne, C., Yarandi, H. & Quindry, J. (2003). The Effects of Endurance Exercise and Vitamin E on Oxidative Stress in the Elderly. *Biological Research For Nursing*, 5 (1): 47-55.
- Kang, S. W., Hahn, S., Kim, J.-K., Yang, S.-M., Park, B.-J. & Chul Lee, S. (2011). Oligomerized lychee fruit extract (OLFE) and a mixture of vitamin C and vitamin E for endurance capacity in a double blind randomized controlled trial. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, advpub: 1110140114-1110140114.
- Kanter, M. M., Nolte, L. A. & Holloszy, J. O. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *Journal of Applied Physiology*, 74 (2): 965-969.
- Karlin, S. & Brocchieri, L. (2000). Heat shock protein 60 sequence comparisons: Duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (21): 11348-11353.
- Karlsson, J., Diamant, B., Theorell, H. & Folkers, K. (1993). Ubiquinone and α -tocopherol in plasma; means of translocation or depot. *The clinical investigator*, 71 (8): S84 - S91.
- Karlsson, J. (1997). *Antioxidants and exercise*. Champaign, Ill.: Human Kinetics. x, 211 s., ill. s.
- Kern, B. D. & Robinson, T. L. (2011). Effects of β -alanine supplementation on performance and body composition in collegiate wrestlers and football players. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25.
- Khassaf, M., Child, R. B., McArdle, A., Brodie, D. A., Esanu, C. & Jackson, M. J. (2001). Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *Journal of Applied Physiology*, 90 (3): 1031-1035.
- Khassaf, M., McArdle, A., Esanu, C., Vasilaki, A., McArdle, F., Griffiths, R. D., Brodie, D. A. & Jackson, M. J. (2003). Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 549 (2): 645-652.

- Knez, W., Jenkins, D. & Coombes, J. S. (2007). Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc.*, 39 (2): 5.
- Kobayashi, M. (2000). In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (4): 550-555.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30 (6): 620-650.
- Kupcinskas, L., Lafolie, P., Lignell, Å., Kiudelis, G., Jonaitis, L., Adamonis, K., Andersen, L. P. & Wadström, T. (2008). Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomedicine*, 15 (6–7): 391-399.
- Lamprecht, M., Hofmann, P., Greilberger, J. & Schwabegger, G. (2009). Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 19 (4): 14.
- Lanza, I. R. & Sreekumaran Nair, K. (2010). Regulation of skeletal muscle mitochondrial function: genes to proteins. *Acta Physiologica*, 199 (4): 529-547.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. Bergen: Fagbokforl. 400 s. s.
- Lenka, N., Vijayasathy, C., Mullick, J. & Avadhani, N. (1998). Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Mol Biol.*, 61: 35.
- Little, J. P., Safdar, A., Wilkin, G. P., Tarnopolsky, M. A. & Gibala, M. J. (2010). A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *The Journal of Physiology*, 588 (6): 1011-1022.
- Liu, Y., Lormes, W., Baur, C., Opitz-Gress, A., Altenburg, D., Lehmann, M. & Steinacker, J. M. (2000). Human Skeletal Muscle HSP70 Response to Physical Training Depends on Exercise Intensity. *Int J Sports Med*, 21 (05): 351,355.
- Ljubicic, V., Joseph, A., Saleem, A., Uquccioni, G., Collu-Marchese, M., Lai, R., Nguyen, L. & Hood, D. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1800 (3): 11.

- Locke Marius, N. G. E. (red.). (2002). *Exercise and the stress respons: The role of stress proteins*. Boca Raton, Florida: CRC press. 226 s.
- MacRae, H. & Mefferd, K. (2006). Dietary antioxidant supplementation combined with quercetin improves cycling time trial performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 16 (4): 14.
- Mannion, A., Jakeman, P., Dunnett, M., Harris, R. & Willan, P. (1992). Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 64 (1): 47-50.
- Marber, M. S., Mestril, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., Yellon, D. M. & Dillmann, W. H. (1995). Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 95 (4): 1446-1456.
- Marshall, R. J., Scott, K. C., Hill, R. C., Lewis, D. D., Sundstrom, D., Jones, G. L. & Harper, J. (2002). Supplemental Vitamin C Appears to Slow Racing Greyhounds. *The Journal of Nutrition*, 132 (6): 1616S-1621S.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2000). *Biochemistry*. San Francisco, Calif.: Benjamin/Cummings. XXVIII, 1186 s. s.
- Mattson, J., Ross, C., Kilgore, J. & Musch, T. (2000). Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Med Sci Sports Exerc.*, 32 (2): 4.
- Maughan, R. J., Depiesse, F. & Geyer, H. (2007). The use of dietary supplements by athletes. *Journal of Sports Sciences*, 25 (sup1): S103-S113.
- McArdle, A. & Jackson, M. J. (2000). Exercise, oxidative stress and ageing. *Journal of Anatomy*, 197: 539-541.
- McArdle, A., Pattwell, D., Vasilaki, A., Griffiths, R. D. & Jackson, M. J. (2001). Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280 (3): C621-C627.
- McArdle, W. D., Katch, V. L. & Katch, F. I. (2007). *Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. LXXI, 1068 s. s.
- Meydani, M., Evans, W. J., Handelman, G., Biddle, L., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Burrill, J., Fiatarone, M. A., Blumberg, J. B. & Cannon, J. G. (1993). Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264 (5): R992-R998.

- Morton, J., Maclaren, D., Cable, N., Campbell, I., Evans, L., Kayani, A., McArdle, A. & Drust, B. (2008). Trained men display increased basal heat shock protein content of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.*, 40 (7): 7.
- Morton, J. P., Maclaren, D. P. M., Cable, N. T., Bongers, T., Griffiths, R. D., Campbell, I. T., Evans, L., Kayani, A., McArdle, A. & Drust, B. (2006). Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*, 101 (1): 176-182.
- Morton, J. P., Croft, L., Bartlett, J. D., Maclaren, D. P. M., Reilly, T., Evans, L., McArdle, A. & Drust, B. (2009a). Reduced carbohydrate availability does not modulate training-induced heat shock protein adaptations but does upregulate oxidative enzyme activity in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 106 (5): 1513-1521.
- Morton, J. P., Holloway, K., Woods, P., Cable, N. T., Burniston, J., Evans, L., Kayani, A. C. & McArdle, A. (2009b). Exercise training-induced gender-specific heat shock protein adaptations in human skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 39 (2): 230-233.
- Morton, J. P., Kayani, A. C., McArdle, A. & Drust, B. (2009c). The Exercise-Induced Stress Response of Skeletal Muscle, with Specific Emphasis on Humans. *Sports Medicine*, 39 (8): 643-662
10.2165/00007256-200939080-00003.
- Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4): 1150-1154.
- Nancy J, B. (1995). Isolation and characterization of the functional gene encoding bovine cytochrome c oxidase subunit IV. *Gene*, 162 (2): 313-318.
- Napiwotzki, J. & Kadenbach, B. (1998). Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol Chem.*, 379 (3): 4.
- Nes, M., Müller, H., Pedersen, J. I. & Eeg-Larsen, N. (2006). *Ernæringslære*. Oslo: Gyldendal akademisk. 416 s. s.
- Nieman, D., Henson, D., McAnulty, S., McAnulty, L., Morrow, J., Achmed, A. & Heward, C. (2004). Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc.*, 36 (8): 7.
- Niess, A. & Simon, P. (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise: the role of reactive oxygen species. *Medical Clinic, Department of Sports Medicine, University of Tuebingen, Germany*, 1 (12): 12.

- Niki, E. (1987). Interaction of Ascorbate and α -Tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 498 (1): 186-199.
- Nordic nutrition recommendations: NNR 2004 : integrating nutrition and physical activity.* (2004).
NORD, b. 2004:13. [København]: Nordisk Ministerråd. 435 s. s.
- Novelli, G., Bracciotti, G. & Falsini, S. (1990). Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med.*, 8 (1): 4.
- Okamura K, Doi T, Sakurai M, Hamada K, Yoshioka Y, Sumida S & Y, S.-K. (1997). Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxy-deoxyguanosine content in dogs. *Free Radic. Res.*, 26 (6): 5.
- Ornatsky, O. I., Connor, M. K. & Hood, D. A. (1995). Expression of stress proteins and mitochondrial chaperonins in chronically stimulated skeletal muscle., 1: 119-23.
- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of Sports Sciences*, 15 (3): 353-363.
- Paroo, Z., Peter, M. T. & Earl, G. N. (1999). Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 80 (3): 180-184.
- Patil, S., Chaudhuri, D. & Dhanakshirur, G. (2009). Role of alphatocopherol in cardiopulmonary fitness in endurance athletes, cyclists. *Ind J Physiol Pharmacol*, 53 ((4)): 375-9.
- Patwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. A. & Jackson, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (7): 1064-1072.
- Peternelj, T.-T. & Coombes, J. S. (2011). Antioxidant Supplementation during Exercise Training: Beneficial or Detrimental? *Sports Medicine*, 41 (12): 1043-1069 10.2165/11594400-000000000-00000.
- Pikosky, M. A., Gaine, P. C., Martin, W. F., Grabarz, K. C., Ferrando, A. A., Wolfe, R. R. & Rodriguez, N. R. (2006). Aerobic Exercise Training Increases Skeletal Muscle Protein Turnover in Healthy Adults at Rest. *The Journal of Nutrition*, 136 (2): 379-383.
- Poole, D. & Richardson, R. (1997). Determinants of oxygen uptake. Implications for exercise testing. *Sports Medicine*, 24 (5): 12.

- Powers, S. K., Deruisseau, K. C., Quindry, J. & Hamilton, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22 (1): 81-94.
- Powers, S. K. & Jackson, M. J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, 88 (4): 1243-1276.
- Poyton, R. O., Trueblood, C. E., Wright, R. M. & Farrell, L. E. (1988). Expression and Function of Cytochrome c Oxidase Subunit Isologues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 550 (1): 289-307.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. & Spiegelman, B. M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*, 92 (6): 829-839.
- Puntschart, A., Claassen, H., Jostarndt, K., Hoppeler, H. & Billeter, R. (1995). mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 269 (3): C619-C625.
- Pösö, R., Eklund-Uusitalo, S., Hyyppä, S. & Pirilä, E. (2002). Induction of heat shock protein 72 mRNA in skeletal muscle by exercise and training. *Equine Vet J Suppl.* (34): 8.
- Quintanilha, A. & Packer, L. (1983). Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. *Department of Medicine, University of Liverpool* (46): 77-80.
- Raastad, T., Høstmark, A. & Strømme, S. (1997). Omega-3 fatty acid supplementation does not improve maximal aerobic power, anaerobic threshold and running performance in well-trained soccer players. *Scand J Med Sci Sports*, 7 (1): 6.
- Radák, Z., Apor, P., Pucsok, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., Nakamoto, H. & Goto, S. (2003). Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sciences*, 72 (14): 1627-1633.
- Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R. L., Baskaran, V., Sarada, R. & Ravishankar, G. A. (2010). Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (15): 8553-8559.
- Rankovic, G., Mutavdzic, V., Toskic, D., Preljevic, A., Kocic, M., Nedin Rankovic, G. & Damjanovic, N. (2010). Aerobic capacity as an indicator in different kinds of sports. *Bosn J Basic Med Sci*, 10 (1): 4.
- Raven, P. H. & Johnson, G. B. (2002). *Biology*. Boston: McGraw-Hill. XXIX, 1238, [70] s. s.

- Reid, M. B., Khawli, F. A. & Moody, M. R. (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of Applied Physiology*, 75 (3): 1081-1087.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R. & Blüher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (21): 8665-8670.
- Ristow, M. & Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, 45 (6): 410-418.
- Roberts, L., Beattie, K., Close, G. & Morton, J. (2011). Vitamin C consumption does not impair training-induced improvements in exercise performance. *Int J Sports Physiol Perform.*, 6 (1): 11.
- Rokitzki, L., Logemann, E., Huber, G., Keck, E. & J., K. (1994). alpha-Tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int J Sport Nutr* (3): 11.
- Sachdev, S. & Davies, K. J. A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 (2): 215-223.
- Santtila, M., Keijo, H., Laura, K. & Heikki, K. (2008). Changes in cardiovascular performance during an 8-week military basic training period combined with added endurance or strength training. *Mil Med*, 173 (12): 4.
- Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T. & Vina, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 263 (5): R992-R995.
- Sawaki, K., Yoshigi, H., Aoki, K. & Koikawa, N. (2002). Sports performance benefits from taking natural astaxanthin characterized by visual acuity and muscular fatigue improvements in humans. *J. Clin. Ther. Med*, 18: 15.
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1576 (1-2): 1-14.
- Schröder, H., Navarro, E., Tramullas, A., Mora, J. & Galiano, D. (2000). Nutrition Antioxidant Status and Oxidative Stress in Professional Basketball Players: Effects of a Three Compound Antioxidative Supplement. *Int J Sports Med*, 21 (02): 146,150.

- Sen, C. K. (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology*, 79 (3): 675-686.
- Sharman, I. M., Down, M. G. & Sen, R. N. (1971). The effects of vitamin E and training on physiological function and athletic performance in adolescent swimmers. *British Journal of Nutrition*, 26 (2): 11.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (23): 10771-10778.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91 (3C): 7.
- Simon-Schnass, I. & Pabst, H. (1988). Influence of vitamin E on physical performance. *Int J Vitam Nutr Res*, 58 (1): 5.
- Smolka, M. B., Zoppi, C. C., Alves, A. A., Silveira, L. R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J. C. & Macedo, D. V. (2000). HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279 (5): R1539-R1545.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (47): 44784-44790.
- Strobel, N., Peake, J., Matsumoto, A., Marsh, S., Doombes, J. & wadley, G. (2011). Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis-. *Med Sci Sports Exerc.*, 43 (6): 8.
- Takahashi, M., Chesley, A., Freyssenet, D. & Hood, D. A. (1998). Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 274 (5): C1380-C1387.
- Thompson, D., Williams, C., McGregor, S., Nicholas, C., McArdle, F., Jackson, M. & Powell, J. (2001). Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Int J Sport Nutr Metab.*, 11 (4): 15.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44-84.

- Vasilaki, A., Mansouri, A., Van Remmen, H., Van Der Meulen, J. H., Larkin, L., Richardson, A. G., McArdle, A., Faulkner, J. A. & Jackson, M. J. (2006). Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell*, 5 (2): 109-117.
- Viña, J., Gomez-Cabrera, M.-C., Lloret, A., Marquez, R., Miñana, J. B., Pallardó, F. V. & Sastre, J. (2000). Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life*, 50 (4-5): 271-277.
- Virbasius, J. V. & Scarpulla, R. C. (1990). The rat cytochrome c oxidase subunit IV gene family: tissue-specific and hormonal differences in subunit IV and cytochrome c mRNA expression. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6581-6586.
- Vogt, M., Puntschart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R. & Hoppeler, H. (2001). Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *Journal of Applied Physiology*, 91 (1): 173-182.
- Wagner, P. D. (1996). Determinants of maximal oxygen transport and utilization. *Annual Review of Physiology*, 58: 21-50.
- Wataru, A., Yuji, N., Kunihiro, S., Masashi, K., Harukuni, T., Takashi, M., Shinya, T., Shigenori, O., Masahiro, Y. & Toshikazu, Y. (2003). Astaxanthin Limits Exercise-Induced Skeletal and Cardiac Muscle Damage in Mice. *Antioxid Redox Signal.*, 5 (1): 5.
- Williams, S. L., Strobel, N. A., Lexis, L. A. & Coombes, J. S. (2006). Antioxidant Requirements of Endurance Athletes: Implications for Health. *Nutrition Reviews*, 64 (3): 93-108.
- Wright, D. C., Han, D.-H., Garcia-Roves, P. M., Geiger, P. C., Jones, T. E. & Holloszy, J. O. (2007). Exercise-induced Mitochondrial Biogenesis Begins before the Increase in Muscle PGC-1 α Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (1): 194-199.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., et al. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell*, 98 (1): 115-124.
- Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., Nielsen, A. R., Mounier, R., Mortensen, O. H., Lykkesfeldt, J., Rose, A. J., Fischer, C. P. & Pedersen, B. K. (2010). Antioxidant Supplementation Does Not Alter Endurance Training Adaptation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42 (7): 1388-1395.
- Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S. & Nelson, B. D. (1999). On the Role of the General Transcription Factor Sp1 in the Activation and Repression of Diverse Mammalian Oxidative Phosphorylation Genes*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31 (2): 129-135.

- Zhang, Q., Wu, Y., Zhang, P., Sha, H., Jia, J., Hu, Y. & Zhu, J. (2012). Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. *Neuroscience* (0).
- Zhang, Y.-Z. & Capaldi, A. R. (1988). Subunit composition of the transmembrane parts of beef heart cytochrome c oxidase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 550: 4.
- Zhou, S., Zhang, Y., Davie, A., Marshall-Gradisnik, S., Hu, H., Wang, J. & Brushett, C. (2005). Muscle and plasma coenzyme Q10 concentration, aerobic power and exercise economy of healthy men in response to four weeks of supplementation. *J Sports Med Phys Fitness*, 45 (3): 9.
- Zoll, J., Ponsot, E., Dufour, S., Doutreleau, S., Ventura-Clapier, R., Vogt, M., Hoppeler, H., Richard, R. & Flück, M. (2006). Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. III. Muscular adjustments of selected gene transcripts. *Journal of Applied Physiology*, 100 (4): 1258-1266.
- Zoppi, C., Hohl, R., Silva, F., Lazarim, F., Neto, J., Stancanneli, M. & Macedo, D. (2006). Vitamin C and e supplementation effects in professional soccer players under regular training. *J Int Soc Sports Nutr*, 13 (3): 7.
- Åstrand, P.-O. & Rodahl, K. (2003). *Textbook of work physiology: physiological bases of exercise*. Champaign, Ill.: Human Kinetics. V, 648 s. s.

Vedlegg

Vedlegg 1: Dosering av antioksidant- og placebotilskudd

Vedlegg 2: Borgs skala

Vedlegg 3: Bergstrøms nålteknikk

Vedlegg 4: Protokoll for Western blot

Vedlegg 5: Beregningsark for volum av prøver og buffere

Vedlegg 6: Tabell over prosentvise endringer i VO_{2maks} , COX4 og HSP60

Vedlegg 1: Dosering av antioksidant- og placebotilskudd

Innhold i, og dosering av de ulike produktene som ble gitt til forsøkspersonene. 1 IU av vitamin E, er det samme som 0,67 mg.

C- og E-vitaminer	Astaxanthin	Smartfish	Placebo
Kapsler: Vitamin C: 250 mg Vitamin E: 88 IU	Kapsler: 4 mg astaxanthin	Juice (med 22 g karbohydrater) Totalt volum: 250 ml (530 kJ) 700 mg Omega 3 (260 mg DHA og 260 mg EPA) 7 g myseprotein isolert 1000 mg β -alanin 1,3 μ g vitamin D3	Tre kapsler. Drikke á 30 g med sukrose og fargetilsetning.
2 tabletter to ganger om dagen, før og etter trening, eller morgen og kveld.	1 tablett hver morgen	2 enheter hver dag: før og etter trening, eller morgen og kveld.	Samme dosering som i de andre gruppene.
Daglig inntak: 1000 mg C-vitamin, 235 mg E-vitamin.	Daglig inntak: 4 mg	Daglig inntak: 1400 mg omega 3 2000 mg beta-alanin 2,6 μ g vitamin D3	

Vedlegg 2: Borgs skala

Borgs skala

- Subjektiv følelse av anstrengelse

Nivå	Følt anstrengelse
6	Hvile
7	Svært lett
8	
9	Meget lett
10	
11	Ganske lett
12	
13	
14	Litt anstrengende
15	
16	Hardt
17	
19	Meget hardt
20	Ekstremt hardt!
	Maksimalt anstrengende!

Kilde: (Borg 1998). Laget av Geir Holden, Norges idrettshøgskole.

Vedlegg 3: Bergstrøms nåltekknikk

Vevstaking



Vedlegg 4: Protokoll for Western blot

Elektroforese og western blot

Forberedelse før elektroforese

Totalprotein	Fra tidligere målinger, målt samme dag eller dagen før	Prøvene kan stå på is i kjøleskap over natt
Sample Preparation Mal	Proteinkonsentrasjonen føres inn og volum beregnes. Prøve før og etter treningsperiode må ha samme mengde (μg) protein.	Hvis proteinmengden er liten, må det et større volum til.
Pipetteringsskjema	Prøver som skal sammenlignes, appliseres på samme gel	Markører på hver gel. Ferdig til bruk.
Merke rør		
Lage ferdig buffere	<u>NuPAGE MES SDS Running buffer</u> 20 x, 2 liter 100 ml MES SDS Running buffer 1900 ml ELGA-vann 500 μl antioksidant (antioksidant tilsettes rett før bruk). Sett i kjøleskap	
	<u>TBS, 1 liter</u> 100 ml TBS 900 ml vann Sett i kjøleskap <u>TBS-T, 1 liter</u> 100 ml TBS 899 ml ELGA-vann 1 ml Tween 20 Rør med magnetrører til Tween er løst opp og sett i kjøleskap	

	<u>ELGA vann, 2 liter</u>	
Sett på varmeblokk	70 °C, sjekk temp.	
Tin prøvene på is		

Prøvefortynning

Fortynn prøvene	Tilsett prøve, vann, sample buffer og reducing agent i henhold til Sample Preparation malen - Mikses og spennes før oppvarming	
Inkuber prøvene	10 min ved 70 °C på varmeblokk	Husk å slå av varmeblokka etter bruk!
Spinn ned prøvene	Sentrifugeres kort	

Mens prøver varmebehandles

Finn fram	2 geler	
	MES SDA Running buffer	
	Antioksidant (500 µl antioksidant)	
	Bench Mark Ladder (1 aliquot a 5 µl per gel)	
	Magic marker: 5 µl	
	Pipetter Printe + utfylle skjema med gel oversikt - Alltid markør i 1. brønn, midtskiktet er alltid mest stabil. - Sørg for at prøvene før og etter treningsperioden kan skilles	
Monter gelene	Klipp opp plasten og tørk av gelene	
	Ta av tapen Fjern kammen ved å skyve den oppover. Skyll brønnene med MES	Pass på at kammen skyves jevnt oppover slik at brønnene ikke ødelegges.

	SDS Running buffer	
	Sett gelene i holderen med teksten ut, brønnene mot innerkammeret	Merk brønnene
Lås gelene	Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen	
Fyll MES SDS Running buffer i kammeret	Tilsett 500 µl antioksidant i 200 ml Running buffer og fyll det indre kammer. <ul style="list-style-type: none"> - Blandes i sylinder + parafilm - Fylles over kanten av brønnen 	Pass på at det ikke lekker buffer ut i det ytre kammeret
	Skyll brønnen i running bufferen	Trekk opp og ned over hver brønn med en pipette
Appliser prøvene	Appliser: <ul style="list-style-type: none"> - prøver - Gene-on markør - (Magic Marker) - Positiv kontroll 	Unngå bobler.
Fyll Running buffer	Tilsett 2/3 av det ytre kammeret med Running buffer uten antioksidant.	
Start elektroforesen	Sett på lokket Monter ledningene, Slå på og still inn volt. Start og ta tida: 200 V og 35 min eller til den blå fargemarkøren ”nesten” forsvinner ut av gel.	Pass på at elektrodene sitter i sporene slik de skal. Sjekk at strømmen ”lager” bobler i indre buffer-kammer. Noter amperverdi ved start og slutt.

Tørrblot (iBLOT):

Utstyr

- Anode stack
- Gel
- Filterpaper

- Blotting roller
- Cathode stack
- Disposable sponge

Kjør iBlot

1. Open the lid of the device
 2. Remove sealing and place the anode stack, bottom with the tray on the blotting surface, aligned to gel barrier on the right.
 3. If possible, mark the membrane (with a pen).
 4. Place pre-run gel on the transfer membrane of the anode stack
 5. Place the pre-soaked iBlot filter paper (soaked in deionized water) on the pre-run gel and remove air bubbles using the Blotting Roller
 6. Remove the sealing of the cathode stack top. Discard the red plastic tray.
 7. Place the cathode stack top, over the pre-soaked filter paper with the electrode side facing up and aligned to the right edge. Remove air bubbles using the blotting roller.
 8. Place the disposable sponge with the metal contact on the upper right corner of the lid.
 9. Close the lid and secure the latch. The red light is on indicating a closed circuit.
 10. Ensure correct program and time are selected
 11. Press the start/stop button. The red light changes to green
 12. Current automatically shuts off at the end of each run. The end of transfer is indicated by beeping sounds, and flashing red light and digital display. Press and release the Start/stop button. The red lights turn to a steady red.
-
13. Klargjør 50 ml 5 % skummet melk til blokkering.
 14. Gelen legges i "Coomassie Brilliant Blue" til videre analyse
 15. Membranen klippes i øverste venstre hjørne, når proteinene vender oppover (Når proteinene vender nedover klippes i øverste høyre hjørne). Markerer! (Evt. flere seder hvis den skal klippes).

Blokkering

Blokkering	Membranene legges i 100 ml 5 % skummet melk - 2 timer i RT	Husk lokk eller parafilm. - 5g pulver i 100 ml TBS-T
------------	---	---

Vasking

Etter blokkering	Skyll 2 x TBS-T	
	2 x 2 min i TBS-T på gyrorocker (65) i RT	

	Klipp av rester hvor det ikke er markør eller prøver, legg i TBS. Klipp membranene i to ved 45 kDa, slik at COX4 og HSP60 kan inkuberes hver for seg.	
--	---	--

Tillaging av 5 ml monoklonal Ab-løsning

1 % skummet melk	0,05 g skummet melk pulver + 5 ml TBS-T + 1 % skummetmelk til neste inkubering	Lag 500 ml 1 % skummetmelk - 5 g pulver - 500 ml TBS-T
	Tin Ab, bland og spinn ned	
lab-løsning	<u>2 rør</u> 1: 1000 (COX4) - 10 µl Ab + 10 ml 1 % skummet melk til hver membran. 1:4000 (HSP60) - 2,5 µl Ab + 10 ml 1 % skummet melk til hver membran.	
	Ta opp membranen med en pinsett og rull den med proteinsiden inn i røret	
	Legg membranene i rør med 1 % skummet melk og Ab	
	Inkuber over natt ved 4 °C på roller mixer (Laveste hastighet)	

Vasking av membraner

Etter inkubering med monoklonalt Ab	Ta opp membranene med en pinsett, rull dem ut og legg dem i boksen igjen	
	Skyll 2 x TBS-T	

	15 min i TBS-T på gyrorocker (65) i RT	
	3 x 5 min i <u>TBS</u> på gyrorocker (65) i RT	

Tillaging av 100 ml polyklonalt Ab-løsning

1 % skummet melk	<u>2 glass</u> 1:30 000 - 6,7 µl Ab + 200 ml 1 % skummet melk - 100 ml til hver membran - Inkuberes i plastbokser	
Goat anti-Mouse IgG		
Sjekk alltid lot nr. og proteinkonsentrasjon		
	Inkuber i 1 time i RT på ristemaskin på lav hastighet	

Vasking

Etter inkubering med polyklonalt Ab	Ta opp membranene med en pinsett, rull dem ut og legg dem i boksen igjen	
	Skyll 2 x TBS-T	
	15 min i TBS-T på gyrorocker (65) i RT	
	3 x 5 min i <u>TBS</u> på gyrorocker (65) i RT	

Substratløsning

Lages under vaskingen	750 µl A + 750 µl B i grønt	
-----------------------	-----------------------------	--

	eppendorfrør	
	Vortex	
	Legg i mørkt skap til bruk. Løsningene er lysømfintlige	

Under vasking

Finn fram	Glassplate/Plastikk lokk fra 96-brønne
	Glasspipette 1000 µl pipette

Fremkalling

Glassplate/plastlokk 96-brønner.	Legg på substrat i lokket/glassplaten med pipette og overfør membranen med proteinsiden ned	-Jobb raskt så membranen ikke tørker - Stryk med en glasspipette slik at det blir et jevnt lag over hele membranen. Hell av overskytende væske
	Inkuber i 3 min under lokk	

Eksponering

Kodak	Åpne Kodak 1D	
	File – New IS2000R capture	
Luminescence	Sett tid og binning	1 min og deretter 20 min. for COX4 og 10 minutter for HSP60 x binning: 4 pixels y binning: none Final accumulation. For seriebilder: trykk etter antall minutter mellom

		hvert intervall – all images
	Trykk preview	
	Legg membranene med proteinsiden ned	Begge får plass i et bilde når ligger under hverandre
	Rull over med en glasspipette	Fjern bobler
	Trykk done	
	Sjekk tid og binning	
	Lukk logg Trykk expose	
	Lagre	Ta ut membranene så raskt som mulig og legg i TBS i kjøleskap.

Vedlegg 5: Beregningsark for volum av prøver og buffere

Totalt volum	60	µl
(faktor)	1,2	
“Loading” volum	50	µl
Protein pr brønn (µg)	22	µg
Sluttkonsentrasjon	0,44	µg/ul
Sample buffer konsentrasjon	4	X
Reducing agent	10	X

NB! Tall i rødt skal ikke justeres.

NuPage Gel System								
Prøve	Original kons	Prøve ul	H2O	Reduc. agent	Sample buffer	Loading vol.	Slutt kons.	Total vol.
1		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
2		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
3		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
4		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
5		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
6		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
7		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
8		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
9		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!
10		#DIV/0!	#DIV/0!	6	15,0	50	0,44	#DIV/0!

Vedlegg 6: Tabell over prosentvise endringer i VO_{2maks}, COX4 og HSP60

Tabell over prosentvise endringer i VO_{2maks}, COX4 og HSP60 innenfor hver gruppe, med tilhørende p-verdier basert på parete t-tester. En stjerne indikerer signifikant forskjellig fra placebogruppen basert på uparet t-test. Fet skrift indikerer signifikante verdier. Kursiv indikerer en tendens.

	C+E	p-verdi	Placebo	p-verdi	Smartfish	p-verdi	Astaxanthin	p-verdi	total	p-verdi
VO _{2maks}	7,6 %	<0,0001	6,4 %	0,003	7,2 %	0,03	5,8 %	0,04	6,8 %	<0,0001
COX4	-19 % *	0,02	61,0 %	0,01	66,0 %	0,24	34,0 %	0,67	36 %	0,24
HSP60	6,0 %	0,26	-3,0 %	0,46	14,0 %	0,11	7,0 %	0,14	6 %	<i>0,07</i>

