

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## Forord

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for fysisk prestasjonsevne, Norges idrettshøgskole, Oslo.

Takk til min veileder, professor Tor Lea, for god veiledning gjennom det skriftlige arbeidet.

Takk til min veileder, professor Truls Raastad, for at jeg fikk lov til å komme til dere på NIH og ta del i et spennende prosjekt. Takk for god veiledning gjennom det praktiske arbeidet og utforming av det skriftlige arbeidet.

Takk til min veileder, postdoktor Gøran Paulsen, for god veiledning. Takk for all hjelp ved bearbeidelse av rådata og statistisk, og ikke minst utforming av det skriftlige arbeidet.

Takk til Ingrid Ugelstad for god opplæring og veiledning på laboratoriet. Alltid et smil å få av deg når jeg har kommet med alle mine spørsmål.

Takk til Camilla, Rasmus, Håvard, Charlotte og resten av gjengen på kontoret for god stemning både på lab og kontor.

Takk til min gode venninne Marthe Stine for viktig korrekturlesing.

Takk til mamma og pappa for at dere alltid er der og støtter meg.

Takk til min kjære Sindre for all støtte, trøst og gode ord gjennom denne prosessen.

Oslo, 15. desember 2011

---

Hege Nymo Østgaard

## Sammendrag

**Innledning:** Ved utholdenhetstrening skjer det flere molekylære forandringer i muskulaturen, blant annet økt mitokondriobiogenese. PGC-1 $\alpha$  er en hovedregulator av mitokondriobiogenesen i muskelceller og endringer i mengde og lokalisering av dette proteinet kan derfor indikere hvordan mitokondriobiogenesen påvirkes ved trening. I noen studier gjennomført på både rotter og mennesker har det vært antydning at den mitokondriobiogenesen som stimuleres ved utholdenhetstrening, kan bli hemmet hvis man samtidig inntar store doser antioksidanter. Det var derfor interessant å studere om supplement med antioksidanter har noen effekt på endringer i PGC-1 $\alpha$  ved trening hos mennesker. I tillegg ble uttrykket av stressproteinene HSP60 og HSP70, som er en del av muskelcellenes forsvar mot ulike typer stress, undersøkt.

**Metode:** SARA var et randomisert kontrollert studie som sammenliknet tre ulike intervensjonsgrupper og en kontrollgruppe (n = 10). Intervensjonsgruppene inntok C- og E-vitamin (n = 11), Smartfish (n = 11) eller astaxanthin (n = 12). Gruppene gjennomførte en treningsperiode på 12 uker bestående av fire økter per uke, fordelt på intervall og langkjøringsøkter. For å undersøke effekten av antioksidanttilskudd på mer generelle treningstilpasninger til utholdenhetstrening ble VO<sub>2</sub>maks målt. Muskelbiopsi fra en lårmuskel (*m. vastus lateralis*) ble tatt før og etter treningsperioden. Prøvene ble homogenisert og fraksjonert i en cytosol-, membran-, kjerne- og cytoskjelettfraksjon. Cytosol- og kjernefraksjonene ble benyttet videre til Western blotting med et polyklonalt antistoff mot PGC-1 $\alpha$  og monoklonale antistoff mot HSP60 og HSP70.

**Resultater:** For alle forsøkspersonene sett samlet økte VO<sub>2</sub>maks med 5,6 %, og det var ingen forskjell mellom gruppene. Det ble observert en reduksjon av PGC-1 $\alpha$  i cytosol i gruppen som inntok C- og E-vitamin, og en oppregulering av PGC-1 $\alpha$  i kjernen i gruppen som inntok Smartfish. I cytosol ble HSP60 redusert i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Uttrykket av HSP70 var uendret etter treningsperioden.

**Konklusjon:** Våre resultater kan tyde på at supplement med store doser C- og E-vitamin har hatt en negativ effekt på nivåene av PGC-1 $\alpha$  og HSP60 i skjelettmuskel. Oppreguleringen av PGC-1 $\alpha$  i kjernen kan tyde på en translokasjon av proteinet som følge av utholdenhetstrening. Videre analyser på flere forsøkspersoner vil kunne vise om tendensene stemmer. For PGC-1 $\alpha$  er det på grunn av få datapunkter i placebogruppen vanskelig å trekke noen konklusjoner om effekten av antioksidanttilskuddene.

## Abstract

**Introduction:** The endurance training leads to several changes, such as increased mitochondrial biogenesis in the exercised muscles. PGC-1 $\alpha$  is a key regulator of mitochondrial biogenesis in muscle cells and changes in the quantity and localization of this protein can indicate how mitochondrial biogenesis is affected by training. In some studies, it has been suggested that the mitochondrial biogenesis which is stimulated by endurance training, may be inhibited by intake of large doses of antioxidants. It was therefore interesting to study whether the supplement with antioxidants have an effect on changes in PGC-1 $\alpha$  in humans during training. In addition, the expression of stress proteins HSP60 and HSP70, which is part of the muscle cell defense against various types of stress, was studied.

**Method:** SARA was a randomized controlled trial comparing three different intervention groups (Vitamin C and E (n = 11), Smartfish (n = 11) or astaxanthin (n = 12)) and a control group (n = 10) after a training period of 12 weeks consisting of four bout per week with intervals and longer endurance bouts. To investigate the effect of antioxidant supplementation on the more general training adaptations to endurance training, VO<sub>2</sub>max was measured. Muscle biopsy from a leg muscle was taken before and after the training. The samples were homogenized and fractionated in a cytosol, membrane, nuclear and cytoskeleton fraction. The cytosol and the nuclear fractions were used for Western blotting with a polyclonal antibody against PGC-1 $\alpha$  and monoclonal antibodies against HSP60 and HSP70.

**Results:** For all subjects in this study the VO<sub>2</sub>max increased by 5.6 %, and there was no difference between the groups. It was observed a reduction of PGC-1 $\alpha$  in the cytosol of the group who ingested Vitamin C and E, and an up regulation of PGC-1 $\alpha$  in the nucleus of the group who ingested Smartfish. HSP60 in cytosol was reduced in the group who ingested Vitamin C and E. The expression of HSP70 was unchanged throughout the intervention period.

**Conclusion:** Our results suggest that the supplement with high doses of Vitamin C and E have had a negative effect on the levels of PGC-1 $\alpha$  and HSP60 in skeletal muscle. The up regulation in the nucleus may indicate a translocation of the protein as a result of endurance exercise training. Further analysis on several subjects will show whether the tendency matches. For PGC-1 $\alpha$  results in which, due to the few data points in the placebo group are difficult to draw any conclusions about the effect of antioxidant supplements.

## Forkortelser

<b>Forkortelse</b>	<b>Forklaring</b>
AMPK	AMP-aktivert protein kinase
ATP	Adenosin trifosfat
Borgs skala	Subjektiv beskrivelse av en anstrengelse, 6-20.
CREB	cAMP respons element-bindende protein
ELFO	Elektroforese
FADH	Flavin adenin dinukleotid
HFmaks	Maksimal hjertefrekvens
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP60	Heat shock protein 60
HSP70	Heat shock protein 70
mAb	Monoklonalt antistoff
MEF2	Myocyt forsterkende faktor-2
mtDNA	Mitokondrielt DNA
mtTFA	Mitokondrie transkripsjonsfaktor A
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NRF	Kjerne respiratorisk faktor
NUGEMPs	Nuclear genes encoding mitochondrial proteins
pAb	Polyklonalt antistoff
PGC-1 $\alpha$	Peroxisom proliferator – aktiverende reseptor $\gamma$ co-aktivator1 $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisom proliferator-aktiverende reseptor gamma
PVDF	Polyvinylidene difluoride membran
p38 MAPK	Mitogen-aktiverende protein kinase p38
RM	Repetisjonsmaksimum
RNS	Reaktive nitrogen radikaler
ROS	Reaktive oksygen radikaler
RT	Romtemperatur
SIRT1	Sirtuin 1
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline med Tween 20

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>1</b>
1.1 Utholdenhetstrening .....	1
1.2 Maksimalt oksygenopptak.....	1
1.3 Mitokondriene .....	2
1.4 Energifrigjøring i muskulaturen .....	2
1.4.1 Påvirkningen av trening på mitokondriene .....	4
1.5 Frie radikaler og oksidativt stress.....	5
1.6 Reaktive oksygenradikaler .....	6
1.7 Regulering av mitokondriebiogenesisen.....	7
1.7.1 Peroxisom-proliferator-aktiverende reseptor $\gamma$ ko-aktivator 1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ).....	7
1.7.2 Respons ved trening .....	8
1.8 Heat shock proteiner.....	10
1.8.1 Heat shock protein 60.....	11
1.8.2 Heat shock protein 70.....	11
1.9 Antioksidanter .....	12
1.9.1 C-vitamin.....	12
1.9.2 E-vitamin .....	13
1.9.3 Astaxanthin.....	13
1.10 Prosjekt beskrivelse.....	14
<b>2.0 Metode</b> .....	<b>15</b>
2.1 Design av studien .....	15
2.2 Forsøkspersoner .....	15

2.3 Frafall .....	16
2.4 Gruppeinndeling .....	16
2.5 Treningsprotokoll .....	16
2.6 Måling av VO <sub>2</sub> maks .....	17
2.7 Muskelbiopsi .....	17
2.8 Homogenisering/ekstrahering .....	18
2.9 Måling av totalprotein .....	18
2.10 Immunoblotting – metode utprøving.....	18
2.11 Prøvebehandling og Western blotting .....	19
2.12 Statistikk.....	20
<b>3.0 Resultater .....</b>	<b>21</b>
3.1 Endring i VO <sub>2</sub> maks .....	21
3.2 Western blotting av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 .....	22
3.3 Reproduserbarhet av HSP60 og HSP70 .....	23
3.4 Endringer av PGC-1 $\alpha$ og heat shock proteiner.....	24
3.4.1 PGC-1 $\alpha$ , cytosolfraksjon .....	24
3.4.2 PGC-1 $\alpha$ , kjernefraksjon.....	25
3.4.3 Ratio mellom cytosol- og kjernefraksjon .....	27
3.4.4 Sammenheng mellom endringer i PGC-1 $\alpha$ og VO <sub>2</sub> maks.....	28
3.4.5 HSP60, cytosolfraksjon .....	29
3.4.6 HSP60, kjernefraksjon .....	30
3.4.7 HSP70, cytosolfraksjon.....	32
3.4.8 HSP70, kjernefraksjon .....	33
3.5 Den totale endringen i HSP60, HSP70, PGC-1 $\alpha$ og VO <sub>2</sub> maks.....	35
<b>4.0 Diskusjon .....</b>	<b>36</b>
4.1 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på VO <sub>2</sub> maks .....	36
4.2 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på PGC-1 $\alpha$ .....	38

4.3 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på heat shock proteiner .....	41
4.3.1 Heat shock protein 60.....	41
4.3.2 Heat shock protein 70.....	42
4.4 Antioksidanters påvirkning på trening .....	44
4.5 Reproduserbarhet og videre analyser av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70.....	45
<b>5.0 Konklusjon .....</b>	<b>46</b>
<b>6.0 Referanser .....</b>	<b>47</b>



## 1. Innledning

Kapittelet gir en kort innføring i utholdenhetstrening og begrepet maksimalt oksygenopptak ( $VO_2$ maks). Frigjøring av aerob energi skjer i mitokondriene og treningspåvirkning på mitokondriene er derfor en sentral del av de tilpasninger man får i skjelettmuskulatur ved utholdenhetstrening. Produksjonen av frie radikaler og oksidativt stress i cellene ved utholdenhetstrening ser ut til å være en viktig stimulator til økt mitokondrietretthet. Hovedfokuset er derfor på regulering av mitokondriebiogenesen ved PGC-1 $\alpha$ . I tillegg blir det fokusert på heat shock proteinene HSP60 og HSP70 som er viktige komponenter i muskelcellenes forsvar mot ulike typer cellulært stress (deriblant også oksidativt stress), og hvordan disse blir påvirket ved trening og ved supplement av høye doser av antioksidanter. Kapittelet blir avsluttet med en gjennomgang av antioksidanter med fokus på C- og E-vitamin og astaxanthin, og antioksidantenes mulige påvirkning på mitokondriebiogenesen under utholdenhetstrening.

### 1.1 Utholdenhetstrening

Tidligere studier gjennomført på både mennesker og dyr har vist en økning i skjelettmuskulaturens oksidative potensial ved utholdenhetstrening (Mattson et al. 2000). I dag vet vi også at regelmessig utholdenhetstrening har flere positive effekter som blant annet forbedret hjerte-/karfunksjon, økt metabolisme i skjelettmuskulaturen og økt utholdenhet (Hood 2009; Little et al. 2010). Bedret muskulær utholdenhet (i aktiviteter som varer > 1 minutt) er i stor grad en konsekvens av større oksygenutveksling i den arbeidende muskelen. Dette er i stor grad et resultat av et økt mitokondrieinnhold i muskulaturen (Hood 2009). Slike tilpasninger til trening bidrar til å redusere det cellulære stresset og ubalansen i homeostasen som oppstår under et gitt muskelarbeid (Morton et al. 2009b), for eksempel løping ved en bestemt hastighet.

### 1.2 Maksimalt oksygenopptak

Maksimalt oksygenopptak ( $VO_2$ maks) blir definert som den største mengden oksygen som kan bli tatt opp, transportert og utnyttet under et muskelarbeid (Bassett & Howley 2000; Wagner 1996).  $VO_2$ maks kan beskrives som volumet som omsettes i kroppen per minutt (l/min) (Berg 2003), og er direkte koblet til hastigheten på den aerobe energiomsetningen

(mitokondriell ATP-regenerering) (Bassett & Howley 2000).  $VO_2$ maks målt over lungene (ekspirert luft) er den vanligste metoden for å måle effekten av aerob utholdenhetstrening i store muskelgrupper.

### 1.3 Mitokondriene

Mitokondriene er vitale organeller som har mange viktige roller i cellene. I tillegg til deres primære rolle i aerob energiomsetning, påvirker mitokondriene mange cellulære funksjoner både direkte og indirekte (Kavazis et al. 2009). Mitokondriene er omgitt av to lipidmembraner. Den indre membranen består av et betydelig antall folder, som er tettpakket med proteinmolekyler, dette utgjør blant annet elektrontransportkjeden (Sand et al. 2006). Mitokondriene er avhengige av elektrontransportkjeden for å kunne fungere som en ”energiprodukerende” organelle i cellen (Hood et al. 2006). Regenerering av adenosin trifosfat (ATP) i cellene er en sentral prosess i mitokondriene. Kontinuerlig ATP-regenerering er helt nødvendig for å kunne opprettholde en normal funksjon og homeostase i cellene. I skjelettmuskulaturen er ATP blant annet helt nødvendig for interaksjon mellom aktin og myosin, og utveksling av  $Ca^{2+}$  fra sarkoplasmatiske retikulum (Hood et al. 2003).

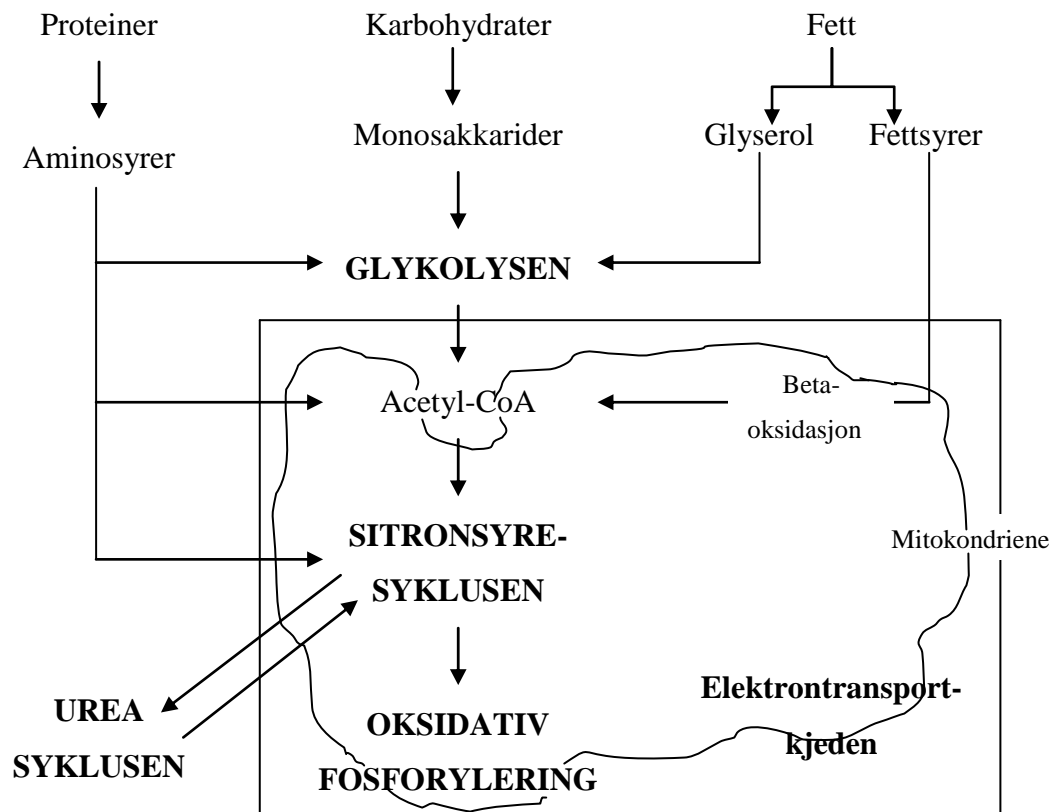
Ved regelmessig økt behov for energifrigjøring i en celle, for eksempel ved aerob trening, vil antallet mitokondrier etter hvert øke slik at regenereringen av ATP kan holde tritt med cellens økte energibehov (Sand et al. 2006). Mitokondriene har eget DNA (mtDNA), hvilket betyr at mitokondriene selv er medansvarlig for syntesen av mitokondrielle proteiner og dannelse av nye mitokondrier i cellene. Dette er imidlertid kun en liten andel av den totale mengden DNA i cellene, og koden for mange mitokondriegenener må leses av i cellekjernen (Hood et al. 2003). Mitokondriene regulerer den primære metabolismen i cellene, men de er også sentrale i programmert celledød (apoptose), ved at cytokrom c frigjøres til cytosol (Adhietty et al. 2009). Det er imidlertid uklart hvor vesentlig apoptose er i muskelfibre (Gundersen & Bruusgaard 2008).

### 1.4 Energifrigjøring i muskulaturen

Glykolysen er det første leddet i en kjede bestående av en rekke prosesser for nedbrytningen av glukose (figur 1) (MacIntosh et al. 2006; Sand et al. 2006). Glykolysen gir en rask tilførsel av ATP, men det er bare en liten andel av energien som blir hentet ut. Mesteparten av energien blir frigjort først i mitokondriene (MacIntosh et al. 2006).

I det indre rommet i mitokondriene er det enzymer som deltar i sitronsyresyklusen (Sand et al. 2006). Pyruvat fra glykolysen blir fraktet fra cytosol (Brière et al. 2006) og inn i mitokondriene hvor  $\text{CO}_2$  blir spaltet av, deretter blir molekylet oksidert og bundet til koenzym A og danner forbindelsen acetyl koenzym A (acetyl-CoA) (Sand et al. 2006). Sitronsyresyklusen katalyserer deretter nedbrytningen av acetyl-CoA, som gir frigjøring av  $\text{CO}_2$  og dannelse av NADH (reduksjon av  $\text{NAD}^+$ ) og FADH (Brière et al. 2006).

Oksidativ fosforylering i mitokondriene er en grunnleggende energioverførende biokjemisk prosess som benytter  $\text{O}_2$  (Wagner 1996). Kozymer fra sitronsyresyklusen (NADH, FADH) gir fra seg elektroner til elektrontransportkjeden. Under aerobe forhold gir også de reduserte koenzymene fra glykolysen fra seg elektroner til elektrontransportkjeden. Elektronene er avhengig av oksygen for å kunne komme seg rundt i kjeden (MacIntosh et al. 2006; Sand et al. 2006; Tonkonogi et al. 2000). ATP blir dannet fra ADP ved en strøm av hydrogenioner gjennom den indre membranen. Hydrogenionene blir transportert ut og inn av den indre membranen gjennom kanaler dannet av proteinkomplekser. To til tre ATP molekyler blir dannet per par elektroner som blir donert fra frie hydrogenioner eller hydrogenbærende kozymer, som er blitt frigjort tidligere i elektrontransportkjeden (Widmaier et al. 2006).



**Figur 1. Energi omsetning: karbohydrater, proteiner og fett blir brutt ned for å kunne delta i reaksjonene i glykolysen, sitronsyresyklusen og oksidativ fosforylering, slik at energien i næringsstoffene kan bli frigjort. Fettsyrene blir transportert inn i mitokondriene og brutt ned til acetyl-CoA, betaoksidasjon. Mitokondriene består av en indre og en ytre membran. Elektrontransportkjeden finnes i den indre mitokondriemembranen, hvor ATP blir dannet ved oksidativ fosforylering.**

#### 1.4.1 Påvirkningen av trening på mitokondriene

Mitokondriebiogenesisen er et produkt av komplekse interaksjoner mellom kjerne og mitokondrie genomet (Hood et al. 2003; Hood et al. 2006). Det har lenge vært kjent at trening utløser forandringer i uttrykket av "nuclear genes encoding mitochondrial proteins" (NUGEMPs) og gir en kraftig økning av mitokondriebiogenesisen i skjelettmuskulaturen (Khassaf et al. 2003; Ugucioni et al. 2010; Wright et al. 2007). Endringer i mitokondriebiogenesisen på grunn av trening er et resultat av flere ulike molekylære forandringer (Hood et al. 2006). Ved trening kan det skje endringer i mitokondriene i musklene, enten ved økning av innholdet mitokondrier per gram vev, eller ved en endring i sammensetningen av mitokondriene (Hood et al. 2006).

Under muskelarbeid blir det produsert mange ulike signaler. Signalene kan føre til mitokondriebiogenesis ved å endre molekylære prosesser, slik som transkripsjonsaktivering,

mRNA stabilitet, posttranslasjonsmodifikasjoner av proteiner, og forandring av riktig folding og forming av proteinkomplekser (Hood et al. 2003). AMP-aktivert protein kinase (AMPK) og mitogen-aktivert protein kinase p38 (p38 MAPK) er to av mange kinaser som blir aktivert under trening. Aktivering av disse kinasene bidrar til fosforylering (aktivering) av transkripsjonsfaktorer som er involvert i reguleringen av DNA-transkripsjonen knyttet til mitokondriebiogenesen. Aktivering av kinasene er avhengig av intensitet og varighet av arbeidet som blir gjennomført (Hood 2009). Sammentrekninger i skjelettmuskulaturen under arbeid fører til en rekke prosesser og endringer i cellene. Forandringer av intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  og aktivering av  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive signalmolekyler som kalsium/kalmodulin avhengig protein kinase (CaMK), er noen viktige endringer som skjer under aktivering ved utholdenhetsarbeid (Hood et al. 2006).

### 1.5 Frie radikaler og oksidativt stress

Frie radikaler er en del av den normale metabolismen (Fischer et al. 2006). Superoksid ( $\text{O}_2^-$ ) og nitrogenoksid (NO) er de to viktigste frie radikalene (Dröge 2002). Begge kan reagere med andre molekyler og danne et stort antall oksygenbaserte (ROS) og nitrogenbaserte (RNS) frie radikaler. Samlet omtales de som RONS (Powers et al. 2011).

Under et muskelarbeid øker oksygenopptaket og dette øker andelen frie radikaler betraktelig (Dawson et al. 2002); sammentrekninger i skjelettmuskulaturen fører til økt produksjon av RONS (Fischer et al. 2006). Utholdenhetsarbeid fører også til økt oksidativt stress som videre kan medføre mutasjoner (Hood 2009), reduksjon av membranlipider, proteiner og DNA (Rosa et al. 2009), og endring og inaktivering av enzymkomplekser (Kanter 1998). Oksidativt stress kan oppstå ved overproduksjon av RONS, som igjen kan føre til skade på cellekomponenter (Pashkow et al. 2008). Oksidativt stress og skader i vevet kan også oppstå når antioksidantforsvaret ikke er tilstrekkelig i forhold til produksjonen av frie radikaler (Tiidus et al. 1996).

På tross av de mange negative effekter ved stor produksjon av RONS er det også positive sider ved produksjon av RONS. Radikalene formidler og bidrar blant annet i den cellulære responsen ved mangel på oksygen. RONS beskytter mot smittestoffer, medfører endringer i cellulære signalveier, og stopper cellulær proliferasjon (Pashkow et al. 2008). I denne oppgaven er det sentralt at økning i produksjonen av RONS spiller en viktig rolle i

reguleringen av signalveier som er essensielle for muskeltilpasning i respons av utholdenhetstrening (Powers et al. 2011).

### 1.6 Reaktive oksygenradikaler

Reaktive oksygenradikaler (ROS) anses som en del av den normale metabolismen i kroppens celler. ROS dannes i mitokondriene (Khassaf et al. 2003), men kan også forårsakes av intracellulære og ekstracellulære påvirkninger (Hood et al. 2006; Roberts et al. 2011). I mitokondriene produseres ROS via elektrontransportkjeden under regenerering av ATP (Park et al. 2010; Tonkonogi et al. 2000). ROS formidler aktivering av signalkaskader som er nødvendig for regulering av vekst, differensiering, celledeling (Irrcher et al. 2009), og apoptose (Dröge 2002). AMPK og p38 MAPK er to kinaser som blir aktivert av ROS. Aktiveringen fører blant annet til en oppregulering og aktivering av kjerne respiratorisk faktor 1 (NRF-1), mitokondrie transkripsjonsfaktor A (mtTFA) og hovedregulatoren av mitokondriebiogenesen; peroksisom proliferasjonsaktiverende reseptor  $\gamma$  ko-aktivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) (Irrcher et al. 2009; Roberts et al. 2011).

Ved utholdenhetstrening (Khassaf et al. 2003) og økt muskelarbeid (Ristow et al. 2009) øker oksygenforbruket og bevegelsen gjennom elektrontransportkjeden (Sacheck & Blumberg 2001), dette fører til økt produksjon av ROS i mitokondriene (Dröge 2002) i skjelettmuskulaturen (Roberts et al. 2011). Andelen av ROS som blir dannet av det totale oksygenforbruket i mitokondriene er imidlertid mindre enn tidligere antatt (Gomez-Cabrera et al. 2008b). En studie gjort allerede i 1979 viste at cirka 2 % av oksygenforbruket i "hvilede" mitokondrier blir omgjort til frie radikaler. Når mitokondriene derimot er aktive og regenererer ATP med en høy strøm av elektroner til oksygen, blir andelen av oksygen som blir omgjort til frie radikaler til en tidel av det som ble funnet i den hvilede fasen (Chance et al. 1979). Dette har ført til en revurdering av mitokondrienes rolle i dannelsen av frie radikaler under arbeid, og vurdering av andre mulige kilder. Enzymet xanthin oksidase (XO) er relevant i produksjon av frie radikaler under aerobt arbeid, og er involvert i vevsskade under utmattende fysisk trening (Gomez-Cabrera et al. 2008b; Gómez-Cabrera et al. 2003).

## 1.7 Regulering av mitokondriebiogenesen

### 1.7.1 Peroxisom-proliferator-aktiverende reseptor $\gamma$ ko-aktivator 1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )

Peroxisom-proliferator-aktiverende reseptor (PPAR) er medlem av en relativt stor familie kjernereseptorer. PPAR er blant annet essensiell for regulering av fettceller og for igangsettelse av differensiering av brunt fettvev, men er avhengig av å bli bundet til og koaktivert av PGC-1 $\alpha$  (Liang & Ward 2006; Wu et al. 1999).

PGC-1 $\alpha$  er en del av en ko-regulatorisk proteinfamilie, med en molekylvekt på 92 kDa (Ugucioni et al. 2010). PGC-1 $\alpha$  er en transkripsjonsaktivator som påvirker et bredt spekter av transkripsjonsfaktorer som er involvert i ulike biologiske responser; blant annet i regulering av mitokondriebiogenesen (Hood et al. 2006) og regulering av endogene antioksidantsystemer. En transkripsjons-ko-aktivator er definert som et protein eller et proteinkompleks som øker sannsynligheten for transkripsjonen av et gen ved å reagere med transkripsjonsfaktorer (Liang & Ward 2006; Puigserver & Spiegelman 2003). PGC-1 $\alpha$  øker volumet og bedrer funksjonen (Hood 2009) i mitokondriene ved å oppregulere flere transkripsjonsfaktorer i kjernen (figur 2) (Adhihetty et al. 2009). PGC-1 $\alpha$  blir derfor ansett som en viktig regulator for opprettholdelse av innholdet og funksjon av mitokondrier i skjelettmuskulaturen (Hood et al. 2006).

PGC-1 $\alpha$  påvirker mitokondriebiogenesen ved å fungere i kontakt med og ved å stimulere uttrykket av transkripsjonsfaktorer som kontrollerer transkripsjon av mitokondrierelaterte gener i kjernen (Geng et al. 2010). Blant disse transkripsjonsfaktorene er kjerne respiratorisk faktor 1 (NRF-1) og 2 (NRF-2) (Geng et al. 2010; Hood 2009). NRF-1 og NRF-2 aktiverer transkripsjonen av et stort antall gener involvert i den respiratoriske funksjonen (Wu et al. 1999). En økning av PGC-1 $\alpha$  fører til at PGC-1 $\alpha$  binder seg til og koaktiverer transkripsjonen av NRF-1, som kan lokaliseres til promotorer for flere kjernekodende mitokondrieproteiner, der i blant mitokondrie transkripsjonsfaktor A (mtTFA) (Hood 2009; Liang & Ward 2006; Wu et al. 1999). mtTFA er en regulator som direkte regulerer replikasjonen og transkripsjonen av DNA i mitokondriene (Wu et al. 1999).

Uttrykket av PGC-1 $\alpha$  blir stimulert ved utholdenhetstrening (Hood et al. 2006), og blir satt i sammenheng med endringer av transkripsjonsaktivering i mitokondriene (Hood et al.

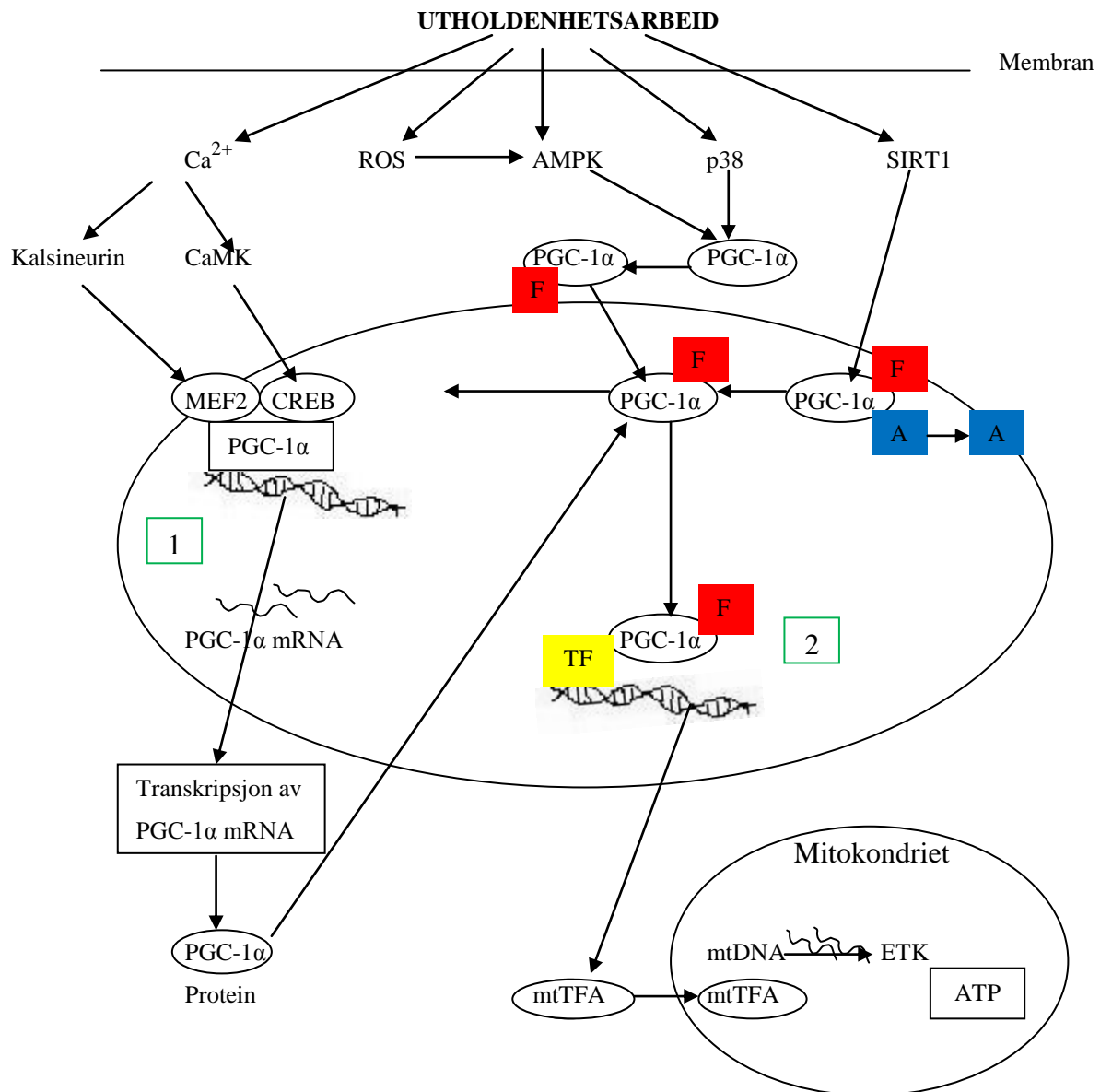
2003). Et samspill mellom kjerne- og mitokondriegenom er nødvendig for en fungerende biogenese av mitokondrier (Hood et al. 2006).

### 1.7.2 Respons ved trening

mRNA- og proteinnivået av PGC-1 $\alpha$  er størst i vev med høy metabolsk aktivitet. Eksempler på dette er brunt fettvev, hjerte, og skjelettmuskulatur (Liang & Ward 2006; Ugucioni et al. 2010). Utholdenhetstrening stimulerer og aktiverer transkripsjonen av PGC-1 $\alpha$  i skjelettmuskulatur (Akimoto et al. 2008; Geng et al. 2010), og fører til endringer i mitokondriebiogenesen (Ugucioni et al. 2010). I en hvilende muskel er PGC-1 $\alpha$  hovedsakelig i cytosol. Muskelstimuli som utholdende muskelarbeid, øker mRNA- og proteinnivået av PGC-1 $\alpha$  (Ugucioni et al. 2010), og forårsaker translokasjon av proteinet inn i kjernen der de kan utføre sin aktivitet (Wright et al. 2007).

Binding av NRF-1 og NRF-2 til ulike promotorer øker som respons av trening som fører til en økning i PGC-1 $\alpha$  (Wright et al. 2007). Utholdenhetstrening forårsaker aktivisering av PGC-1 $\alpha$  relaterte signalveier som AMPK og p38 MAPK (Hood et al. 2006; Powers et al. 2011) og økt uttrykk av SIRT1 (figur 2) (Olesen et al. 2010). SIRT1 er også en positiv regulator av mitokondriebiogenesen (Little et al. 2010). Den NAD<sup>+</sup>-avhengige deacetylasen, fjerner acetylgrupper som leder til aktivisering av PGC-1 $\alpha$  (Hood et al. 2006; Powers et al. 2011). Deacetylering av PGC-1 $\alpha$  kan øke mengden, binde eller stabilisere PGC-1 $\alpha$  i kjernen, og påvirke dannelsen av ulike kjerneholdige PGC-1 $\alpha$  proteinkomplekser (Little et al. 2010). SIRT1 holder derfor PGC-1 $\alpha$  aktiv (Ugucioni et al. 2010). Aktiviteten til PGC-1 $\alpha$  kan også bli kontrollert av posttranslasjonelle modifikasjoner (Akimoto et al. 2008). p38 MAPK og AMPK har evnen til og fosforylere PGC-1 $\alpha$  i bestemte aminosyreresiduer (Morton et al. 2009a; Olesen et al. 2010). Dette resulterer i et mer stabilt og aktivt PGC-1 $\alpha$  protein (Powers & Jackson 2008). AMPK har vist å regulere PGC-1 $\alpha$  ved mangel på energi, som ved for eksempel langvarig muskelarbeid (Ugucioni et al. 2010). p38 MAPK er vist å ha en effekt som fremmer frigjøring av PGC-1 $\alpha$  fra hemmende faktorer (Ugucioni et al. 2010), og gir mulighet for forflytting av PGC-1 $\alpha$  inn i cellekjernen (Wright et al. 2007). Det er nå godt dokumentert at aktivisering av signalveier koblet til PGC-1 $\alpha$  bidrar til tilpasning i skjelettmuskulatur ved utholdenhetstrening (Powers et al. 2011).





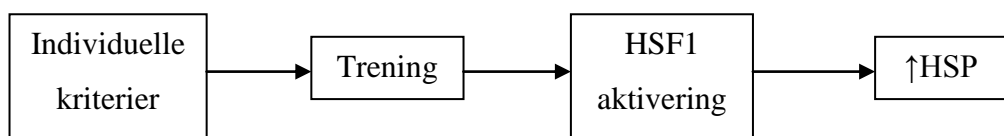
**Figur 2.** Utholdenhetstrening påvirker flere ulike faktorer og signalveier. SIRT1 deacetylerer og aktiverer PGC-1α. Kinasene AMPK og p38 MAPK fører til fosforylering av PGC-1α som igjen muliggjør translokering inn i kjernen. Økte nivåer av Ca<sup>2+</sup> over lengre tid har en positiv effekt på transkripsjonen av PGC-1α. MEF2 binder seg og aktiverer PGC-1α. (1) Transkripsjon av PGC-1α mRNA gir mulighet for dannelse av PGC-1α som kan gå inn igjen i kjernen. (2) Fosforylert PGC-1α sammen med transkripsjonsfaktorer, NRF-1 og NRF-2, fører til økt uttrykk av mitokondrie transkripsjonsfaktor A (mtTFA). Dette gir mulighet for transkripsjon av mtDNA kodede proteiner. Produktene integreres deretter i elektrontransportkjeden.

F: fosforylert, A: acetylert, TF: transkripsjonsfaktor, mtDNA: mitokondrielt DNA

## 1.8 Heat shock proteiner

Heat shock proteiner (HSP) er stressproteiner som har viktige roller i både stressede og ustressede celler. Klassifisering av HSP er basert på deres molekylvekt i kiloDalton (kDa) (Morton et al. 2009a; Morton et al. 2009b). HSP fungerer som molekylære chaperoner som tilrettelegger for korrekt folding av nysyntetiserte proteiner (Khassaf et al. 2003; Morton et al. 2009a; Morton et al. 2009b), transporterer intracellulære proteiner (Fischer et al. 2006; Mattson et al. 2000), og beskytter mot denaturering av proteiner og reparerer denaturerte polypeptider etter ulike typer cellulært stress (Um et al. 2003). HSP beskytter proteiner mot aggregering og feilaktig folding ved å binde seg til hydrofobe seter på proteinene (Khassaf et al. 2003; Mattson et al. 2000). HSP kan endre ulike stimuli som fører til apoptose, og kan i tillegg endre balansen mellom celledød og celleoverlevelse (Um et al. 2003). Nyere studier har vist en oppregulering av HSP nivået (Morton et al. 2009b) som en følge av økt aktivitet (González et al. 2000) i skjelettmuskulaturen under trening (figur 3) (Khassaf et al. 2003; Mattson et al. 2000). Ved reduksjon i treningsstimuli, blir også HSP nivået redusert (Morton et al. 2008). Økt produksjon av HSP under stress (González et al. 2000; Morton et al. 2008) ved for eksempel trening fører til gjenopprettelse og til opprettholdelse av den cellulære homeostasen (Morton et al. 2009b), reparasjon av skadde og degraderte proteiner, og beskyttelse av cellen mot senere skader (Morton et al. 2008).

For å få uttrykt HSP er man avhengig av korte nukleotidsekvenser, heat-shock-elementer (HSE) (Morton et al. 2009b). HSE er en spesifikk DNA-gjenkjennende sekvens (Morimoto 1993), og er bindingssete for heat-shock-faktorer (HSF) (Morton et al. 2009b). HSF1 er den primære transkripsjonsfaktoren av heat shock genet og beskytter mot apoptose forårsaket av varme (Um et al. 2003). HSP bundet til HSF1 har en høyere affinitet for å binde ufoldede proteiner en HSF1 (Morton et al. 2009b).



**Figur 3. Stress under treningen fører til oppregulering av HSP. Dette avhenger av individuelle kriterier som alder, kjønn, og treningsform.**

### 1.8.1 Heat shock protein 60

HSP60 er et oligomer på 60 kDa. Proteinet består av monomerer som danner et kompleks satt sammen av to heptamerringe, hvor hver monomer har en spesifikk funksjon i HSP60 komplekset (Karlin & Brocchieri 2000). HSP60 klassen av heat shock proteinene er i hovedsak lokalisert i mitokondriene under normale forhold (Morton et al. 2009b). Her tilrettelegger den for korrekt folding (Mattson et al. 2000) og sammensetning av proteiner, og bidrar til at transporten av proteiner gjennom indre membraner går enklere (Morton et al. 2009b). HSP60 har en viktig rolle i reguleringen av apoptose, og forandringer i fordelingen av HSP60 vil kunne fremkalle apoptose (Gupta & Knowlton 2002). HSP60 deltar i prosesser hvor proteiner er under stress (Karlin & Brocchieri 2000), og beskytter mot og reparerer denaturering av proteiner. HSP60 øker i *m. vastus lateralis* hos menn, ved akutt arbeid. Dette skyldes trolig en økning av antall mitokondrier i cellen som følge av utholdenhetstrening (Morton et al. 2009b).

### 1.8.2 Heat shock protein 70

HSP70 klassen er en del av heat shock protein familien på 70 kDa (Milne & Noble 2002), og er lokalisert i både cytosol (González et al. 2000) og mitokondriet (Mattson et al. 2000). HSP70 er viktig ved cellulær proteintransport og stabilitet (Kelly et al. 1996), og påvirker polypeptidkjeder i det de forlater ribosomene og proteiner som nylig har blitt syntetisert (Mattson et al. 2000). HSP70 er blant annet viktig i forhold til korrekt folding, flytting og refolding av proteiner som er blitt foldet feil, forebygger proteinaggregering og assisterer i degradering av ustabile proteiner (Morton et al. 2009b).

HSP70 i mitokondriene er identifisert som en HSP60 reseptor (Alard et al. 2009), og virker som et intracellulært chaperon for komponenter nødvendig for mitokondriobiogenesen (Kelly et al. 1996). Oppregulering av HSP70 i skjelettmuskulaturen skjer normalt som en del av den cellulære responsen under trening (Fischer et al. 2006; González et al. 2000). HSP70 er vist å bli oppregulert i *m. vastus lateralis* hos menn ved akutt arbeid (Morton et al. 2009b). Ved overeksponering av HSP70 blir cellen resistent mot ellers dødelige nivåer av stress (Milne & Noble 2002), og har vist å ha en effekt som motvirker apoptose (Gupta & Knowlton 2002; Um et al. 2003). Viktig i denne sammenhengen er det at oppreguleringen av HSP70 i skjelettmuskulaturen under trening har ved flere studier vist å bli hemmet ved inntak av antioksidanter (Fischer et al. 2006; Jackson et al. 2004; Khassaf et al. 2003).

## 1.9 Antioksidanter

Antioksidanter er substanser som kan forsinke eller hindre oksidering av et substrat (Powers & Jackson 2008). Antioksidanter kan kategoriseres i enzymatiske og ikke-enzymatiske. De viktigste antioksidantenzymene er katalase, superoksid dismutase (SOD) og glutation peroksidase (Powers & Jackson 2008; Valko et al. 2007). Glutation, bilirubin, urinsyre (Powers & Jackson 2008), askorbinsyre (vitamin-C) og  $\alpha$ -tokoferol (vitamin-E) er ikke-enzymatiske antioksidanter i cellene (Valko et al. 2007). Antioksidanter kan deles inn i to grupper. De som stabiliserer ROS og de som fjerner reaktive intermediater (Peternej & Coombes 2011).

Utholdenhetstrening oppregulerer ulike komponenter i kroppens antioksidantforsvar, og øker og endrer genuttrykket av enzymer i antioksidantforsvaret (González et al. 2000; Peternej & Coombes 2011; Ristow et al. 2009) i blant annet skjelettmuskulaturen (Olesen et al. 2010). Dette fører til bedret beskyttelse mot oksidativt stress, oksidativ skade på fettkomponenter, proteiner og DNA (Fischer et al. 2006; Valko et al. 2007). Overproduksjon av reaktive oksygen- og nitrogenradikaler kan gi antioksidantubalanse. Dette resulterer i ødeleggelse av cellemembraner, proteiner og DNA (Park et al. 2010). Inntak av eksogene antioksidanter kan bedre forsvaret mot oksidativt stress, men kan også føre til en hemming av treningsresponsen som fører til oppregulert antioksidantforsvaret (Ristow et al. 2009).

### 1.9.1 C-vitamin

C-vitamin (askorbinsyre) er en viktig antioksidant og en viktig kofaktor i en rekke vesentlige metabolske reaksjoner i kroppen (Peternej & Coombes 2011). Antioksidanten er også en viktig faktor for fjerning av frie radikaler (Viña et al. 2007). C-vitamin er et vannløselig vitamin, som blir produsert i mange organismer, men ikke hos mennesker (Peternej & Coombes 2011).

C-vitamin er veldig ustabil, og blir lett påvirket av ytre faktorer, som blant annet temperatur (Kanter 1998). C-vitamin reduserer treningspåført oksidativt stress (Filaire et al. 2011), og kan direkte fjerne superoksid, hydroksyl, og lipid hydroperoksid radikaler. Antioksidanten spiller også en viktig rolle i resirkuleringen av E-vitamin, en prosess som resulterer i dannelse av C-vitamin radikaler (Powers & Jackson 2008). Det er også blitt vist negative sider ved inntak av store doser C- vitamin, ved å hemme utholdenhetskapasiteten (Gomez-Cabrera et al.

2008a). I tillegg er det gjennomført studier som ikke har kunnet vist til noen effekt, verken positive eller negative, ved tilskudd av C-vitamin eller en kombinasjon av C- og E-vitamin ved utholdenhetstrening (Roberts et al. 2011; Yfanti et al. 2010).

### **1.9.2 E-vitamin**

E-vitamin er en eksogen fettløselig antioksidant (Pashkow et al. 2008; Peternej & Coombes 2011), som primært finnes i formen  $\alpha$ -tokoferol i cellemembranen (Tiidus et al. 1996). Under oksidativt stress kan E-vitamin i muskulaturen bli regulert og omgjort fra oksidert form til dens aktive form av andre antioksidanter, der i blant askorbinsyre (C-vitamin), ubiquinol, og glutatation (Peternej & Coombes 2011; Tiidus et al. 1996).

Utholdenhetstrening har i tidligere studier blitt vist seg ikke å ha noen innvirkning på E-vitamin nivåene i menneskekroppen (Tiidus et al. 1996). Flere studier har testet effekten ved inntak av E-vitamin. Ved inntak av høye doser av E-vitamin kan antioksidanter fortrenge andre fettløselige antioksidanter, dette kan føre til forstyrrelser i den naturlige balansen av antioksidantsystemer og øke muligheten for oksidative skader (Miller et al. 2005).

### **1.9.3 Astaxanthin**

Astaxanthin er et rød-orange karotenoidpigment som forekommer naturlig med stor variasjon i levende organismer som sopp og skaldyr (Pashkow et al. 2008; Wolf et al. 2010).

Astaxanthin fungerer som en kraftig antioksidant (Pashkow et al. 2008) og bidrar med anti-inflammatoriske egenskaper ved å hemme RONS (Park et al. 2010). Astaxanthinstrukturens polare ender hjelper til med å opprettholde dens funksjon som en antioksidant, ved for eksempel å redusere vandringssevnen gjennom membranen eller ved å opprettholde membranens struktur under oksidativt stress (Park et al. 2010). Inntak av syntetisk astaxanthin reduserer lipid peroksidering og har en positiv beskyttelseeffekt på hjertet (Wolf et al. 2010) og mot lysing av vev (Pashkow et al. 2008).

## 1.10 Prosjekt beskrivelse

Denne masteroppgaven hadde som hensikt å undersøke hvilken påvirkning tilskudd av antioksidanter har på PGC-1 $\alpha$  som er en hovedregulator av mitokondriebiogenesen og mengden av heat shock proteiner ved utholdenhetstrening. Ved trening endres uttrykket av mange proteiner i cellene. Endringene kan variere med ulik mengde og intensitet på treningen, og ulike mengder og tilskudd av antioksidanter.

I denne studien ble en treningsperiode på 12 uker gjennomført på fire grupper med ulike tilskudd. Den ene gruppen fikk tilskudd av C- og E-vitamin, den andre gruppen fikk placebo, den tredje gruppen fikk tilskudd av Smartfish, mens den fjerde gruppen fikk tilskudd av astaxanthin. VO<sub>2</sub>maks ble målt for å undersøke om en persons maksimale aerobe energiomsetning var blitt endret etter treningsperioden ved inntak av antioksidanttilskudd. Western blott analyser av PGC-1 $\alpha$ , HSP60, HSP70 ble målt for å undersøke endringen av proteinene i løpet treningsperioden. Proteinmengden ble målt i både cytosolfraksjon og kjernefraksjon av muskelhomogenatet for å studere om det også ble en endring i proteinforholdet mellom disse to fraksjonene.

### 1.10.1 Problemstilling

*Hvilken effekt har tilskudd av antioksidanter på treningsinduserte endringer i proteinnivåene av PGC-1 $\alpha$ , en sentral regulator av mitokondriebiogenesen, og stressproteinene HSP60 og HSP70 i m. vastus lateralis?*

#### **Studien har følgende hypotese:**

Inntak av C- og E-vitamin vil hemme den treningsinduserte oppreguleringen av PGC-1 $\alpha$ .

HSP60 og HSP70 vil bli oppregulert ved utholdenhetstreningen. Denne økningen forventes å bli hemmet ved inntak av C- og E-vitamin.

Det ble ikke valgt å lage noen hypoteser vedrørende Smartfish og astaxanthin. Dette var to kommersielle produkter som ble testet ut etter ønske fra produsent.

## 2.0 Metode

Masteroppgaven var en del av et forsøk ved Norges idrettshøgskole (NIH), hvor målet var å studere effekten av antioksidanttilskudd på tilpasninger til utholdenhetstrening.

Treningsintervensjonen ble gjennomført i perioden 2010-2011.

### 2.1 Design av studien

Strength, Antioxidant, Resistance and Adaptation (SARA), godkjent av Regional etisk komité for medisinsk forskning, var en randomisert kontrollert studie som sammenlikner tre ulike intervensjonsgrupper og en kontrollgruppe. Intervensjonsgruppene som fikk ulike antioksidanttilskudd, var delt inn i henholdsvis C- og E-vitamin og astaxanthin. I tillegg fikk en av gruppene drikken Smartfish, som blant annet inneholder antioksidanter fra fruktjuice. Både intervensjonsgruppene og kontrollgruppen gjennomførte det samme treningsopplegget og de samme testene. Denne studien ble finansiert av prosjektet SARA, med midler fra NIH, og ytterligere finansiering fra Smartfish og Vitaelab.

### 2.2 Forsøkspersoner

Denne studien inkluderte totalt 52 forsøkspersoner fra Høgskolen i Lillehammer (HiL) og Høgskolen i Østfold (HiØ). Jenter og gutter i alderen 18-45 år som trente regelmessig utholdenhetstrening (>1 økt pr uke) var egnet til å delta i studien. Legesjekk ble gjennomført på alle forsøkspersoner før første testrunde ble satt i gang.

Rekrutteringen av forsøkspersoner ble gjort ved plakater på HiL og HiØ. Informasjonsskriv ble delt ut til aktuelle og interesserte forsøkspersoner, hvor de fikk informasjon om hensikten med studien, og eventuelle risikoer forbundet med deltagelsen. Samtykkeerklæring måtte undertegnes og leveres for bekreftelse på at de hadde lest informasjonsskrivet og ønsket å delta i forsøket. Forsøkspersonene hadde mulighet til å trekke seg når som helst uten å oppgi en begrunnelse.

### 2.3 Frafall

Totalt 52 forsøkspersoner ble rekruttert til studien. En av forsøkspersonene avbrøt første biopsi på grunn av smerter, mens åtte forsøkspersoner gjennomførte av ulike grunner ikke biopsi to etter treningsperioden. Analysene på biopsimateriale til denne delen av studien ble gjennomført på totalt 44 forsøkspersoner.

### 2.4 Gruppeinndeling

Forsøkspersonene ble trukket inn i (randomisert i) fire ulike kosttilskuddsgrupper:

- C- og E-vitamin (1 g C-vitamin og 235 mg E-vitamin, i samme kapsel)
- Placebo
- Smartfish (200 ml x 2)
- Astaxanthin (4 mg til frokost)

Uavhengig av hvilken gruppe personene var i måtte de få i seg to kapsler og én drikk før og etter trening. På dager uten trening ble inntaket gjennomført morgen og kveld.

**Tabell 1. Antropometriske variabler for forsøkspersonene som deltok i studien (n=44). Variablene viser gjennomsnitt og standardavvik i hver enkelt gruppe.**

	<b>C- og E-vitamin</b>	<b>Placebo</b>	<b>Smartfish</b>	<b>Astaxanthin</b>
Alder (år)	24,6 ± 4,4	22,8 ± 4,2	24 ± 6,0	26,2 ± 8,4
Høyde (cm)	180,5 ± 11,1	178,1 ± 8,8	177,5 ± 8,3	174,3 ± 9,1
Vekt (kg)	76,9 ± 12,0	74,4 ± 14,5	76,9 ± 10,0	71,0 ± 10,0
Kjønn	♂ = 7 ♀ = 4	♂ = 7 ♀ = 3	♂ = 7 ♀ = 4	♂ = 7 ♀ = 5

Verdiene er  $\bar{x} \pm SD$ .

### 2.5 Treningsprotokoll

Over en periode på 12 uker gjennomførte forsøkspersonene totalt 45 økter, med tre fastsatte treningsøkter de tre første ukene, og fire fastsatte treningsøkter de resterende seks ukene.

Treningsperioden besto av langkjøring (dag 1), intervall (dag 2), langkjøring (dag 3), intervall (dag 4, uke 4-12). Utover de tre til fire innlagte øktene kunne forsøkspersonene ha maksimalt to tilleggsøkter per uke, dette måtte oppgis i deres treningsdagbøker.



**Tabell 2. Oversikt over treningsperioder og sammensetning av økter og varighet.**

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

### Restriksjoner ved treningsøktene

Oppvarming og nedtrapping etter endt økt skulle være på 5-15 minutter. Ved intervalltrening skulle farten på hvert drag har jevnest mulig intensitet/hastighet, med pauser på to minutter. En optimal intervalløkt ble gjennomført i en slak oppoverbakke, eventuelt med 1-5 % helling på en tredemølle. De lengre utholdenhetsøktene kunne gjennomføres på sykkel, langrenn eller rollerblades. Det var viktig at dette ble ført inn i treningsdagbøkene. I tillegg måtte sykdommer, skader og ubehag på grunn av supplementene oppgis i treningsdagbøkene.

### 2.6 Måling av VO<sub>2</sub>maks

Måling av VO<sub>2</sub>maks ble gjennomført som en trappe-test, der arbeidsbelastningen ble økt med 1 km/t per minutt i tre trinn, deretter økte hastigheten med ½ km/t per minutt til utmattelse. Alle forsøkspersoner måtte gjennomføre en tilvenningstest før måling av VO<sub>2</sub>maks for å kunne beregne startbelastningen for testen. I tilvenningstesten startet kvinner på 8 km/t, mens menn startet på 10 km/t. Startbelastning ble satt til siste godkjente belastning ved tilvenningstest minus 3 km/t. For å kunne godkjenne en belastning måtte belastningsnivået gjennomføres i minst 25 sekunder.

### 2.7 Muskelbiopsi

Muskelbiopsi ble tatt før og etter treningsperioden på 12 uker fra *m. vastus lateralis*. Biopsi etter treningsperioden ble tatt minimum to dager, men innen en uke etter siste treningsøkt. Punktbiopsi ble gjennomført med Bergstrøm nålteknikk med Pelomi-nåler (6mm; Albersund, Denmark) ved manuelt vakuüm. Xylocain-epinephrine 10 mg/ml + 5 µg/ml (AstraZeneca, Södertälje, Sweden) ble benyttet for lokalbedøvelse. Hudoverflaten ble sterilisert før snitting.

Biopsiene ble delt opp i biter à 50 mg etter fjerning av fettvev, bindevev og blodkoagel, og fryst ned i isopentan og oppbevart i ultrafryser ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  til videre analyser. Resterende del av biopsiene ble frosset og lagret til snitt, RNA og eventuelt en rest (reserve).

## 2.8 Homogenisering/ekstrahering

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Merck Biosciences, Cat. No. 539790) ble benyttet for ekstrahering av fire ulike fraksjoner; cytosol, membran, kjerne og cytoskjelett. Fraksjoneringen var nødvendig for å kunne undersøke lokalisering av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 i cytosol- og kjernefraksjonene. Homogeniseringen av muskelvevet ble gjort ved hjelp av OMNI-knivhomogenisator, i korte intervall (3 x 5 sekunder) for å unngå oppvarming av løsningen. Ulike ekstraksjonsbufferer, med ulike sentrifugeringstrinn, ble benyttet for ekstraksjon av de fire fraksjonene i henhold til prosedyren. Fraksjonene ble til slutt fordelt i ulike aliquoter à 50  $\mu\text{l}$  (cytosol og membran) og 25  $\mu\text{l}$  (kjerne og cytoskjelett). Prøvene ble oppbevart i ultrafryser ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  til videre analyser ved elektroforese og Western Blot.

## 2.9 Måling av totalprotein

Proteininnholdet ble bestemt ved Lowry-based detergent-compatible protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Bovine  $\gamma$  Globulin (BGG) Standard set (0,125-1,5 mg/ml) (Cat no. 500-0209) ble benyttet til protein standardkurve. Cytosol ble analysert ufortynnet, mens kjernefraksjonen måtte bli fortynnet 1:2 med ultrarent type 1 vann. Fraksjonene ble til en hver tid oppbevart på is. Triplikater à 5  $\mu\text{l}$  (CV<10 %) ble analysert i en 96-brønns mikroplate (Greiner Bio-one, Kremsmünster, A). Proteinmålinger av prøver fra samme forsøksperson ble analysert på samme 96-brønns mikroplate, for å få mest like forutsetninger før Western blot analysen. Prøvene ble avlest i en plateleser (AXYS) ved 690 nm og proteinkonsentrasjonene ble beregnet med KIM software (Asys, Eugendorf, A.).

## 2.10 Immunoblotting – metode utprøving

PGC-1 $\alpha$  finnes i meget lave konsentrasjoner i de to fraksjonene, og det var derfor nødvendig å gjennomføre metodetesting for å finne den mest optimale metoden å gjennomføre analysene av PGC-1 $\alpha$  på.

### 2.11 Prøvebehandling og Western blotting

Mengden PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 i muskelfraksjonen, henholdsvis cytosol og kjerne, ble analysert ved hjelp av NuPAGE® Western Blot Novex Mini-Cell system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ut i fra en mal ble mengdeforhold mellom prøve og buffere beregnet. Muskelfraksjonene ble fortynnet med ultrarent type 1 vann, et reduserende reagens (Sample Reducing Agent (10 X), NP0009) og et denaturerende reagens (LDS Sample Buffer (4 X), NP0007) slik at samme mengde protein ( $\mu$ g) i forsøkspersonenes prøver før og etter treningsperioden ble tilsatt i hver brønn i gelen. Prøvene ble deretter varmet opp på til 70 °C i 10 min i en varmeblokk.

Forhåndsstøpte polyacrylamide mini-gel system-geler, 10 brønners NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Mini Gel (NP0321BOX) ble brukt til elektroforese av prøvene. Det ble tilsatt 200 ml kald elektroforesebuffer (MOPS SDS Running Buffer (20 X), NP0001) og 500  $\mu$ l Antioxidant (NP0005) i det indre ELFO-kammeret. Det ytre kammer ble tilsatt kun elektroforesebuffer. 30  $\mu$ l av de varmebehandlede prøvene og 5  $\mu$ l markør (Protein marker PS11, Cat. No.: 310005, GeneOn) ble applisert. Alle prøver fra samme forsøkeperson ble applisert og analysert på samme gel. Proteinene ble separert ved konstant spenning, 200 V i cirka 50 minutter under denaturerende betingelser, og deretter overført til PVDF membraner (Immun-Blot® PVDF Membrane, pore size 0,2  $\mu$ m, Cat. #162-0177, Bio Rad) ved 30 V i 90 minutter. Membranene ble blokkert i 5 % skummetmelk (Merck Biosciences, Cat.no. VL528863) i TBS-T (Tris Buffered Saline, Cat. #170-6435, Bio Rad og 0,1 % Tween®20, Cat.no. P7949-100 ml, Sigma Aldrich) i to timer i romtemperatur. For å kontrollere effekten av overføringen av proteinene ble Coomassie Blue (Simply Blue™ Safe Stain, Cat. no. LC6065, Invitrogen) benyttet for farging av gjenværende proteiner i gelene.

Før inkubering med primært antistoff ble membranene vasket med TBS-T. Membranene ble inkubert med monoklonale antistoffer mot HSP60 og HSP70 ved 4 °C over natt, mens polyklonalt antistoff mot PGC-1 $\alpha$  ble inkubert ved RT over natt i 1 % skummetmelk i TBS-T. Membranene ble neste dag vasket med TBS-T og TBS, før de ble inkubert i en time i RT med sekundært antistoff fortynnet i 1 % skummetmelk i TBS-T. Etter inkubering med sekundært antistoff ble membranene vasket med TBS-T og TBS, før membranene ble påført chemiluminescent SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Prod. # 34076, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) for påvisning av proteinbåndene på membranene. Kodak Image Station 2000R ble benyttet til bildetakningen. Videre ble netto lysintensiteten på

båndene beregnet med Kodak 1D software (versjon 3.6.1, Kodak). Netto lysintensitet av et bånd er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet som er avgrenset i et manuelt markert rektangel.

**Tabell 3. Oversikt over primære og sekundære antistoffer som ble benyttet i denne studien.**

Antistoff	Art/Ig klasse	Binder seg til	Produsent	Cat.no	Protein kons.	Fortynning
Anti-Hsp60	Mus IgG1, monoklonalt	HSP60	Stressgen	SPA-807	1 mg/ml	1:4000
Anti-Hsp70	Mus IgG1, monoklonalt	HSP70	Stressgen	SPA-810	1 mg/ml	1:4000
Anti-PGC-1, C-terminal	Kanin IgG, polyklonalt	PGC-1 $\alpha$	Calbiochem	516557	1 mg/ml	1:1000
Goat-anti-mouse IgG, HRP	Geit IgG	Monoklonalt antistoff fra mus	Thermo Scientific	31430	0.8 mg/ml	1:30 000
Goat-anti-rabbit IgG, HRP	Geit IgG	Polyklonalt antistoff fra kanin	Thermo Scientific	31460	0.8 mg/ml	1:30 000

## 2.12 Statistikk

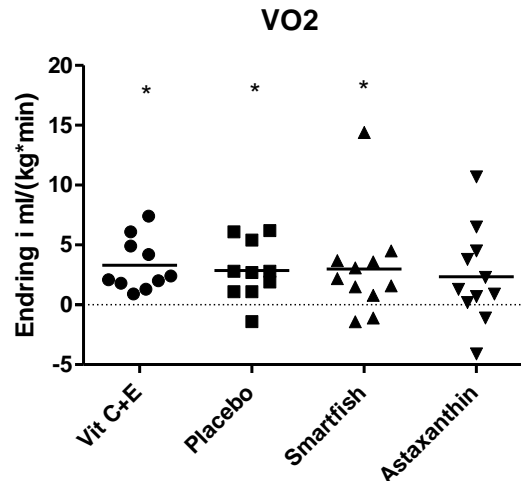
For sammenlikning av de fire gruppene ble det benyttet en enveis ANOVA med post-hoc-tester (Bonferroni). Parvis t-test og Mann-Whitney-Wilcoxon test ble brukt for å undersøke endringer innen samme gruppe. Effektstørrelsen ble beregnet for å sammenlikne forskjeller for endringene i de tre tilskuddgruppene og endringene i placebogruppen. Dette ble gjort for å kunne si noe om betydningen (størrelsen) av forskjellene. Effektstørrelsen er differansen i gjennomsnittet dividert med det samlede standardavviket. 0,3-0,5 tilsvarer svak effekt, 0,5-0,75 tilsvarer moderat effekt og over 0,75 tilsvarer stor effekt. Forhold mellom variabler ble analysert med Pearsons korrelasjonstest. All data fra Western blot analysene ble presentert som netto lysintensitet, der bakgrunnen ble trukket fra pikslene i båndet. Signifikant nivå ble satt til  $p \leq 0,05$ . Kalkuleringer ble gjort i Microsoft® excel 2007 og Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 3.0 Resultater

Målet med denne studien var å undersøke om utholdenhetstrening og tilskudd av antioksidanten C- og E-vitamin påvirker proteiner som er med i reguleringen av mitokondriebiogenesisen og proteiner som beskytter mot cellulært stress. I tillegg ble antioksidanten astaxanthin og drikken Smartfish, som inneholder blant annet antioksidanter fra fruktjuice undersøkt. For å undersøke effekten av antioksidanttilskudd på mer generelle treningstilpasninger til utholdenhetstrening ble  $VO_2$ maks målt før og etter treningsperioden. Uttrykket av PGC-1 $\alpha$ , som er en hovedregulator av mitokondriebiogenesisen i muskelceller, ble målt i homogeniserte muskelbiopsier fra en lårmuskel (*m.vastus lateralis*). I tillegg ble uttrykket av stressproteinene HSP60 og HSP70, valgt ut for å undersøke hvilken effekt tilskudd av antioksidantene hadde på disse proteinene som er en del av muskelcellenes forsvar mot ulike typer stress. Analyser ved Western blotting ble gjennomført for å undersøke uttrykket av de tre proteinene før og etter treningsperioden.

#### 3.1 Endring i $VO_2$ maks

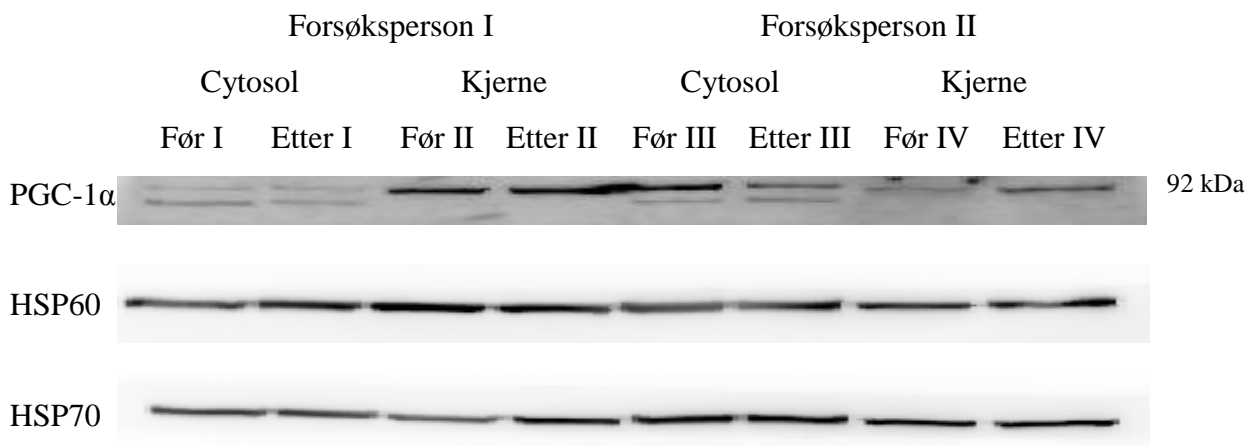
Effekten av antioksidanttilskuddene på den generelle adaptasjonen til utholdenhetstrening ble undersøkt ved testing av  $VO_2$ maks før og etter treningsperioden. Resultatene viste at det ikke var noen forskjeller mellom de gruppene som hadde fått tilført antioksidanter og placebogruppen. Alle gruppene samlet økte med 2,9 ml/(kg\*min). Dette utgjorde en økning i  $VO_2$ maks på 5,6 % (figur 4). Det var en signifikant endring i tre av gruppene ved sammenlikning av prøvene tatt før og etter treningsperioden. Gruppen med tilskudd av C- og E-vitamin økte med 6,3 % ( $p < 0,002$ ), placebogruppen økte med 5,7 % ( $p < 0,01$ ), og gruppen med tilskudd av Smartfish økte med 6,3 % ( $p = 0,03$ ). Det var ingen signifikant endring i gruppen med tilskudd av astaxanthin, men gruppen viste en tendens til forbedret  $VO_2$ maks, med en økning på 4,2 % ( $p = 0,09$ ).



Figur 4. Endringen i VO<sub>2</sub>maks målt i ml per kilogram kroppsvekt per minutt for hver forsøksperson i de fire gruppene (punkter) og som gjennomsnitt for hver gruppe (horisontal strek). \* indikerer signifikant endring for hver gruppe etter avsluttet treningsperiode.

### 3.2 Western blotting av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70

Før og etter treningsperioden ble det tatt biopsi av hver forsøksperson. Disse prøvene ble benyttet til analyser med Western blotting av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70. Ved analysing ble hver gel tilsatt prøver fra to forsøkspersoner. Det var totalt fire prøver fra hver forsøksperson; én prøve tatt før treningsperioden og én prøve tatt etter, i to ulike fraksjoner: cytosol og kjerne (figur 5).

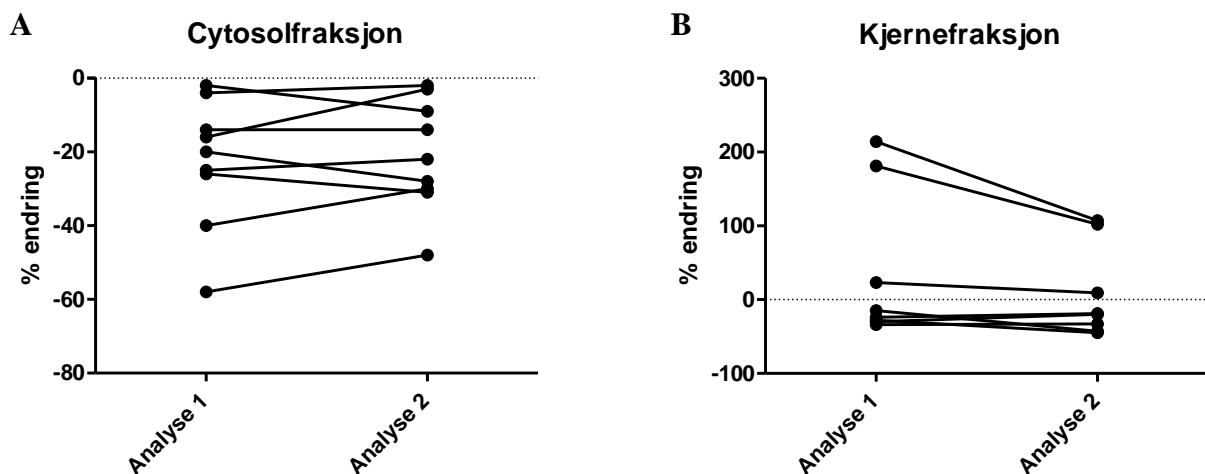


Figur 5. Immunoblot av proteinene PGC-1 $\alpha$  (92 kDa), HSP60 (60 kDa) og HSP70 (70 kDa) for to tilfeldige, representative forsøkspersoner med prøver fra før og etter treningsperioden i både cytosol- og kjernefraksjoner.

Immunoblottene av de tre proteinene, PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70, vist i figur 5, er tilfeldig valg ut fra Western blot analysene som ble gjennomført i denne studien. Immunoblottene ble videre benyttet til beregning av endringer i båndintensitet mellom prøver tatt før og etter treningsperioden.

### 3.3 Reproduserbarhet av HSP60 og HSP70

Proteinene HSP60 og HSP70 ble analysert to ganger ved to uavhengige Western blot analyser. Det ble benyttet fire til fem forsøkspersoner, som vist i figur 6, for hver sammenlikning. Det var ingen signifikante forskjeller i endringen i proteinuttrykk fra før til etter treningsperioden mellom de to analyseringene av HSP60 og HSP70 i verken cytosol- eller kjernefraksjonene (Wilcoxon; figur 6). Gjennomsnittlig endring i proteinuttrykk for analyse 1 og 2 i cytosolfraksjonen ble henholdsvis -23 % (SD = 18) og -21 % (SD = 15). Gjennomsnittlig endring i proteinuttrykk for analyse 1 og 2 i kjernefraksjonen ble henholdsvis 36 % (SD = 102) og 7 % (SD = 62) og det var spesielt to forsøkspersoner som fikk noe avvikende resultater (figur 6, B).



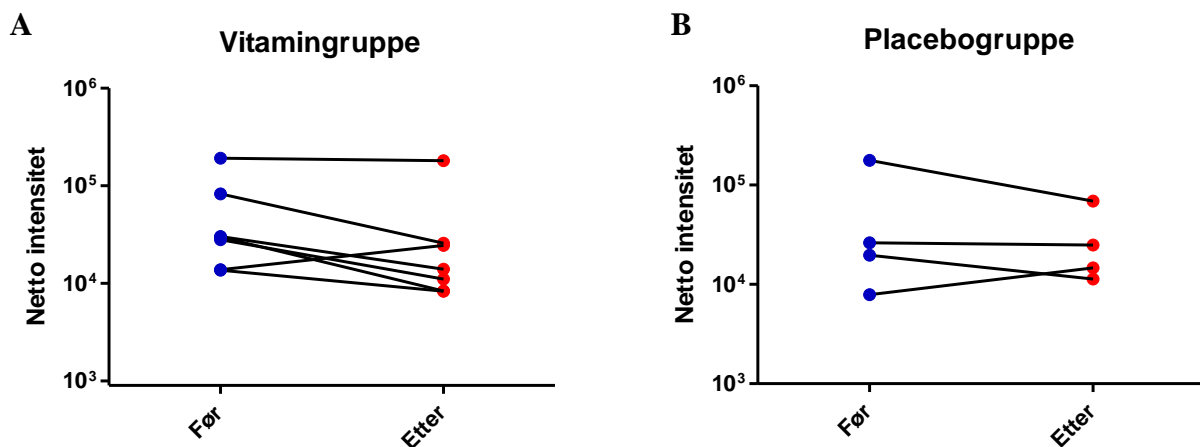
Figur 6. (A) Sammenlikning av den prosentvise endringen fra to uavhengige analyser, analyse 1 og analyse 2, for HSP60 og HSP70 i cytosolfraksjonene. (B) Sammenlikning av den prosentvise endringen fra to uavhengige analyser, analyse 1 og analyse 2, for HSP60 og HSP70 i kjernefraksjonene.

### 3.4 Endringer av PGC-1 $\alpha$ og heat shock proteiner

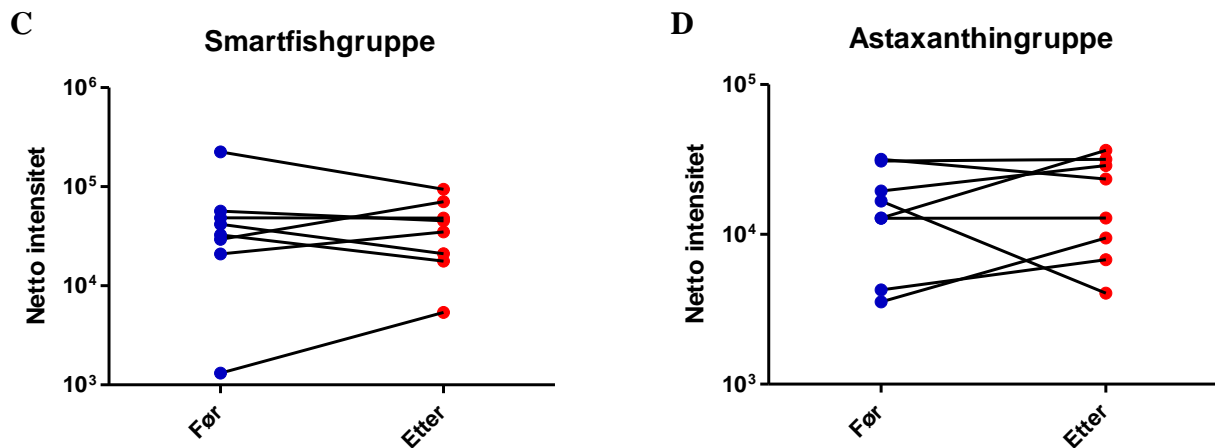
For proteinene PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70, ble det målt netto intensitet av båndene fra Western blot analysene i cytosol- og kjernefraksjonene. Verdiene ble benyttet til å se på endringer fra før til etter treningsperioden. I tillegg ble det sett på forskjeller mellom de fire gruppene ved inntak av ulike antioksidanter. Effektstørrelsen til gruppene som inntok antioksidanter ble sammenliknet med placebogruppen for å se på betydningen av forskjeller eventuelt betydningen av tendensene til forskjeller mellom gruppene tilført antioksidanter i forhold til placebogruppen. Ved trening skjer det en translokasjon av PGC-1 $\alpha$  fra cytosol inn i kjernen der den setter i gang transkripsjon av gener som er involvert i mitokondriobiogenesen. Det var derfor interessant å undersøke endringer i lokasjonen av PGC-1 $\alpha$  etter treningsperioden ved å beregne ratioen mellom cytosol- og kjernefraksjonene. PGC-1 $\alpha$  ble også sammenliknet opp mot VO<sub>2</sub>maks ved en korrelasjonsanalyse for å se på mulige sammenhenger mellom treningseffektene i PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks.

#### 3.4.1 PGC-1 $\alpha$ , cytosolfraksjon

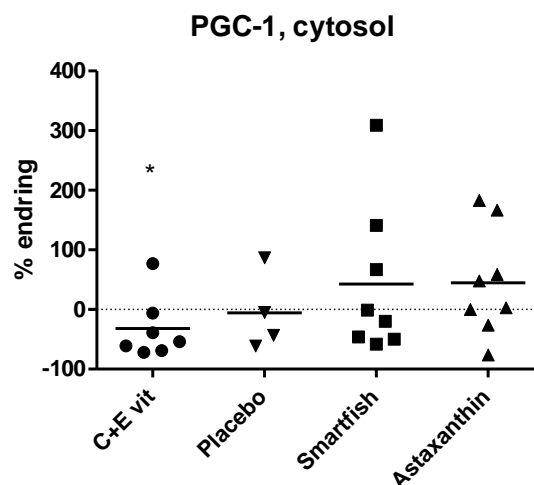
Innen de fire gruppene var det en signifikant reduksjon av PGC-1 $\alpha$  i gruppen som inntok C- og E-vitamin ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon; figur 7). Det var ingen signifikante forskjeller mellom de fire gruppene i innhold av PGC-1 $\alpha$  i cytosolfraksjonen (figur 8).







Figur 7. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i cytosolfraksjonen for PGC-1 $\alpha$ . Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.

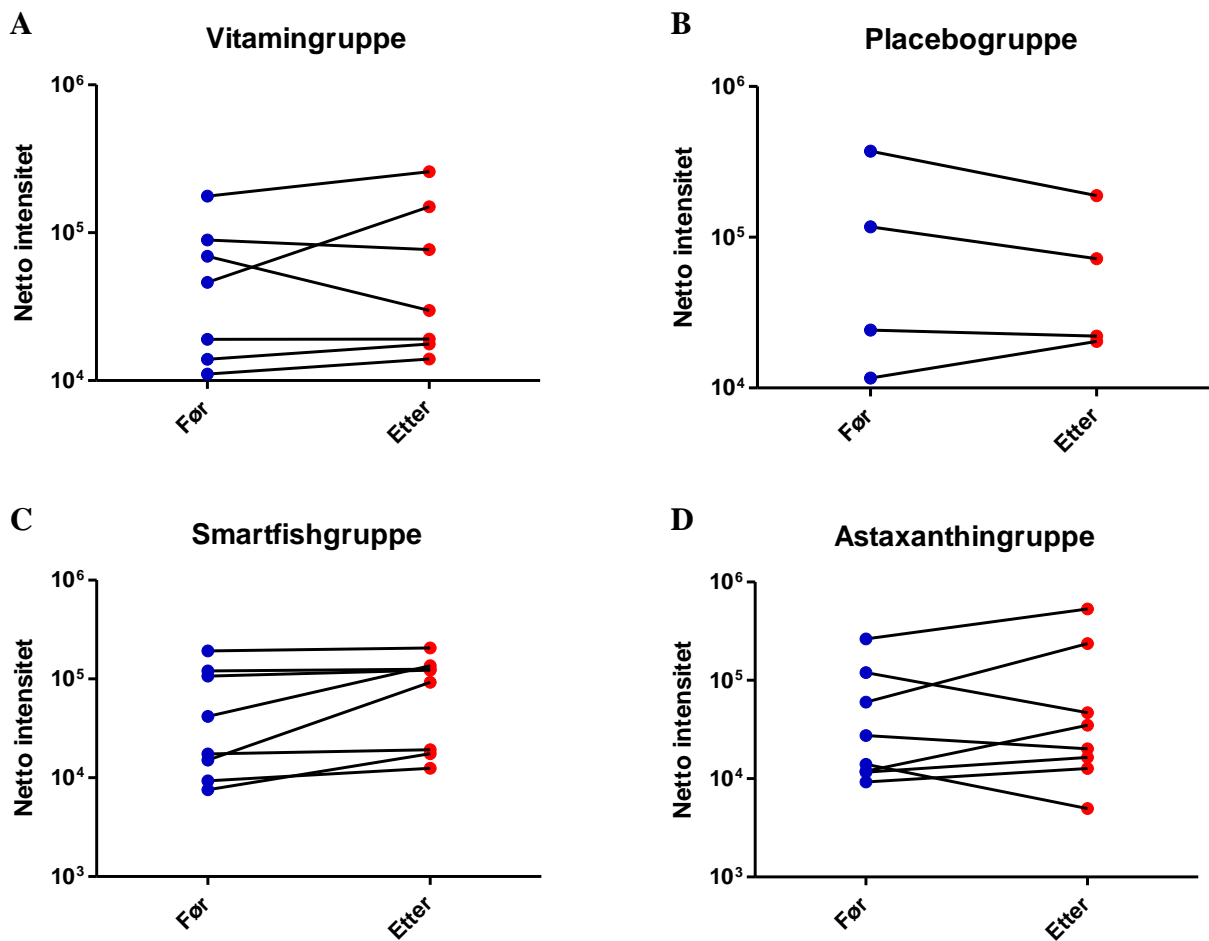


Figur 8. Prosentvis forandring av PGC-1 $\alpha$  i cytosolfraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe. \* indikerer signifikant endring for hver gruppe etter avsluttet treningsperiode.

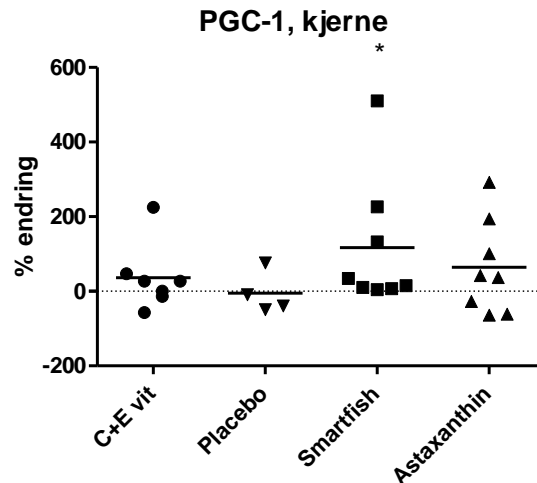
### 3.4.2 PGC-1 $\alpha$ , kjernefraksjon

Innen de fire gruppene var det en signifikant økning av PGC-1 $\alpha$  i kjernefraksjonene i gruppen som inntok Smartfish ( $p < 0,01$ ; Wilcoxon; figur 9). Det var også en økning av PGC-1 $\alpha$  i kjernen når alle gruppene ble sett under ett. Det var ingen forskjeller mellom de fire gruppene i innhold av PGC-1 $\alpha$  i kjernefraksjonen (figur 10). Ved å sammenlikne endringene i placebogruppen med endringene i gruppene tilført antioksidanter fikk gruppen som inntok C-

og E-vitamin en effektstørrelse på 0,5. Gruppen som inntok Smartfish fikk en effektstørrelse på 0,74 og gruppen som inntok astaxanthin fikk en effektstørrelse på 0,6.



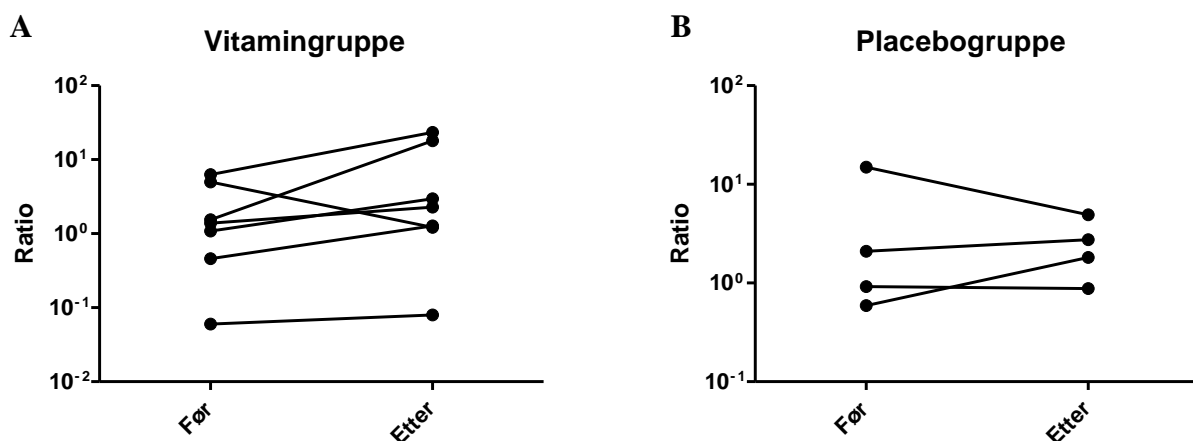
Figur 9. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i kjernefraksjonen for PGC-1 $\alpha$ . Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.

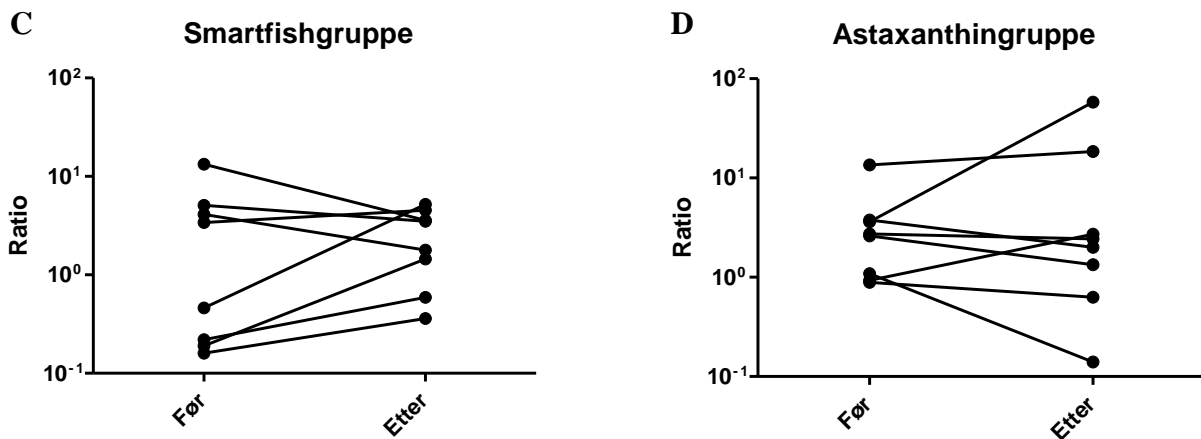


Figur 10. Prosentvis forandring av PGC-1 $\alpha$  i kjernefraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe. \* indikerer signifikant endring for hver gruppe etter avsluttet treningsperiode.

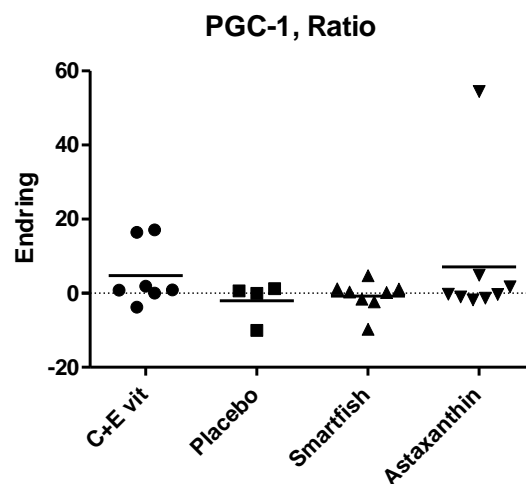
### 3.4.3 Ratio mellom cytosol- og kjernefraksjon

Translokasjonen av PGC-1 $\alpha$  ble undersøkt ved beregning av ratioen mellom cytosol- og kjernefraksjonene. Det var ingen signifikante forskjeller i ratioen mellom cytosol- og kjernefraksjonene i noen av de fire gruppene (figur 12) og heller ingen signifikante endringer innen gruppene gjennom treningsperioden (figur 11).





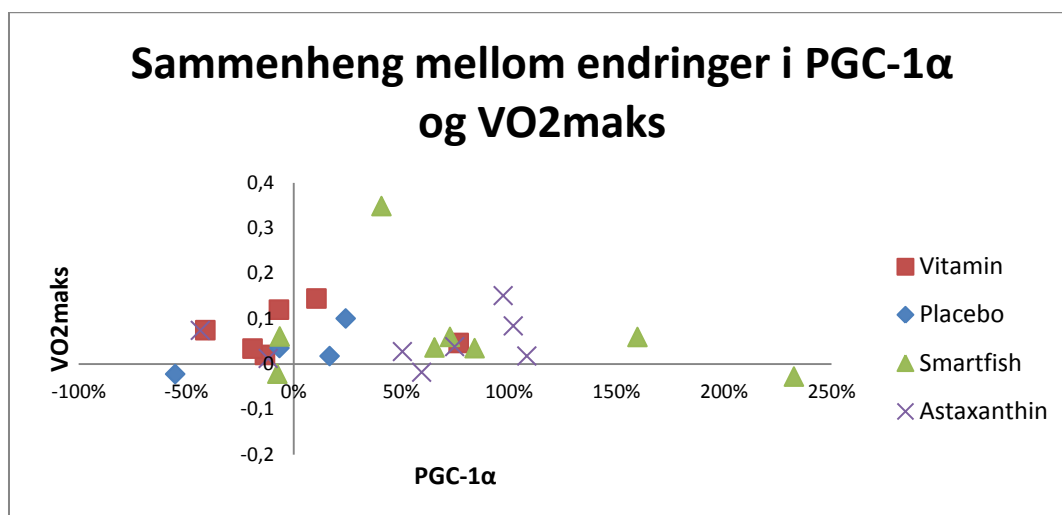
Figur 11. Ratio for prøvene før treningsperioden i cytosol- og kjernefraksjonene og prøvene etter treningsperioden i cytosol- og kjernefraksjonene. (A) Ratio for prøvene i gruppen som inntok C- og E-vitamin. (B) Ratio for prøvene i placebogruppen. (C) Ratio for prøvene i gruppen som inntok Smartfish. (D) Ratio for prøvene i gruppen som inntok astaxanthin.



Figur 12. Endringen av ratioene i prøvene tatt før og etter treningsperioden for cytosol- og kjernefraksjonene i PGC-1 $\alpha$  i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt er endringen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe.

### 3.4.4 Sammenheng mellom endringer i PGC-1 $\alpha$ og VO<sub>2</sub>maks

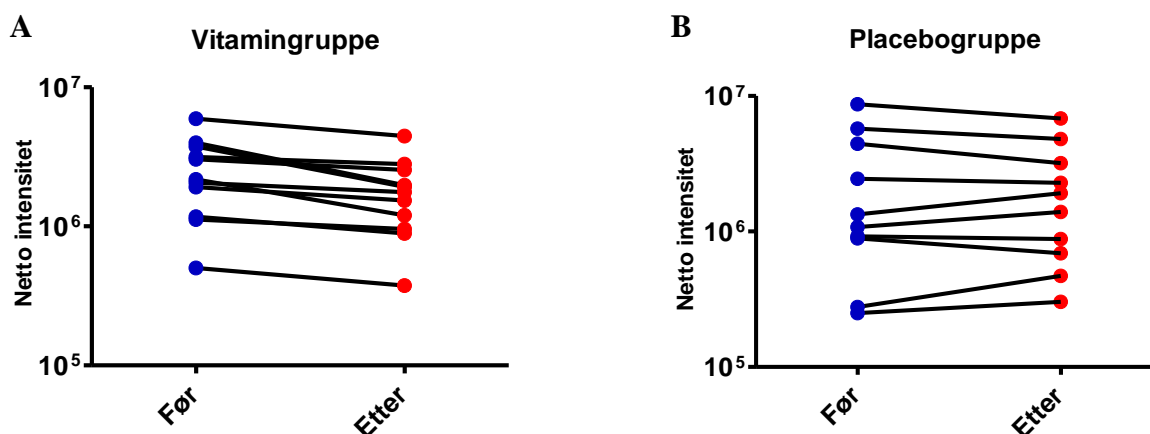
Etter å ha sett på resultatene for PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks hver for seg var det interessant å undersøke om det var noen sammenheng mellom endring i PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks i de ulike gruppene med inntak av antioksidanter. Korrelasjonen mellom endring i PGC-1 $\alpha$  og endring i VO<sub>2</sub>maks viste en signifikant sammenheng i placebogruppen ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,05$ ), men det var ingen god korrelasjon i de andre gruppene og heller ingen god korrelasjon når alle forsøkspersonene ble sett under ett (figur 13).

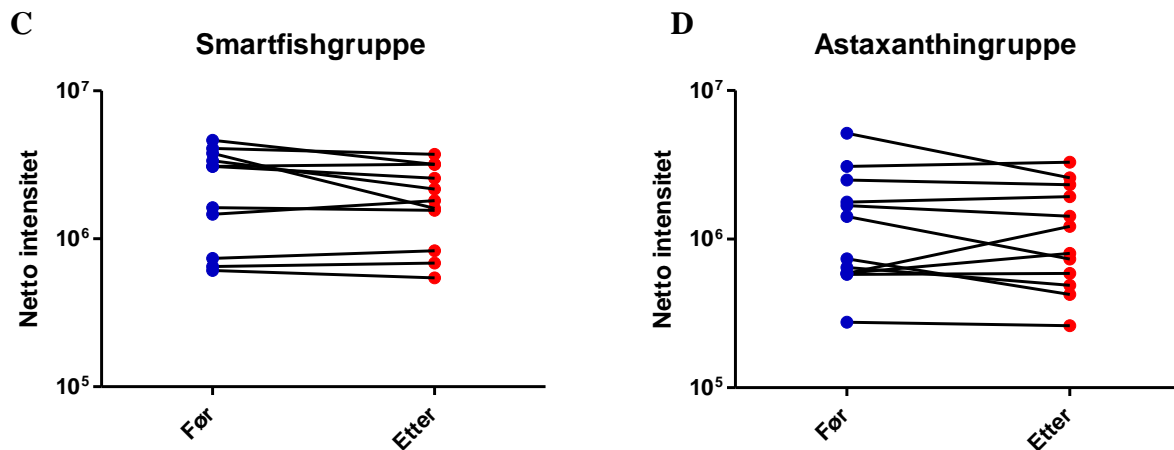


Figur 13. Sammenhengen mellom endringen PGC-1 $\alpha$  og endringen i VO<sub>2</sub>maks i hver tilskuddsgruppe. Ulike symboler for hver enkelt gruppe er representert i diagrammet.

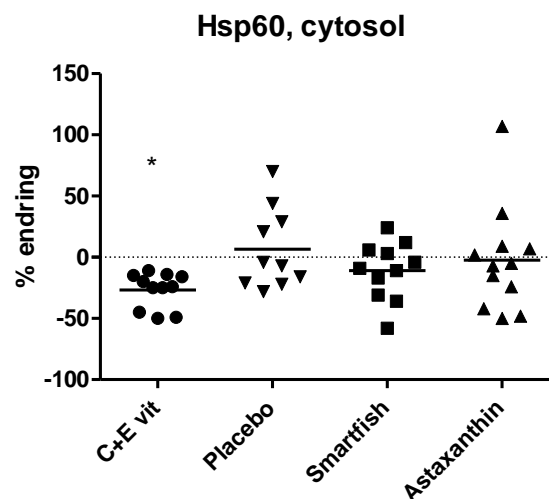
### 3.4.5 HSP60, cytosolfraksjon

HSP60 er et stressprotein som hovedsakelig er assosiert med mitokondriene. Innen de fire gruppene var det en signifikant reduksjon av HSP60 i cytosolfraksjonene i gruppen som inntok C- og E-vitamin ( $p < 0,01$ ; paret t-test; figur 14). Det var ingen signifikante forskjeller mellom de fire gruppene i innhold av HSP60 i cytosolfraksjonen, men det var en tendens til at endringen i placebogruppen var forskjellig fra endringen i gruppen som inntok C- og E-vitamin, ( $p < 0,07$ ; enveis ANOVA, Bonferroni; figur 15). Effektstørrelsen for endringen i gruppen som inntok C- og E-vitamin var på 1,27 i forhold til placebogruppen. Effektstørrelsen for endringene i gruppen som inntok Smartfish og endringene i gruppen som inntok astaxanthin sammenliknet med endringene i placebogruppen var på henholdsvis 0,57 og 0,22.





Figur 14. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i cytosolfraksjonen for HSP60. Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.

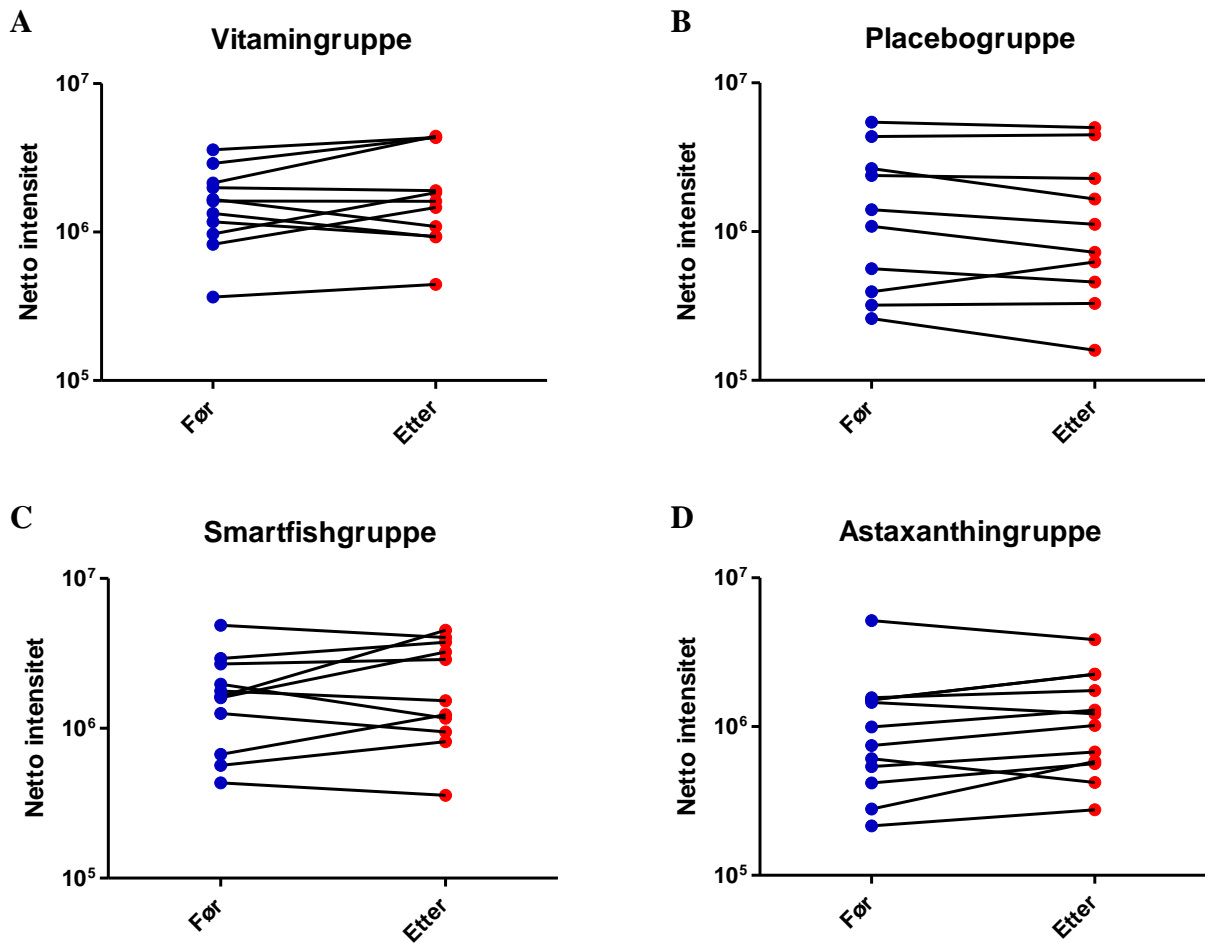


Figur 15. Prosentvis forandring av HSP60 i cytosolfraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe. \* indikerer signifikant endring for hver gruppe etter avsluttet treningsperiode.

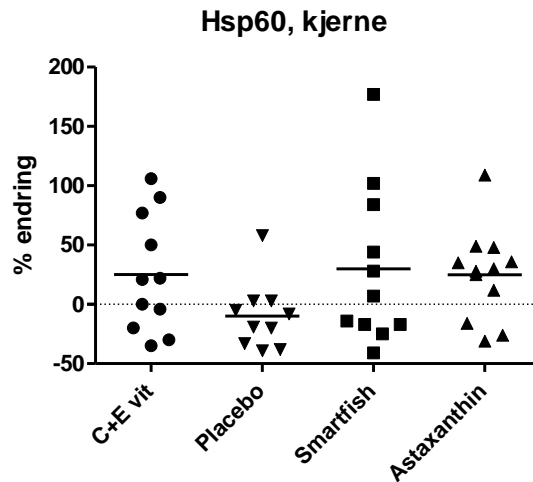
### 3.4.6 HSP60, kjernefraksjon

Innen de fire gruppene var det ingen forskjeller i HSP60 i kjernefraksjonene mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden i de ulike gruppene (figur 16). Det var heller ingen forskjeller mellom de fire gruppene i innhold av HSP60 i kjernefraksjonen (figur 17). Ved å sammenlikne endringene målt i placebogruppen med endringene i gruppene som fikk tilskudd av antioksidanter, fikk gruppen som inntok C- og E-vitamin en effektstørrelse på 0,82,

gruppen som inntok Smartfish fikk en effektstørrelse på 0,73 og gruppen som inntok astaxanthin fikk en effektstørrelse på 0,98.



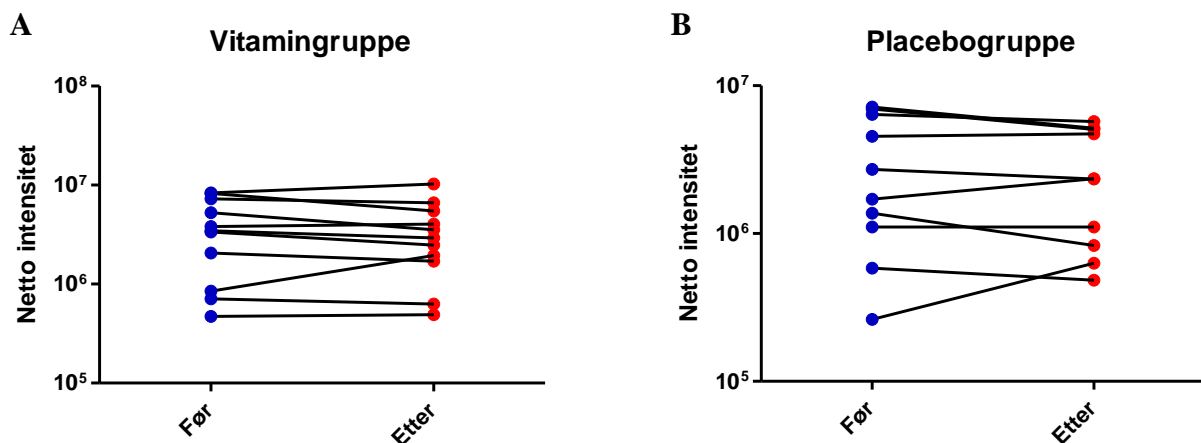
Figur 16. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i kjernefraksjonen for HSP60. Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.



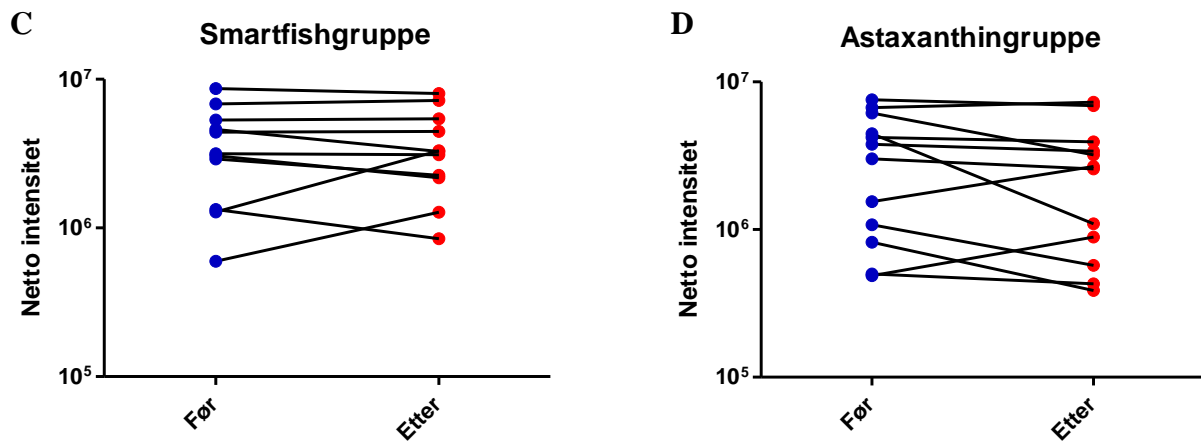
Figur 17. Prosentvis forandring av HSP60 i kjernefraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe.

### 3.4.7 HSP70, cytosolfraksjon

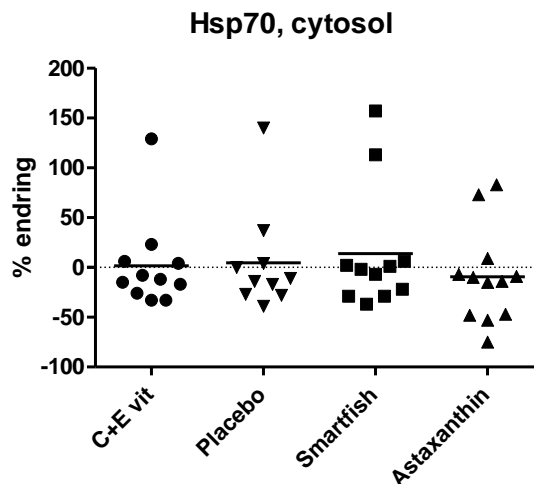
Innen de fire gruppene var det ingen signifikante forskjeller i HSP70 i cytosolfraksjonene mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden i de ulike gruppene (figur 18). Det var ingen forskjeller mellom de fire gruppene i innhold eller i innhold av HSP70 i cytosolfraksjonen (figur 19).







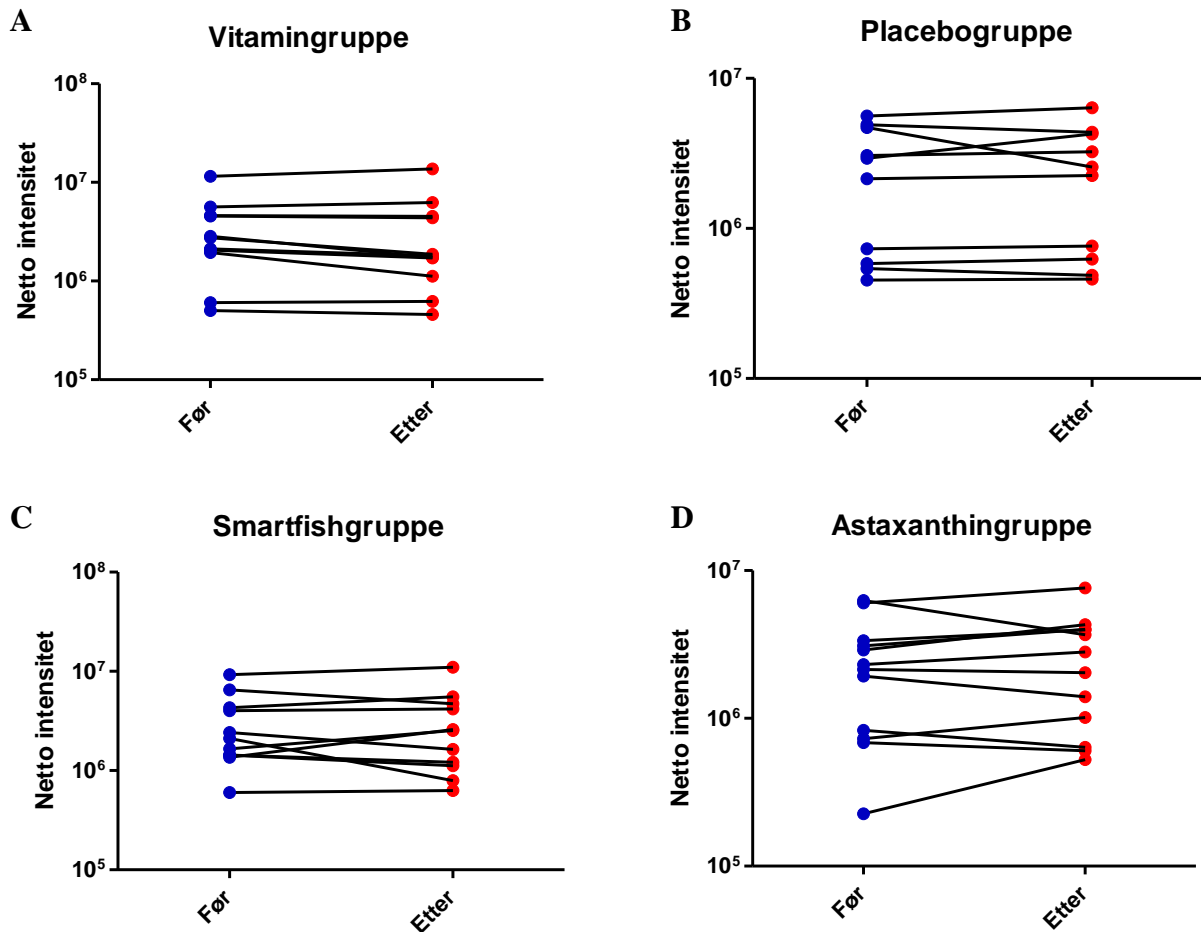
Figur 18. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i cytosolfraksjonen for HSP70. Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.



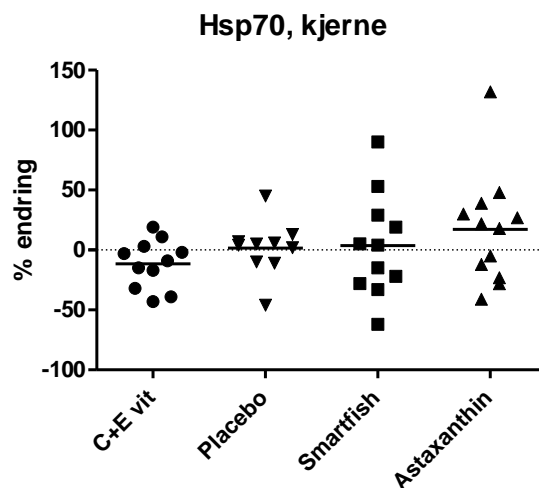
Figur 19. Prosentvis forandring av HSP70 i cytosolfraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe.

### 3.4.8 HSP70, kjernefraksjon

Innen de fire gruppene var det ingen signifikante forskjeller i HSP70 i kjernefraksjonene mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden i de ulike gruppene (figur 20). Det var ingen forskjeller mellom de fire gruppene i innhold eller endring i innhold av HSP70 i kjernefraksjonen (figur 21).



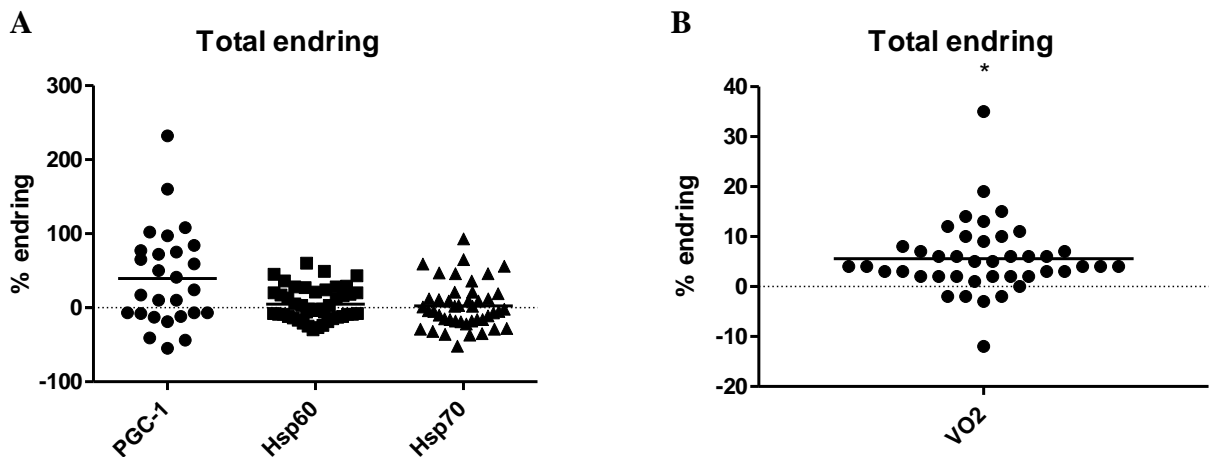
Figur 20. Netto lysintensitet av båndene fra de fire intervensjonsgruppene før og etter treningsperioden for hver enkelt forsøksperson i kjernefraksjonen for HSP70. Netto lysintensitet er summen av bakgrunnen trukket fra pikslene i båndet.



Figur 21. Prosentvis forandring av HSP70 i kjernefraksjonen i de fire gruppene tilført antioksidanter. Hvert punkt representerer den prosentvise differansen mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson i hver enkelt gruppe. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring i hver gruppe.

### 3.5 Den totale endringen i HSP60, HSP70, PGC-1 $\alpha$ og VO<sub>2</sub>maks

Til slutt var det av interesse å se på endringen i VO<sub>2</sub>maks, PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 uavhengig av de fire gruppene med ulikt tilskudd av antioksidanter. For PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 er den totale endringen summen av endringene i cytosol- og kjernefraksjonene. Ved å se på den totale endringen for alle forsøkspersonene kunne vi se en tendens til oppregulering for den totale endringen av PGC-1 $\alpha$  på 40 %. HSP60 og HSP70 viste en fordeling med tilnærmet ingen endring (figur 22, A). VO<sub>2</sub>maks viste en økning på 5,6 % etter treningsperioden (figur 22, B).



Figur 22. (A) Hvert punkt representerer den prosentvise differansen for uttrykket av proteinene, PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70, mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson. De horisontale strekene representerer gjennomsnittlig endring. (B) Hvert punkt representerer den prosentvise differansen for uttrykket av VO<sub>2</sub>maks, mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden for hver forsøksperson. Den horisontale streken representerer gjennomsnittlig endring. \* indikerer signifikant endring for hver gruppe etter avsluttet treningsperiode.

## 4.0 Diskusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke om utholdenhetstrening og tilskudd av antioksidantene C- og E-vitamin påvirker proteiner som er med i reguleringen av mitokondriebiogenesisen og proteiner som beskytter mot cellulært stress. I tillegg ble antioksidanten astaxanthin og drikken Smartfish, som blant annet inneholder antioksidanter fra fruktjuice, undersøkt. Påvirkningen ble undersøkt ved måling av  $VO_2$ maks og ved å se på endring av proteininnhold i muskelbiopsier før og etter treningsperioden. I muskelbiopsiene ble mengden PGC-1 $\alpha$ , som er viktig for reguleringen av mitokondriebiogenesisen, og stressproteinene HSP60 og HSP70 målt. Resultatene viste en reduksjon av PGC-1 $\alpha$  i cytosolfraksjonen i gruppen som inntok C- og E-vitamin, mens det var en oppregulering av PGC-1 $\alpha$  i kjernefraksjonen i gruppen som inntok Smartfish. HSP60 nivåene i cytosol ble også redusert i gruppen som inntok C- og E-vitamin. HSP60 i kjernefraksjonen var uendret. HSP70 viste ingen signifikante endringer, verken i cytosol- eller kjernefraksjonene. Det maksimale oksygenopptaket ( $VO_2$ maks) økte etter treningsperioden.

### 4.1 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på $VO_2$ maks

Etter 12 uker med trening var det en signifikant økning i  $VO_2$ maks i gruppen som inntok C- og E-vitamin, i gruppen som inntok Smartfish og i placebogruppen. Den siste gruppen som inntok astaxanthin, kunne vise til en økning i  $VO_2$ maks for 9 av 11 forsøkspersoner, men denne økningen var ikke signifikant. Økningen i  $VO_2$ maks på ~6 % var moderat, sammenliknet med hva som er observert i sammenliknbare studier (Helgerud et al. 2007), men det må understrekes at forsøkspersonene i vår studie var på forhånd relativt godt trent. I ulike studier er det funnet økning i  $VO_2$ maks på hele 24-40 % etter en periode med utholdenhetstrening på seks-ni uker (Hickson et al. 1981; Hoppeler & Weibel 2000; Tonkonogi et al. 2000). Tonkonogi *et al.* (2000) var en av de første studiene der man samtidig studerte effekten på human skjelettmuskulatur etter seks uker med trening på sykkel. Treningsperioden førte til økt  $VO_2$ maks og økt innhold av mitokondrier i muskelcellene. Gurd *et al.* (2010) gjennomførte en studie hvor seks uker med intervalltrening med høy intensitet kunne vise til en økning i  $VO_2$ maks. Studiene viser til økning i  $VO_2$ maks ved ulik belastning og type aerobtrening (Gurd et al. 2010; Tonkonogi et al. 2000). Treningsprogrammet i vår studie besto av både intervaller og lengre utholdenhetsøkter, og kunne vise til en økning i de fire gruppene.

Inntak av antioksidanter parallelt med trening har vist varierende resultater i forhold til effekt på maksimalt oksygenopptak. Etter tre måneder med utholdenhetstrening med inntak av E-vitamin (250 mg) og  $\beta$ -karoten (15 mg), i tillegg til 500 mg C-vitamin de siste 15 dagene, ble det vist en signifikant økning av  $VO_2$ maks hos mannlige idrettsutøvere (Aguiló et al. 2007). Daglig inntak av C-vitamin (1000 mg) i fire uker med intervalltrening med høy intensitet påvirket ikke effekten av treningsøktene til gjennomsnittlig aktive menn (Roberts et al. 2011). Nielsen *et al.* (1999) viste i en studie gjennomført med triatleter at supplementering med antioksidanttilskudd ikke hadde noen effekt på  $VO_2$ maks. Triatletene inntok 600 mg C-vitamin, 270 mg E-vitamin og 100 mg koenzym  $Q_{10}$  over en treningsperiode på seks uker. Også i en studie gjort på judoutøvere ble det observert uendret  $VO_2$ maks etter seks uker med trening ved inntak av omega-3 og E-vitamin (30 mg), og C-vitamin (60 mg) og  $\beta$ -karoten (6 mg) (Filaire et al. 2011). Studiene har hatt et lavere inntak av C- og E-vitamin sammenliknet med inntak av C- og E-vitamin i vår studie, men de benyttet i tillegg en ekstra antioksidant i tilskuddblandingen. Videre er treningsperioden betydelig kortere enn vår studie. I en studie over 12 uker med utholdenhetstrening, ble det dog ikke påvist noen effekt på økningen i  $VO_2$ maks ved tilskudd av 500 mg/dag med C-vitamin og 267 mg/dag med E-vitamin (Yfanti et al. 2011).

Studier med inntak av flere ulike vitaminer har gjentatte ganger vist ingen endring i  $VO_2$ maks (Peternej & Coombes 2011). Studiene er gjennomført over ulike tidsrom og ved ulik belastning på øktene, men studiene har ikke kunnet vist til noen treningseffekt (Filaire et al. 2011; Roberts et al. 2011). En studie gjennomført på gnagere kunne vise til redusert treningseffekt på  $VO_2$ maks og utholdenhetsprestasjon ved inntak av C-vitamin (1000 mg) under en treningsperiode på seks uker (Gomez-Cabrera et al. 2008a).

Vår studie kunne vise til en tilnærmet lik økning i  $VO_2$ maks ved sammenlikning av de fire intervensjonsgruppene. Dette tyder altså på at treningseffekten i gruppene med tilskudd av antioksidanter ikke skilte seg fra placebogruppen. C- og E-vitamin og astaxanthin har altså ikke gitt noen målbar effekt hos forsøkspersonene som inntok disse antioksidantene under treningsperioden.

## 4.2 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på PGC-1 $\alpha$

Utholdenhetstrening medførte en generell økning i PGC-1 $\alpha$  når alle gruppene ble sett under ett. Det var imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom intervensjonsgruppene og placebogruppen. Det er kjent at utholdenhetstrening kan utløse forandringer i uttrykket av mange transkripsjonsfaktorer involvert i mitokondriebiogenesen, deriblant PGC-1 $\alpha$ . Ved trening over en lengre periode, vil man kunne observere en gradvis økning i PGC-1 $\alpha$  nivåene (Hood et al. 2006). PGC-1 $\alpha$  spiller en viktig rolle i å bevare cellers funksjon og energiproduksjon (Adhietty et al. 2009), samt å opprettholde innholdet av antioksidantzymer i skjelettmuskulaturen (Ristow et al. 2009). Overeksponering av PGC-1 $\alpha$  i muskelcellene resulterer i økninger i mitokondriene, som igjen fører til en forbedring av respirasjonskapasiteten og oksidativ fosforylering (Wu et al. 1999). PGC-1 $\alpha$  mRNA innhold øker midlertidig i human skjelettmuskulatur i respons av én enkelt langvarig treningsøkt innen den første timen av restitusjonen. Mekanismer som regulerer treningspåført aktivering av PGC-1 $\alpha$  i musklene kan bli mer sensitive til trening over en periode med rolig, langvarig utholdenhetstrening (Pilegaard et al. 2003), og flere studier har vist en økning av PGC-1 $\alpha$  ved trening (Gurd et al. 2010; Hood et al. 2006). Intervalltrening med høy intensitet har også vist å føre til en økning i uttrykket av PGC-1 $\alpha$  (Gurd et al. 2010). Det synes derfor klart at både lengre utholdenhetsøkter og intervalltrening kan påvirke de samme signalveiene og dermed påvirke mitokondriebiogenesen (Little et al. 2010). Alle gruppene sett under ett, og uavhengig av cellefraksjon, viste en økning av PGC-1 $\alpha$  på 40 % i vår studie. Treningsprogrammet i vår studie besto av både intervaller og lengre utholdenhetsøkter. Økningen av PGC-1 $\alpha$  ved intervaller og lengre utholdenhetsøkter er således i samsvar med resultater fra andre treningsstudier.

Trening kan øke uttrykket av PGC-1 $\alpha$ , og denne oppreguleringen kan bli hemmet ved inntak av store doser C-vitamin (Gomez-Cabrera et al. 2008a). Ristow *et al.* (2009) viste at oppregulering av innhold av PGC-1 $\alpha$  mRNA i skjelettmuskulaturen ble dempet med en kombinasjon av 1000 mg C-vitamin og 267 mg E-vitamin daglig i fire uker under trening av trente og utrente menn. Gomez-Cabrera *et al.* (2008a) observerte at daglig inntak av C-vitamin i seks uker hemmet oppregulering av PGC-1 $\alpha$  i skjelettmuskulatur ved trening hos gnagere. C-vitaminene hemmet også oppreguleringen av transkripsjonsfaktorene, NRF-1 og mtTFA, som er kontrollert av PGC-1 $\alpha$ . Selv som det ikke var noen signifikante forskjeller mellom gruppene med tilskudd av antioksidanter og placebogruppen i vår studie, ble det

observert en reduksjon i cytosolfraksjonen i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Dette kan tyde på at tilskudd av C- og E-vitamin hemmet PGC-1 $\alpha$  produksjonen.

Hovedandelen av PGC-1 $\alpha$  i skjelettmuskulaturen befinner seg i cytosol. Én treningsøkt medfører imidlertid til akutt økning av PGC-1 $\alpha$  i kjernen. Flere studier på dyr har vist til denne translokeringen av PGC-1 $\alpha$  fra cytosol til kjernen (Adhietty et al. 2009; Wright et al. 2007). Få studier har derimot sett på translokering av proteinnivået av PGC-1 $\alpha$  i humant muskelvev (Little et al. 2010), slik det har blitt gjort i vår studie. Etter trening med høy intensitet over to uker kunne Little *et al.* (2010) vise til oppregulering av PGC-1 $\alpha$  i kjernen. Det ble derimot ikke observert noen endring av totalt PGC-1 $\alpha$  protein i muskelen. Måling av PGC-1 $\alpha$  i kjernefraksjonen kan derfor være en mer sensitiv teknikk enn måling av innholdet av proteinnivået i hele muskelen, og øker evnen til å oppdage forandringer etterfulgt av trening (Little et al. 2010). I vår studie ble det funnet redusert mengde PGC-1 $\alpha$  i cytosol i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Samtidig som PGC-1 $\alpha$  nivåene i kjernen ble oppregulert når alle gruppene ble sett under ett. Dette samsvarer med funn fra andre studier, hvor det ble observert translokasjon av PGC-1 $\alpha$  fra cytosol inn i kjernen (Wright et al. 2007). Oppregulering av PGC-1 $\alpha$  i kjernen er et normalt resultat av translokasjon ved utholdenhetstrening. Treningen kan ha opprettholdt uttrykket av PGC-1 $\alpha$  tross tilskuddenes hemmende effekt (Adhietty et al. 2009).

Placebogruppen viste noe overraskende ikke like stor økning av PGC-1 $\alpha$  i kjernen som gruppene som inntok antioksidanter, men det lave antallet datapunkter fra forsøkspersonene i denne gruppen gjør dette resultatet svært usikkert. Ved sammenlikning av forskjellene for endringene i hver gruppe med inntak av antioksidanter og endringene i placebogruppen, ble det ikke funnet noen signifikante endringer. På tross av dette ble det funnet tendenser til økning av PGC-1 $\alpha$  som kunne bekreftes av moderate effektstørrelser, ved sammenlikning av endringene i alle gruppene med tilskudd av antioksidanter mot endringene i placebogruppen.

Forholdet, eller ratioen, mellom PGC-1 $\alpha$  i cytosol- og kjernefraksjonen ble beregnet. Uten store endringer i den totale mengden PGC-1 $\alpha$  kan ratioen anses som et mål på grad av translokasjon av PGC-1 $\alpha$  (mellom cytosol og kjerne). Det var imidlertid ingen signifikante endringer i PGC-1 $\alpha$  cytosol-kjerne-ratioen, men det var en tendens i gruppen med inntak av C- og E-vitamin. Vi må ta med i betraktning at det er få resultater fra Western blot analysene av PGC-1 $\alpha$ , spesielt i placebogruppen. I gruppen som inntok C- og E-vitamin ble alle

oppregulert, bortsett fra en forsøksperson, men det var ingen signifikant endring. Gruppene som inntok Smartfish eller astaxanthin hadde ikke et tydelig reguleringsmønster. Placebogruppen var igjen vanskelig å tolke på grunn av kun fire forsøkspersoner. Det er derfor nødvendig å analysere flere forsøkspersoner før man kan trekke noen konklusjoner når det gjelder uttrykket av PGC-1 $\alpha$ , og endringer ved tilskudd av antioksidanter.

PGC-1 $\alpha$  er tilgjengelig for å påvirke mitokondriebiogenesen, men om den er nødvendig for treningspåvirket mitokondriebiogenese er ikke fullstendig avklart (Hood 2009). For å undersøke og illustrere konsekvensene av fravær av PGC-1 $\alpha$ , er det blitt gjennomført studier på mus hvor de har sammenliknet såkalte knockout-mus med fravær av PGC-1 $\alpha$  mot normale mus. Mitokondrievolumet ble lavere i skjelettmuskulaturen i PGC-1 $\alpha$  knockout-mus sammenliknet med de normale musene (Hood 2009). Respirasjonen ble også redusert ved fravær av PGC-1 $\alpha$  (Adhietty et al. 2009). Svekket mitokondrierespirasjon i skjelettmuskulatur indikerer redusert evne til å produsere ATP i musklene i knockout-mus og kan være med på å svekke muskelfunksjonen (Calvo et al. 2008). PGC-1 $\alpha$  er derfor viktig i vedlikeholdet av mitokondrienes funksjon og innhold i muskulaturen. Studier har likevel vist at fravær av PGC-1 $\alpha$  ikke opphever effekten av utholdenhetstrening på mitokondriebiogenesen (Hood 2009), men utholdenhetstrening har vist å motvirke nedgangen i mitokondriefunksjonen ved fravær av PGC-1 $\alpha$  (Adhietty et al. 2009).

I denne oppgaven presenteres ingen direkte mål på mitokondriebiogenese, men pågående analyser av cytochrom c oksidase, subenhet IV (COX4) viser en endring kun i placebogruppen. COX 4 er et protein i mitokondriene (elektrontransportkjeden) og økt mengde av dette proteinet indikerer således mitokondriebiogenese.

Det var en korrelasjon mellom PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks i placebogruppen. Men vi kan ikke legge mye vekt på dette resultatet på grunn av få datapunkter (kun fire) etter Western blot analysene for PGC-1 $\alpha$  i placebogruppen. Det ble ikke forventet noen sterk korrelasjon mellom endring i PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks ved trening. Dette på grunn av at VO<sub>2</sub>maks i andre studier er vist å være knyttet nærmere til endringer i minuttvolum enn til endring i musklens mitokondriefunksjon (Bassett & Howley 2000). Det var derfor ikke overraskende at det ikke ble funnet noen korrelasjon mellom PGC-1 $\alpha$  og VO<sub>2</sub>maks i noen av de andre gruppene.



### 4.3 Effekten av trening og inntak av antioksidanter på heat shock proteiner

Etter 12 uker med trening og tilskudd av antioksidanter var det en reduksjon i mengden heat shock protein 60 (HSP60) i cytosolfraksjonen i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Utover dette var det ingen endring i den totale endringen i heat shock proteinene uavhengig av de fire gruppene. Resultater fra studier gjort på gnagere har vist en økning av heat shock proteiner etter perioder med utholdenhetstrening (González et al. 2000; Mattson et al. 2000). Khassaf *et al.* (2001) viste en forskjell mellom trente og utrente individer. Utholdenhetstrente individer viste imidlertid ingen akutt stressrespons ved én treningsøkt. De viste derimot å ha et forbedret beskyttelsessystem ved oppregulering av heat shock proteiner og antioksidantproteiner i skjelettmuskulaturen i sammenlikning med utrente individer. Ulik respons for trente og utrente individer kan være en av grunnene til ulike resultater for reguleringen av heat shock proteiner ved utholdenhetstrening. Trente individer har vist å ha et signifikant høyere nivå av "hvilende" HSP60 enn utrente individer (Morton et al. 2008). Vår studie ble gjennomført med relativt godt trente forsøkspersoner. Det var derfor ikke forventet å se noen store endringer gjennom treningsperioden.

Ved inntak av antioksidanter er det blitt vist en hemmende effekt på nivåene av både HSP60 og HSP70. For eksempel, Fischer *et al.* (2006) viste at en måned med tilskudd av 500 mg C-vitamin og 267 mg E-vitamin hemmet en økning av HSP70 mRNA i skjelettmuskulatur ved kneekstensjoner (50 % av 1 RM). Noen år tidligere ble en åtte ukers treningsstudie gjennomført på utrente menn. Tilskudd av C-vitamin (500 mg) parallelt med sykkeltraining resulterte i inaktivering av transkripsjonsfaktorer ansvarlig for uttrykket av viktige proteiner med beskyttende effekt, inkludert heat shock proteiner (Khassaf et al. 2003). Den hemmende effekten av antioksidanttilskudd på heat shock proteinene er vist i studier med lavere inntak av antioksidanter enn det totale inntaket av antioksidanter i vår studie.

#### 4.3.1 Heat shock protein 60

HSP60 ble redusert i cytosolfraksjonen i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Utover dette var det ingen signifikante endringer for dette heat shock proteinet. Mattson et al. (2000) gjennomførte en studie der de fant at utholdenhetstrening førte til en økning i det oksidative potensialet og uttrykket av stressproteiner i muskulaturen hos rotter. De foreslo derfor at responsen til utholdenhetstrening på mitokondriesiden krever en samtidig økning i uttrykket av HSP60 for å kunne støtte transport og folding av mitokondrieproteiner. Denne økningen

var imidlertid ikke tydelig i de fire gruppene i vår studie. En studie gjennomført noen år senere ble det imidlertid konstatert et uendret nivå av HSP60 i mitokondriene (Gupta & Knowlton 2002). Flere studier har også kunnet fastslå uendrede nivåer av HSP60. Khassaf *et al.* gjennomførte studier i både 2001 og 2003 som indikerer en tendens til økning i innholdet av HSP60 i *m. vastus lateralis* etter en treningsperiode. Derimot fant de ingen signifikant økning av HSP60 etter inntak av 500 mg C-vitamin i åtte uker (Khassaf *et al.* 2001; Khassaf *et al.* 2003). En tilsvarende studie med tilskudd av E-vitamin viste at HSP60 fikk en tendens til økning etter to dager med trening, men derimot ingen endring etter inntak av E-vitamin. Tilskudd av E-vitamin viste å redusere uttrykket av HSP60 etter trening (Jackson *et al.* 2004). HSP60 viste i vår studie en tendens til reduksjon i gruppen som inntok C- og E-vitamin sammenliknet med endringene i placebogruppen i cytosolfraksjonen. En effektstørrelse på 1,27 indikerer en stor forskjell mellom endringene i gruppen som inntok C- og E-vitamin og endringene i placebogruppen. I kjernen var det en tendens til oppregulering hos gruppene som inntok antioksidanter sammenliknet med endringene i placebogruppen. Prøvene som ble kraftigst redusert i cytosol var de samme prøvene som økte mest i kjernen. Dette kan tyde på at det har vært en viss translokering av HSP60 inn i kjernen under trening. Reduksjonen av HSP60 som vi observerte i gruppen som inntok C- og E-vitamin, kan sammen med resultater fra tidligere studier tyde på at tilskudd av C- og E-vitamin har en negativ effekt på uttrykk av HSP60 (Jackson *et al.* 2004; Khassaf *et al.* 2003). Utover våre analyser i cytosol og kjerne er det blitt gjennomført analyser på HSP60 lokalisert i membran i vår studie. De foreløpige resultatene kan vise til en liten endring etter treningsperioden. HSP60 var uendret i alle gruppene, utenom gruppen som inntok astaxanthin som kunne vise til en økning etter treningsperioden.

#### 4.3.2 Heat shock protein 70

Det ble ikke påvist noen endringer i HSP70 i denne studien, verken i de enkelte tilskuddgruppene eller i den totale endringen av HSP70 uavhengig av tilskuddgruppe. En studie gjennomført på roere viste at uttrykket av HSP70 økte i *m. vastus lateralis* som respons på økningen av treningsmengden. Det ble foreslått at responsen av HSP70 var relatert til den totale treningsmengden (Liu *et al.* 1999). Året etter ble det igjen vist at HSP70 øker ved trening og at økning av HSP70 var påvirket av treningsintensiteten (Liu *et al.* 2000). Trening med høy intensitet førte til oppregulering av HSP70, utholdhetstrening med lav intensitet påvirket derimot ikke HSP70 (Liu *et al.* 2004). HSP70 beskytter tverrstripet muskulatur mot

en rekke påkjenninger. Beskyttelsen kan være avhengig av treningsopplegg og treningsintensitet for å kunne fungere optimalt (Milne & Noble 2002). Både økende lengde på treningsøkter, økt belastning under løpetrening (González et al. 2000) og økende intensitet under én enkelt økt (Milne & Noble 2002) kan stimulere til en økning av HSP70 i skjelettmuskulaturen. Akutt, moderat løpetrening har også kunnet vise til økning av HSP70 i *m. vastus lateralis* (Morton et al. 2006). Nøyaktig mengde trening som er nødvendig for konsekvent opprettholdelse av forhøyede nivåer av heat shock proteiner i muskulaturen ved trening er per dags dato ikke kjent (Morton et al. 2009b). Intervaller med høy intensitet og lengre utholdenhetsøkter var obligatoriske økter hver uke i den 12 uker lange treningsperioden i vår studie. Verken mengde eller intensitet økte uttrykket av HSP70.

Forandringer i det relative innholdet av HSP70 i *m. vastus lateralis* i en kontrollgruppe økte uttrykket av proteinet etter trening på sykkel. Etter tilskudd av C-vitamin (500 mg) ble uttrykket av HSP70 i skjelettmuskulatur redusert (Khassaf et al. 2001; Khassaf et al. 2003). Det har blitt spekulert i at økt produksjon av oksidanter under trening stimulerer transkripsjonen av heat shock proteiner i skjelettmuskulaturen. Tilskudd av C-vitamin kan direkte ha redusert stresset av oksidanter dannet i muskulaturen under trening og dermed redusert oksidativ celledskade på proteiner. Dette kan ha ført til mindre stimulering av HSP70 produksjon (Khassaf et al. 2001; Khassaf et al. 2003; McArdle et al. 2001). Det uendrede uttrykket av HSP70 etter treningsperioden i vår studie samsvarer med resultatene fra Kelly et al. (1996). Det var ingen effekt ved inntak av E-vitamin på uttrykket av HSP70 påført ved trening. Flere studier har vist at økningen av HSP70 i human skjelettmuskulatur påført ved trening ble hemmet eller svekket ved inntak av høye doser E-vitamin (Fischer et al. 2006; Jackson et al. 2004). Åtte uker med inntak av 400 mg E-vitamin ga ingen signifikant økning av HSP70. Inntaket av E-vitamin var en større dose enn benyttet i vår studie, og viser til en tilsynelatende hemmende effekt på uttrykket av HSP70. Regulering av genuttrykk synes å spille en rolle i adaptive responser på trening, og E-vitamin kan påvirke disse prosessene. Studier gjennomført på utrente individer kan vise til en oppregulering av HSP70 etter treningsperioden (Khassaf et al. 2003). Vår studie ble gjennomført på trente individer, dette kan være en grunn for det uendrede uttrykket av HSP70 etter treningsperioden. Det er i tillegg til våre proteinmålinger blitt gjennomført målinger av mRNA tidligere i vår studie. mRNA målingene kunne i likhet med funn fra våre målinger vise til uendret uttrykk av HSP70 etter treningsperioden.

#### 4.4 Antioksidanters påvirkning på trening

Så tidlig som i 1971 ble det vist at tilskudd av E-vitamin forårsaket ugunstige effekter i forhold til utholdenhetsprestasjoner (Sharman et al. 1971). Tilskudd av antioksidanter hindret gunstige tilpasninger i cellene under trening og reduserte treningseffekten (Fischer et al. 2006; Gomez-Cabrera et al. 2008a; Khassaf et al. 2003). Marshall *et al.* (2002) gjennomførte en studie på veddeløpshunder av hunderasen mynde. Ved inntak av C-vitamin (1000 mg) i fire uker rett før eller etter konkurranse ble det vist at C-vitamin ikke hadde noen effekt på oksidativt stress og antioksidantkapasiteten. Hundene løp derimot saktere ved inntak av C-vitamin. Resultatene fra vår studier tyder på en nedregulering av de undersøkte proteinene i gruppen som inntok C- og E-vitamin. Vi er avhengig av flere analyser for å kunne konkludere om C- og E-vitamin har en hemmende effekt på mitokondriebiogenesen under utholdenhetstrening.

Gruppen som inntok Smartfish viste til en signifikant forskjell mellom prøvene tatt før og etter treningsperioden i kjernen i proteinet PGC-1 $\alpha$ . Utover dette var uttrykket av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70 uendret ved inntak av Smartfish. Det er usikkert hva som påvirker treningseffekten ved inntak av Smartfish på grunn av fruktdrikkens komplekse sammensetning av omega3, D-vitamin, beta alanin, myse protein og naturlige antioksidanter fra granateple. Smartfish inneholder ingen store doser av antioksidanter slik som de to andre tilskuddene av antioksidanter gjør. Det er derfor vanskelig å vite hva en eventuell effekt kan skyldes.

Det var ingen signifikante endringer i de analyserte proteinene i gruppen som inntok astaxanthin i vår studie. Astaxanthin har vist å forsterke immunforsvaret, nedregulerte DNA oksidative skader og inflammasjon i unge friske kvinner (Park et al. 2010). Det er flere studier som samsvarer bedre med resultatene fra vår studie. Wolf (2010) viste at astaxanthin ikke har noen beskyttende effekt ved akutt oksidativt stress og stor produksjon av ROS. Etter tilskudd av astaxanthin (12 mg) i 12 uker ble det ikke funnet noen effekt som hindrer muskelskade etter intensiv trening (Bloomer et al. 2005). Tilskuddet er betraktelig høyere enn i vår studie med tilskudd av kun 4 mg per dag. Det uendrede uttrykket ved inntak av astaxanthin viser ikke til noen beskyttende effekt.

#### **4.5 Reproduserbarhet og videre analyser av PGC-1 $\alpha$ , HSP60 og HSP70**

Reproduserbarheten sier noe om den tekniske utførelsen ved hvert trinn i analyseprosessen. Western blot analyser består av mange trinn som krever presisjon og nøyaktighet for å oppnå reproduserbare resultater. For prøvene som ble analysert mer enn en gang i denne studien var det en god reproduserbarhet for HSP60 og HSP70 i både cytosol- og kjernefraksjonene. Standardavviket avviker en del i kjernefraksjonene på grunn av prøver fra to forsøkspersoner som avviker mye ved sammenlikning av analyse 1 og 2. Disse to forsøkspersonene avviker også i cytosolfraksjonene ved sammenlikning av analyse 1 og 2, men dette avviket er ikke like stort som i kjernen. Standardavviket er derfor mye bedre for prøvene i cytosolfraksjonene. Det ideelle hadde vært og analysert alle prøvene to ganger. Dette ble ikke prioritert på grunn av tidsbegrensningen i denne studien.

I analysene av PGC-1 $\alpha$  var det færre datapunkter enn i de andre analysene på grunn av mangel på 92 kDa bånd for enkelte forsøkspersoner. Prøver med fravær av bånd ble alltid analysert minst to ganger. Det var spesielt mange forsøkspersoner i placebogruppen uten 92 kDa bånd, og det er derfor kun fire forsøkspersoner med i PGC-1 $\alpha$  analysene for denne gruppen. Det er blitt tatt høyde for dette ved tolkningen av resultatene.

## 5.0 Konklusjon

Utholdenhetstrening i 12 uker førte til økt  $VO_2$  maks i alle fire grupper, men det var ingen forskjell i respons mellom gruppene. Økningen i gruppen som inntok astaxanthin var ikke signifikant.

For gruppene sett samlet var det en økning av transkripsjonsfaktoren PGC-1 $\alpha$  i kjernen. Dette kan tyde på en forflytting av PGC-1 $\alpha$  fra cytosol til kjernen som følge av utholdenhetstrening. På grunn av få datapunkter i placebogruppen er det behov for videre analyser på flere forsøkspersoner for å kunne si noe om gruppeforskjellene og effekten av antioksidanttilskuddene.

C- og E-vitamin hadde en negativ effekt på uttrykket av HSP60 i cytosol. Dette kan tyde på at supplement med store doser C- og E-vitamin har en negativ effekt på nivåene av HSP60 i skjelettmuskel.

Uttrykket av HSP70 var uendret. Tilskudd av antioksidanter kan ha hemmet uttrykket av HSP70 slik at vi ikke fant noen forandring i uttrykket av HSP70 i mitokondriene, ved sammenlikning av prøvene tatt før treningsperioden og prøvene tatt etter treningsperioden. Det er derimot vanskeligere å forklare det uendrede uttrykket av HSP70 i placebogruppen.

Det kan tyde på at antioksidanter påvirker mitokondriebiogenesen, men vi er avhengig av videre studier med flere forsøkspersoner for å kunne bekrefte flere av tendensene. Det kan være relevant med videre studier for å undersøke flere proteiner. Dette for å kunne konkludere med antioksidantenes påvirkning på mitokondriebiogenesen ved utholdenhetstrening.

## 6.0 Referanser

- Adhihetty, P. J., Ugucconi, G., Leick, L., Hidalgo, J., Pilegaard, H. & Hood, D. A. (2009). The role of PGC-1 $\alpha$  on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297 (1): C217-C225.
- 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.
- Akimoto, T., Li, P. & Yan, Z. (2008). Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1 $\alpha$  promoter in response to exercise by in vivo imaging. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 295 (1): C288-C292.
- Alard, J.-E., Dueymes, M., Mageed, R. A., Saraux, A., Youinou, P. & Jamin, C. (2009). Mitochondrial heat shock protein (HSP) 70 synergizes with HSP60 in transducing endothelial cell apoptosis induced by anti-HSP60 autoantibody. *The FASEB Journal*, 23 (8): 2772-2779.
- Bassett, D. R. J. & Howley, E. T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32: 70-84.
- Berg, K. (2003). Endurance Training and Performance in Runners: Research Limitations and Unanswered Questions. *Sports Medicine*, 33 (1): 59-73.
- Bloomer, R. J., Fry, A., Schilling, B., Chiu, L., Hori, N. & Weiss, L. (2005). Astaxanthin Supplementation Does Not Attenuate Muscle Injury Following Eccentric Exercise in Resistance-Trained Men. *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*, 15 (4): 401.
- Brière, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P. & Rustin, P. (2006). Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291 (6): C1114-C1120.
- Calvo, J. A., Daniels, T. G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B. M., Stevenson, S. C. & Rangwala, S. M. (2008). Muscle-specific expression of PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *Journal of Applied Physiology*, 104 (5): 1304-1312.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59 (3): 527-605.
- Dawson, B., Henry, G. J., Goodman, C., Gillam, I., Beilby, J. R., Ching, S., Fabian, V., Dasig, D., Morling, P. & Kakulus, B. A. (2002). Effect of Vitamin C and E Supplementation on Biochemical and Ultrastructural Indices of Muscle Damage after a 21 km Run. *Int J Sports Med*, 23 (01): 10,15.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95.
- Filaire, E., Massart, A., Rouveix, M., Portier, H., Rosado, F. & Durand, D. (2011). Effects of 6 weeks of n-3 fatty acids and antioxidant mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *European Journal of Applied Physiology*, 111 (8): 1829-1839.
- 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.
- Geng, T., Li, P., Okutsu, M., Yin, X., Kwek, J., Zhang, M. & Yan, Z. (2010). PGC-1 $\alpha$  plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not

- fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298 (3): C572-C579.
- 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.
- Gómez-Cabrera, M.-C., Pallardó, F. V., Sastre, J., Viña, J. & García-del-Moral, L. (2003). Allopurinol and Markers of Muscle Damage Among Participants in the Tour de France. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 289 (19): 2503-2504.
- González, B., Hernando, R. & Manso, R. (2000). Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440 (1): 42-49.
- Gundersen, K. & Bruusgaard, J. C. (2008). Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *The Journal of Physiology*, 586 (11): 2675-2681.
- Gupta, S. & Knowlton, A. A. (2002). Cytosolic Heat Shock Protein 60, Hypoxia, and Apoptosis. *Circulation*, 106 (21): 2727-2733.
- Gurd, B. J., Perry, C. G. R., Heigenhauser, G. J. F., Spriet, L. L. & Bonen, A. (2010). High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 35 (3): 350-357.
- Helgerud, J., Høydal, K., Wang, E., Karlsen, T., Berg, P. R., Bjerkaas, M., Simonsen, T., Helgesen, C. S., Hjørth, N. L., Bach, R., et al. (2007). Aerobic High-Intensity Intervals Improve V[spacing dot above]O<sub>2</sub>max More Than Moderate Training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39 (4): 665-671 10.1249/mss.0b013e3180304570.
- Hickson, R. C., Hagberg, J. M., Ehsani, A. A. & Holloszy, J. O. (1981). Time course of the adaptive responses of aerobic power and gear rate to training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 13: 17-20.
- Hood, D. A., Adhihetty, P. J., Colavecchia, M., Gordon, J. W., Irrcher, I., Joseph, A.-M., Lowe, S. T. & Rungi, A. A. (2003). Mitochondrial Biogenesis and the Role of the Protein Import Pathway. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35 (1): 86-94.
- Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubicic, V. & Joseph, A.-M. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology*, 209 (12): 2265-2275.
- Hood, D. A. (2009). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34 (3): 465-472.
- Hoppeler, H. & Weibel, E. R. (2000). Structural and functional limits for oxygen supply to muscle. *Scandinavian Physiological Society*, 168: 445-456.
- Irrcher, I., Ljubicic, V. & Hood, D. A. (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296 (1): C116-C123.
- Jackson, M. J., Khassaf, M., Vasilaki, A., McArdle, F. & McArdle, A. (2004). Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Annals New York Academy of Sciences*: 158-168.
- Kanter, M. (1998). Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57 (01): 9-13.
- 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.



- Kavazis, A. N., Talbert, E. E., Smuder, A. J., Hudson, M. B., Nelson, W. B. & Powers, S. K. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radical Biology and Medicine*, 46 (6): 842-850.
- Kelly, D. A., Tiidus, P. M., Houston, M. E. & Noble, E. G. (1996). Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70. *Journal of Applied Physiology*, 81 (6): 2379-2385.
- 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.
- Liang, H. & Ward, W. F. (2006). PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, 30 (4): 145-151.
- 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., Mayr, S., Opitz-Gress, A., Zeller, C., Lormes, W., Baur, S., Lehmann, M. & Steinacker, J. M. (1999). Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *Journal of Applied Physiology*, 86 (1): 101-104.
- 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.
- Liu, Y., Lormes, W., Wang, L., Reissnecker, S. & Steinacker, J. (2004). Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *European Journal of Applied Physiology*, 91 (2): 330-335.
- MacIntosh, B. R., Gardiner, P. F. & McComas, A. J. (red.). (2006). *Skeletal Muscle, Form and Function*. 2 utg.: Human Kinetics.
- Mattson, J. P., Ross, C. R., Kilgore, J. L. & Musch, T. I. (2000). Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32 (2): 365-369.
- 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.
- Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J. & Guallar, E. (2005). Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142 (1): 37-46.
- Milne, K. J. & Noble, E. G. (2002). Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *Journal of Applied Physiology*, 93 (2): 561-568.
- Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science (New York, N.Y.)*, 259 (5100): 1409-1410.
- 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., MacClaren, D. P. M., Cable, N. T., Campbell, I. T., Evans, L., Kayani, A. C., McArdle, A. & Drust, B. (2008). Trained Men Display Increased Basal Heat Shock

- Protein Content of Skeletal Muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 40 (7): 1255-1262 10.1249/MSS.0b013e31816a7171.
- 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., Kayani, A. C., McArdle, A. & Drust, B. (2009b). The Exercise-Induced Stress Response of Skeletal Muscle, with Specific Emphasis on Humans. *Sports Medicine*, 39 (8): 643-662 10.2165/00007256-200939080-00003.
- Olesen, J., Kiilerich, K. & Pilegaard, H. (2010). PGC-1 $\alpha$ -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 460 (1): 153-162.
- Park, J., Chyun, J., Kim, Y., Line, L. & Chew, B. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & Metabolism*, 7 (1): 18.
- Pashkow, F. J., Watumull, D. G. & Campbell, C. L. (2008). Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *The American journal of cardiology*, 101 (10): S58-S68.
- Peternelj, T. T. & Coombes, J. S. (2011). Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental? *Sports Medicine*.
- Pilegaard, H., Saltin, B. & Neufer, P. D. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 546 (3): 851-858.
- 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.
- Powers, S. K., Talbert, E. E. & Adhietty, P. J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 589 (9): 2129-2138.
- Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocrine Reviews*, 24 (1): 78-90.
- 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.
- Roberts, L. A., Beattie, K., Close, G. L. & Morton, J. P. (2011). Vitamin C Consumption Does Not Impair Training-Induced Improvements in Exercise Performance. *International Journal of Sports Physiology & Performance*, 6 (1): 58-69.
- Rosa, E. F., Ribeiro, R. F., Pereira, F. M. T., Freymüller, E., Aboulafia, J. & Nouailhetas, V. L. A. (2009). Vitamin C and E supplementation prevents mitochondrial damage of ileum myocytes caused by intense and exhaustive exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 107 (5): 1532-1538.
- Sacheck, J. M. & Blumberg, J. B. (2001). Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition*, 17 (10): 809-814.
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E. & Bjålie, J. G. (red.). (2006). *Menneskekroppen, Fysiologi og anatomi*. 2 utg. Oslo: Gyldendal Akademiske.
- 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): 265-276.

- Tiidus, P. M., Pushkarenko, J. & Houston, M. E. (1996). Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271 (4): R832-R836.
- Tonkonogi, M., Walsh, B., Svensson, M. & Sahlin, K. (2000). Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *The Journal of Physiology*, 528 (2): 379-388.
- Uguccioni, G., D'souza, D. & Hood, D. A. (2010). Regulation of PPAR $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  Function and Expression in Muscle: Effect of Exercise. *School of Kinesiology and Health Science*.
- Um, J. H., Kang, C. D., Hwang, B. W., Ha, M. Y., Hur, J. G., Kim, D. W., Chung, B. S. & Kim, S. H. (2003). Involvement of DNA-dependent protein kinase in regulation of the mitochondrial heat shock proteins. *Leukemia Research*, 27 (6): 509-516.
- 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.
- Viña, J., Gomez-Cabrera, M.-C. & Borras, C. (2007). Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? *British Journal of Nutrition*, 98 (SupplementS1): S36-S40.
- Wagner, P. D. (1996). Determinants of Maximal Oxygen Transport and Utilization. *Annual Review of Physiology*, 58: 21-50.
- Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (red.). (2006). *Vander's Human Physiology: The mechanisms of body function*. 10 utg.: The McGraw-Hill Companies.
- Wolf, A. M., Asoh, S., Hiranuma, H., Ohsawa, I., Iio, K., Satou, A., Ishikura, M. & Ohta, S. (2010). Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21 (5): 381-389.
- 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 $\alpha$  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., Åkerström, 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 & Science in Sports & Exercise*, 42 (7): 1388-1395.
- Yfanti, C., Nielsen, A. R., Åkerström, T., Nielsen, S., Rose, A. J., Richter, E. A., Lykkesfeldt, J., Fischer, C. P. & Pedersen, B. K. (2011). Effect of antioxidant supplementation on insulin sensitivity in response to endurance exercise training. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 300 (5): E761-E770.