

Een tekort aan zuurstof: effect op spiermassa?

AUTEURS D'HULST G., DELDICQUE L.

INSTITUUT *Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Bewegings- en Revalidatiewetenschappen (FaBeR)*

ABSTRACT

Sinds eind jaren 60, naar aanleiding van de spelen van Mexico City (2400 m boven zeespiegel) is er veel onderzoek uitgevoerd naar de effecten van hoogte op de sportprestaties van atleten. Een stijging van natuurlijk aangemaakt erythropoëetine (EPO), rode bloedcel massa en zuurstof transport capaciteit zijn slechts een deel van de vele aanpassingen die mensen ondervinden bij langdurig (>3weken) verblijf op hoogte. Naast deze hematologische aanpassingen heeft hoogte ook een effect op spiermassa. Bergbeklimmers op expeditie kunnen tot 15% aan spiermassa verliezen. Komt dit enkel door het tekort aan zuurstof, of wordt het mede in de hand gewerkt door een verminderde eetlust, slaap, fysieke activiteit, enz.? De literatuur biedt hier verassend genoeg nog geen eenduidig antwoord op. Daarom is er recent een studie georganiseerd in de hoogtekamer van de Faber, KU Leuven om een stukje bij te dragen aan de puzzel die deze complexe materie is.

Sleutelwoorden zuurstofnood, spiermassa, hematocriet

Datum 01-01-2013

Contactadres gommaar.dhulst@faber.kuleuven.be, louise.deldicque@faber.kuleuven.be

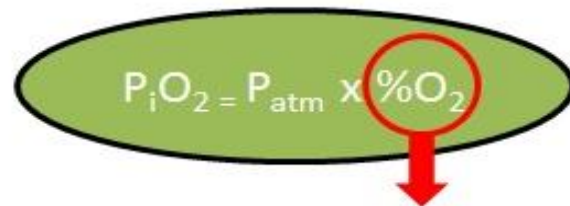
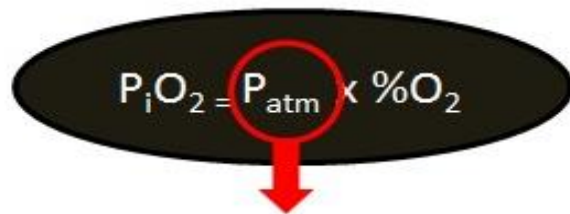
Disclaimer: Het hierna bijgevoegde product mag enkel voor persoonlijk gebruik worden afgehaald. Indien men wenst te dupliceren of te gebruiken in eigen werk, moet de bovenvermelde contactpersoon steeds verwittigd worden. Verder is een correcte bronvermelding altijd verplicht!!!

EEN TEKORT AAN ZUURSTOF: EFFECT OP SPIERMASSA?

Wat is hypoxie?

Zuurstof is cruciaal voor elk zoogdier om te overleven. Bij een tekort aan zuurstof, ook wel 'hypoxie' genoemd, worden er tal van reacties in het lichaam geactiveerd om zuurstof te sparen. Hypoxie kan optreden door pathologieën zoals bloedarmoede, chronisch hartfalen of COPD (6; 7), maar kan ook voorkomen bij natuurlijke fenomenen zoals blootstelling aan hoogte en trainen in een hoogtekamer (zie figuur 1). Bij het beklimmen van een berg, en dus het toenemen van de hoogte, zal de zuurstofspanning van de ingeademde lucht (P_{iO_2}) dalen als gevolg van een daling van de atmosferische druk (P_{atm}). Men spreekt

hier van hypobare hypoxie. In een hoogtekamer of -tent blijft echter de P_{atm} gelijk maar wordt zuurstof uit de lucht gefilterd, waardoor het percentage zuurstof daalt ($\%O_2$). Dit noemt men normobare hypoxie. Onafhankelijk van de manier waarop het zuurstoftekort wordt gecreëerd, zal het *arteriële bloed*, zijnde het bloed dat net van zuurstof bediend is in de longen, minder zuurstof bevatten. Dit wil dus zeggen dat de hemoglobinemoleculen niet volledig verzadigd zijn met zuurstof. Hierdoor zal het organisme minder zuurstof kunnen vervoeren naar de werkende weefsels, inclusief de skeletspier.



Figuur 1: Twee vormen van hypoxie. P_{iO_2} ; partiële zuurstofspanning van de ingeademde lucht, P_{atm} ; atmosferische luchtdruk, $\%O_2$; percentage zuurstof aanwezig in de lucht

Wat doet een tekort aan zuurstof met het lichaam?

Een langdurig tekort aan zuurstof brengt zeer ingrijpende veranderingen teweeg in het menselijk lichaam. De meeste van deze veranderingen worden veroorzaakt door de stabilisatie van Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α), dé signaalmolecule dat een resem van reacties veroorzaakt onder de invloed van een tekort aan zuurstof (16). Zo wordt vooral door HIF-1 α de natuurlijke productie van erythropoëtine (EPO) geactiveerd met de daaraan gelinkte aanmaak van rode bloedcellen in het beenmerg (11).

Naast de gekende hematologische, respiratoire en cardiovasculaire veranderingen heeft systemische hypoxie nog een interessant effect op het menselijk lichaam: de vermindering van spiermassa. Je moet weten dat het opnieuw aanmaken van proteïnen, de bouwstenen van de skeletspier, het tweede meest ATP-consumerende proces is in de cel. Het klinkt dus logisch dat dit proces één van de eerste zaken zal zijn dat wordt stopgezet bij een acuut zuurstoftekort. Zo hebben patiënten die langdurig blootgesteld zijn aan hypoxie door bijvoorbeeld een longpathologie (COPD), niet alleen een hogere mortaliteitsratio dan gezonde personen, maar ook een verminderde spiermassa. Dit laatste bleek trouwens een onafhankelijke voorspeller te zijn van overlevingskans (15). Verschillende studies hebben verder aangetoond dat bergbeklimmers en mensen die

langdurig op hoogte verblijven een vermindering in spiervezeldoorsnede vertonen, ook wel 'spieratrofie' genoemd (8; 13; 14). Toch is de literatuur hier niet zo eenduidig over. Lundby et al. hebben contrasterende resultaten gepubliceerd. Zij rapporteerden geen verschil in spiervezeloppervlakte van de m. Vastus lateralis na een verblijf van 8 weken op hoogte (4100m) (12). Dat er geen overeenstemming is in de literatuur ligt aan het feit dat deze soort studies zeer moeilijk te standaardiseren zijn naar fysieke activiteit, eetgewoonten, type hypoxie, enz.

Er wordt in het algemeen aangenomen dat een tekort aan zuurstof *op zich* leidt tot een vermindering in spiervezeldoorsnede. Hierdoor is het onderzoek zich de laatste jaren beginnen te focussen op de redenen waarom systemische zuurstofnood leidt tot spieratrofie.

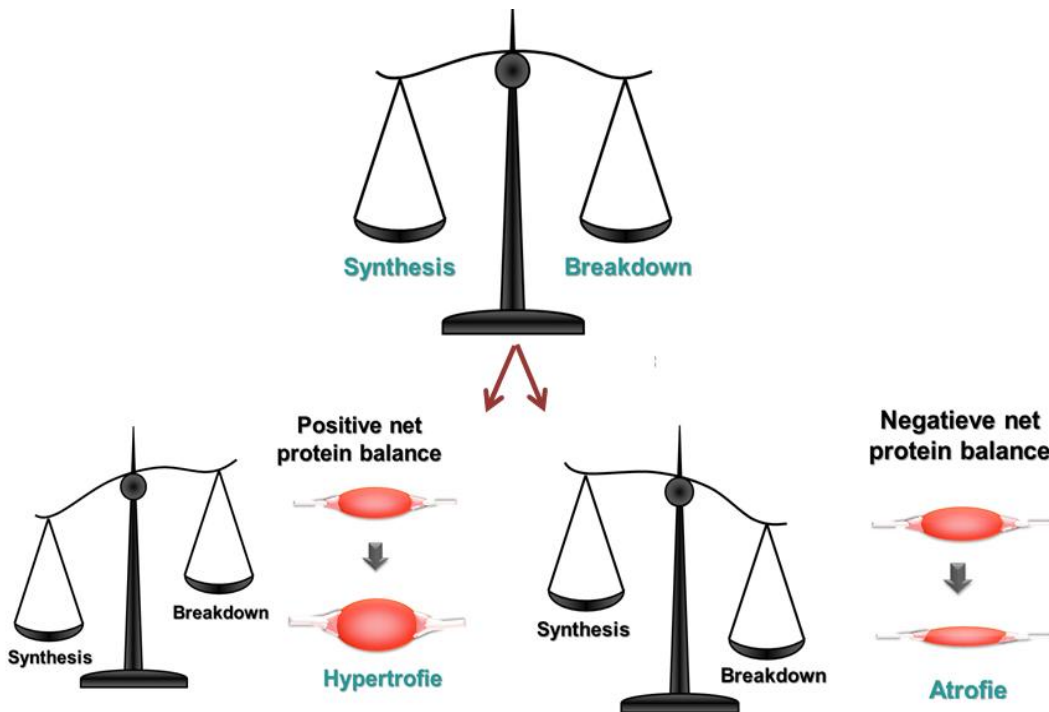
Proteïne balans

Alvorens hier dieper op ingegaan kan worden, moet eerst het concept van *netto proteïne balans* naderbij bekeken worden (figuur 2). Een spier zal toenemen in doorsnede (hypertrofie) indien deze balans chronisch positief is. Dit wil zeggen dat de proteïne aanmaak (synthese) gedurende een lange tijd de proteïne afbraak overtreft. De netto proteïne balans kan ondermeer positief beïnvloed worden door een combinatie van voeding (vooral proteïne-inname) en krachttraining (3). Aan de andere

kant kan ze negatief beïnvloed worden door ziekte, fysieke inactiviteit en mogelijk hypoxie. De laatste jaren is er steeds meer onderzoek verricht naar de moleculaire mechanismen achter deze fluctuaties in proteïne synthese en afbraak.

Vanuit de lessen biologie herinneren we nog dat DNA in de celkern eerst wordt

zijn vooral de sarcoplasmatische, de myofibrillaire en mitochondriale proteïnen van belang. Respectievelijk staan zij in voor signaalfuncties in de cel, de opbouw van sarcomeren en de goede werking van mitochondriën. Zo heeft krachttraining vooral een effect op de synthese van de myofibrillaire proteïnen en uithoudingstraining op de



Figuur 2: De verschillende mogelijkheden om spiermassa te beïnvloeden. Krachttraining met adequate nutritie leidt doorgaans tot spierhypertrofie. Ziekte, fysieke inactiviteit of hypoxie kan tot atrofie leiden.

overgeschreven naar mRNA. Vervolgens worden, na het uitsplitsen van de introns, de biologisch actieve exons aan elkaar geregen. Dit mRNA vormt de sleutel voor de ribosomen om ketens van afzonderlijke proteïnen te vormen in het cytoplasma. Deze ketens van aminozuren worden dan op hun beurt gevouwen tot volwaardige proteïnen. In het belang van deze tekst

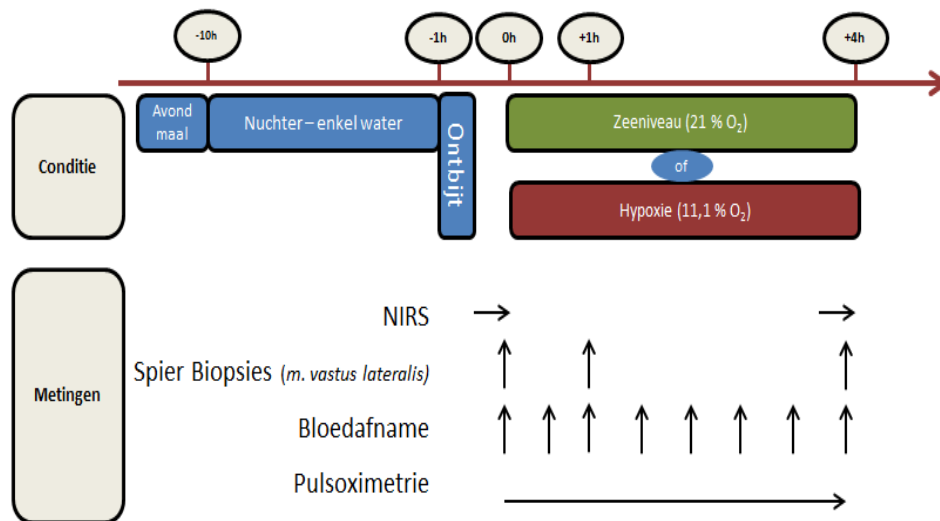
synthese van mitochondriale proteïnen (2; 4; 18). Klaarblijkelijk hebben externe stimuli (zoals insuline, aminozuren, hypoxie, enz.) een directe impact op de synthese, maar ook afbraak van proteïnen. In dit kader is het belangrijkste molecuul dat deze externe signalen reguleert 'mammalian target of rapamycin' of mTOR. Deze molecuul zorgt ervoor dat het mRNA

gemakkelijker kan worden overgeschreven tot proteïnen. Hoe mTOR geactiveerd wordt, is zeer complex en zal niet in detail worden uitgelegd in deze tekst (voor geïnteresseerden, lees (9)). Het belangrijkste is dat mTOR wordt *gefosforyleerd*, of in andere woorden geactiveerd, onder invloed van groeifactoren, zoals insuline en aminozuren. Hierdoor verkrijgt mTOR als het ware 'extra energie', waardoor dit complex geactiveerd wordt en een invloed kan hebben op de vertaling van mRNA tot nieuwe volwaardige proteïnen.

De effecten van een tekort aan zuurstof op spierniveau

Op dit moment is er slechts een zeer beperkt aantal studies voor handen die de moleculaire effecten van hypoxie in

menselijke vrijwilligers hebben bestudeerd. Etheridge *et al.* vonden een onderdrukte proteïne synthese na krachttraining in hypoxie (12% O₂), maar ze zagen niets ter hoogte van de mTOR signaal pathway (5). Aan de andere kant vonden Vigano *et al.* een kleine afname in mTOR na een 7-9 daags verblijf op een hoogte van >4500m (17). U ziet het, een gebrek aan standaardisatie maakt het zeer moeilijk om een duidelijke conclusie te trekken wát nu net het effect van hypoxie per se is op het proteïne metabolisme. Omwille van deze reden is er een aantal jaar geleden een 6-jarig doctoraat opgestart aan de KU Leuven, in de onderzoeksgroep inspanningsfysiologie, om de leegte in de literatuur die er heerst betreffende dit onderwerp op te vullen. Aanvankelijk zijn we begonnen met een *baseline* studie op menselijke proefpersonen. Er is gewerkt met een



Figuur 3: Experimenteel protocol. Subjecten kwamen 's morgens in nuchtere toestand binnen in het testcentrum. Vervolgens werd een ontbijt toegediend waarna het 4u-durende protocol startte, op zeeniveau of hoogte. Gedurende het gehele protocol werd geen fysieke activiteit verricht en zaten ze op een stoel. Op standaard tijdstippen werden er bloedstalen en spierbiopt genomen. Iedere 30 min werd bloedglucose gemonitord. In het begin en op het einde werd gedurende 20 min de spieroxygenatus gemeten door NIRS. NIRS; Near Infrared Spectroscopie.

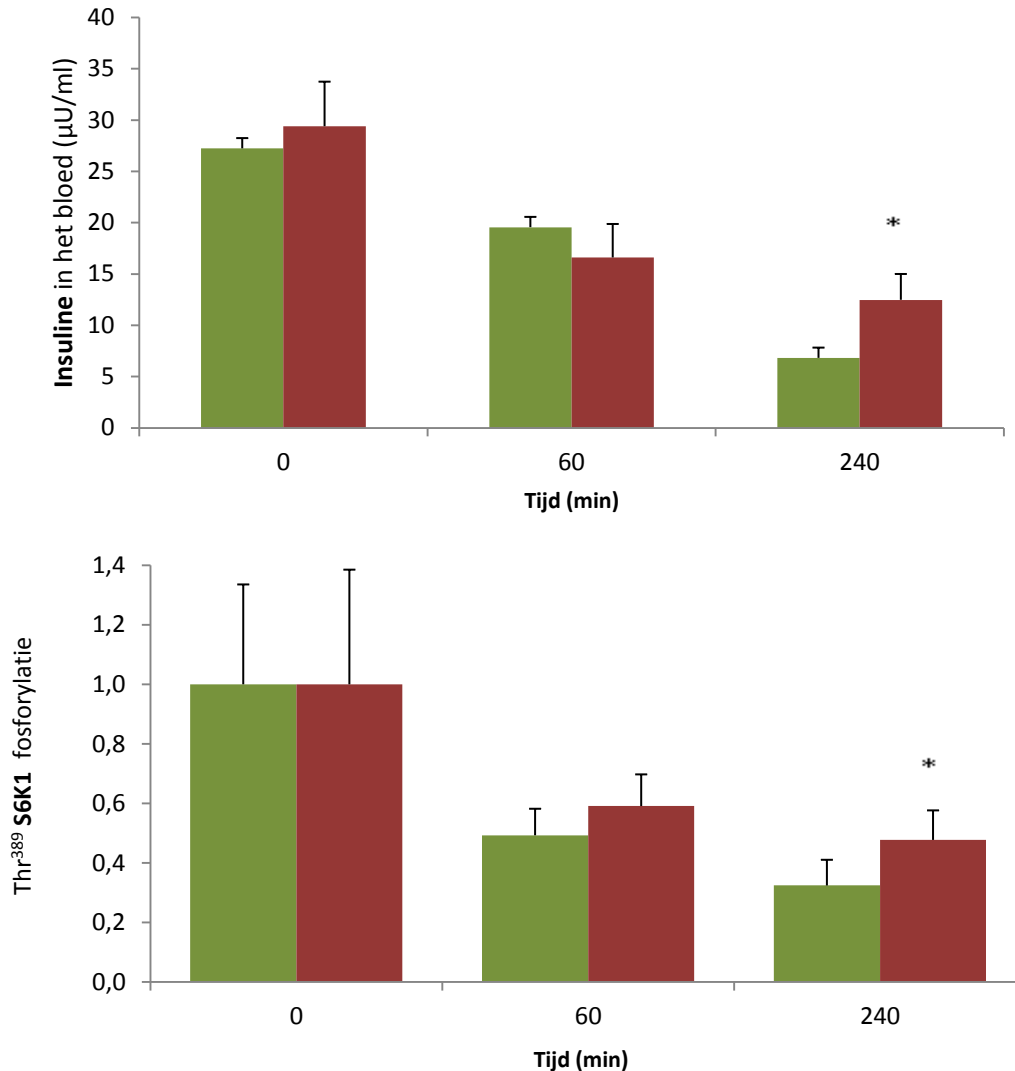
gerandomiseerd *cross-over design*, waarbij 15 vrijwilligers 2 identieke testsessies aflegden, één op zeeniveau ($\pm 21\% O_2$) en één op een gesimuleerde hoogte van 5000m ($\pm 11\% O_2$). Deze 2 testsessies werden gerandomiseerd, (zie figuur 3 voor meer uitleg bij het protocol). Buiten het verschil in de ingeademde lucht ($11\% O_2$ vs. $21\% O_2$) is er dus geen enkel verschil tussen de experimentele sessies die de proefpersonen ondergingen. Zoals in figuur 3 te zien, werden er in elke testsessie bij iedere vrijwilliger 3 spierbiopten genomen op gestandaardiseerde tijdstippen. Onder lokale verdoving werd een kleine incisie gemaakt in het laterale deel van de dijspier, de m. Vastus lateralis. Vervolgens werd met een Bergström naald een klein deel van de spier genomen ($\pm 200\text{mg}$). Dit stukje spier werd dan onmiddellijk bevroren in vloeibare stikstof. Verder hebben we de oxygenatie (het percentage aan hemoglobine dat verzadigd is met zuurstof) gemeten in het arteriële bloed en in de spier zelf via respectievelijk pulsoximetrie en *near infrared spectroscopie* of NIRS. Tenslotte maten we om de 30 min de bloedsuikerspiegel van de subjecten.

Resultaten: insuline resistentie of meer nood aan glucose?

De acute hypoxie had een zeer sterk effect op het percentage aan hemoglobine in het arterieel bloed dat verzadigd is met zuurstof (SpO_2). Dit percentage daalde met 25% in hypoxie, vergeleken met zeeniveau. Verrassend genoeg daalde de lokale zuurstofvoorziening, gemeten met NIRS (zie protocol), niet of nauwelijks. NIRS meet op zeer lokaal niveau (m. Vastus lateralis) hoeveel van het totale hemoglobine (arterieel, maar ook veneus) verzadigd is met zuurstof. Dus, ook al is de aanvoer van zuurstof sterk gehypothekeerd in hypoxie, de spier blijkt hier in rust opvallend goed mee om te kunnen en ondervindt geen grote problemen naar oxygenatie toe.

		Gemiddelde doorheen het experiment	
SpO_2 (%)	NOR	99.0 \pm 0.2	
	HYP	75.5 \pm 2.0*	
		T0	T240
NIRS (%)	NOR	69.7 \pm 1.5	68.4 \pm 1.2
	HYP	70.8 \pm 2.0	65.7 \pm 1.4*

Tabel 1: Overzicht van Oxygenatie status ter hoogte van het arteriële bloed en ter hoogte van de spier. SpO_2 ; arteriële zuurstof saturatie. NIRS; Near Infrared Spectroscopie, oxygenatiestatus van de spier, T0; tijdstip 0, T240; na 4u. NOR; normoxie of zeeniveau, HYP; hypoxie.



Figuur 4: Insuline concentratie in het bloed en fosforylatie (activatie) van het proteïne S6K1, en direct doel van mTOR doorheen het experimentele protocol op zeeniveau en hoogte. *Groene balken;* Zeeniveau, *Rode balken;* Hypoxie.* $p < 0.05$ NOR vs. HYP

Verder kwamen er enkele boeiende resultaten naar voor bij het analyseren van de spierbiopten en bloedstalen in het labo. Als gevolg van het ontbijt was de initiële insulineconcentratie in het bloed behoorlijk hoog ($\pm 30 \mu\text{U/ml}$) om de stijging van de suikerspiegel tegen te counteren. Gradueel daalde de insuline concentratie in het bloed in beide condities. Interessant genoeg bleek deze

daling onderdrukt te zijn in de hypoxische conditie, resulterend in een 2x hogere insulineconcentratie in hypoxie vergeleken met zeeniveau (figuur 4). Eerder in de tekst is al vermeld dat mTOR werd gestimuleerd door externe factoren zoals insuline. Zoals in figuur 4 te zien volgt de actieve, gefosforyleerde, vorm van S6K1 (een direct target van mTOR, dat de

translatie positief beïnvloedt) het patroon van insuline perfect.

Conclusies

Welke lessen kunnen hier nu uit getrokken worden naar de praktijk toe? Het feit dat insulineconcentraties hoger zijn in het bloed van mensen die zuurstof arme lucht inademen wordt door nog ander auteurs beschreven (1; 10). Heeft dit te maken met een vorm van insuline resistentie die optreedt op hoogte, of eerder met de noodzaak van het lichaam om méér glucose op te nemen om anaerobe processen te ondersteunen. Dit kunnen we niet opmaken uit deze studie of de literatuur. Wél is duidelijk dat de markers van proteïne synthese (zoals mTOR en S6K1) meer actief zijn na 4 u op hoogte, waarschijnlijk door de verhoogde insuline concentraties in het bloed. Hoewel wij proteïne synthese alleen maar op een indirecte manier gemeten hebben, gaat dit in tegen de hypothese dat proteïne synthese onderdrukt wordt door hypoxie. Alleszins, op korte termijn is dit toch het geval.

Trainers doen er dus best aan om op langdurige hoogtestages, naast de zuiver fysiologische parameters, ook geregeld hematologische en antropometrische parameters te onderzoeken. Hoe zit het met de nuchtere bloedsuikerspiegel en/of insuline concentratie in het bloed? Blijft de spieromtrek ter hoogte van de dij hetzelfde? Hoe zit het met de eetlust, enz.?

Na deze studie zijn we al wat meer te weten gekomen over de moleculaire mechanismen achter de effecten van acute hypoxie op spierweefsel. In volgende studies zullen we verder spierbiopten analyseren van mensen die langdurig op hoogte zijn verbleven. Ook zullen pathologieën die hypoxie veroorzaken zoals COPD meer in detail worden onderzocht, allemaal om de kennis te vergroten achter het zogenaamde hypoxie-geïnduceerde verlies aan spiermassa. Het uiteindelijke doel moet dan zijn om dit spierverslies fenomeen af te zwakken door nutritionele of farmacologische interventies voor een verbetering van *quality of life* en eventueel atletische prestaties.

Referentielijst

1. Braun B, Rock PB, Zamudio S, Wolfel GE, Mazzeo RS, Muza SR, Fulco CS, Moore LG and Butterfield GE. Women at altitude: short-term exposure to hypoxia and/or alpha(1)-adrenergic blockade reduces insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 91: 623-631, 2001.
2. Burd NA, Holwerda AM, Selby KC, West DW, Staples AW, Cain NE, Cashaback JG, Potvin JR, Baker SK and Phillips SM. Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol* 588: 3119-3130, 2010.
3. Burd NA, Tang JE, Moore DR and Phillips SM. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol* 106: 1692-1701, 2009.
4. Burd NA, West DW, Staples AW, Atherton PJ, Baker JM, Moore DR, Holwerda AM, Parise G, Rennie MJ, Baker SK and Phillips SM. Low-load high volume resistance exercise stimulates muscle protein synthesis more than high-load low volume resistance exercise in young men. *PLoS One* 5: e12033, 2010.
5. Etheridge T, Atherton PJ, Wilkinson D, Selby A, Rankin D, Webborn N, Smith K and Watt PW. Effects of hypoxia on muscle protein synthesis (MPS) and anabolic signaling at rest and in response to acute resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011.
6. Garvey JF, Taylor CT and McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur Respir J* 33: 1195-1205, 2009.
7. Grocott M, Montgomery H and Vercueil A. High-altitude physiology and pathophysiology: implications and relevance for intensive care medicine. *Crit Care* 11: 203, 2007.
8. Hoppeler H, Kleinert E, Schlegel C, Claassen H, Howald H, Kayar SR and Cerretelli P. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *Int J Sports Med* 11 Suppl 1: S3-S9, 1990.
9. Laplante M and Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293, 2012.
10. Larsen JJ, Hansen JM, Olsen NV, Galbo H and Dela F. The effect of altitude hypoxia on glucose homeostasis in men. *J Physiol* 504 (Pt 1): 241-249, 1997.
11. Lundby C, Calbet JA and Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cell Mol Life Sci* 66: 3615-3623, 2009.
12. Lundby C, Pilegaard H, Andersen JL, van HG, Sander M and Calbet JA. Acclimatization to 4100 m does not change capillary density or mRNA expression of potential angiogenesis regulatory factors in human skeletal muscle. *J Exp Biol* 207: 3865-3871, 2004.
13. MacDougall JD, Green HJ, Sutton JR, Coates G, Cymerman A, Young P

and Houston CS. Operation Everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude. *Acta Physiol Scand* 142: 421-427, 1991.

14. Mizuno M, Juel C, Bro-Rasmussen T, Mygind E, Schibye B, Rasmussen B and Saltin B. Limb skeletal muscle adaptation in athletes after training at altitude. *J Appl Physiol* 68: 496-502, 1990.

15. Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA and Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 82: 53-59, 2005.

16. Smith TG, Robbins PA and Ratcliffe PJ. The human side of hypoxia-

inducible factor. *Br J Haematol* 141: 325-334, 2008.

17. Vigano A, Ripamonti M, De PS, Capitanio D, Vasso M, Wait R, Lundby C, Cerretelli P and Gelfi C. Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia. *Proteomics* 8: 4668-4679, 2008.

18. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA and Rennie MJ. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol* 586: 3701-3717, 2008.