

BONDS VOEDINGSSUPPLEMENTEN

Dit boek zet de wetenschap achter voedingssupplementen uiteen in twaalf hoofdstukken, verdeeld over twee delen. De nadruk ligt hierbij op voedingssupplementen die de spierkracht of spiergroei verbeteren.

In het eerste deel wordt kennisgemaakt met informatie die ten grondslag ligt aan de werking van veel voedingssupplementen. Dit deel beslaat de hoofdstukken spierfysiologie, energiesystemen, absorptie, metabolisme en veiligheid, en moleculaire mechanismen van spiergroei. In het tweede deel wordt verder gebouwd op deze fundamentele kennis. Hierin wordt dieper ingegaan op acht verschillende voedingssupplementen: bèta-alanine, bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB), cafeïne, creatine, eiwitpreparaten, fosfatidezuur, trimethylglycine en vitamine D. Per voedingssupplement komen verscheidene aspecten aan bod, waaronder farmacokinetische eigenschappen, werkingsmechanismen, klinische resultaten en de veiligheid.

De informatie in dit boek wordt ondersteund door meer dan 500 verwijzingen naar de wetenschappelijke literatuur. Dat maakt dit boek ook uitstekend geschikt als naslagwerk.

DRS. PETER BOND
is wetenschappelijk auteur en
blogt onder meer over
voedingssupplementen op
zijn website peterbond.nl



<https://peterbond.nl>

ISBN 978-90-824123-1-4



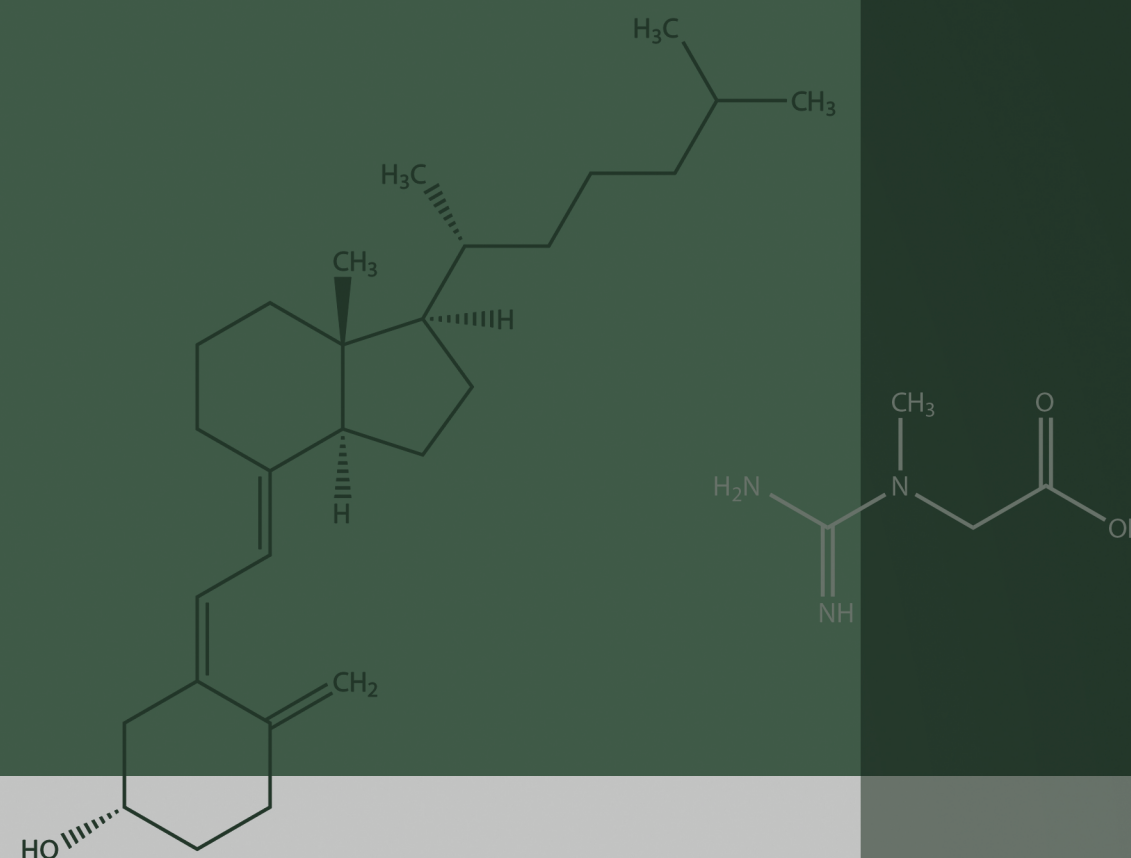
9 789082 412314

BONDS VOEDINGSSUPPLEMENTEN



BOND

BONDS VOEDINGS- SUPPLEMENTEN



DRS. PETER BOND

Peter Bond

Bonds voedingssupplementen

Bonds voedingssupplementen

Drs. Peter Bond



Copyright © 2017 Peter Bond
GEPUBLICEERD DOOR PETERBOND.NL

PETERBOND.NL

Behoudens de in of krachtens de Auteurswet gestelde uitzonderingen mag niets uit deze uitgave worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

No part of this book may be reproduced in any form, by print, photoprint, microfilm or any other means without written permission from the publisher.

Ontwerp omslag: Gemma Lahoz Casarramona
Tekeningen: Figuur 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 5.4, 6.3 en 10.2, en figuren kader 1.4 en 11.1: Gemma Lahoz Casarramona
Print: Pumbo.nl

ISBN 978-90-824123-1-4

<https://peterbond.nl>

Voorwoord

Met dit boek hoop ik te kunnen voorzien in de groeiende behoefte aan wetenschappelijk onderbouwde informatie over voedingssupplementen, in de Nederlandse taal. Hiervoor is het boek voorzien van meer dan vijfhonderd referenties naar de wetenschappelijke literatuur en heb ik zorg gedragen om de gepresenteerde informatie op de meest actuele stand van zaken te baseren. De focus van dit boek ligt op voedingssupplementen die de spierkracht vergroten of de spiergroei bevorderen. Ook zijn in het boek diverse kaders opgenomen die aanvullende informatie bieden over daarvoor besproken onderwerpen.

Vanzelfsprekend komen niet alle voedingssupplementen aan bod. Een boek als dit zou ik anders hoogstwaarschijnlijk nooit af krijgen. Daarom heb ik een selectie moeten maken uit de waaier aan beschikbare voedingssupplementen. Die selectie is gebaseerd op de meer populaire voedingssupplementen en de supplementen waarover voldoende informatie beschikbaar is in de wetenschappelijke literatuur. Verder staan in het eerste deel van het boek enkele hoofdstukken die de handvatten bieden om deze informatie juist te kunnen interpreteren en om verdere informatie uit de wetenschappelijke literatuur te kunnen vergaren.

Hoewel ik mijn best heb gedaan om de informatie in dit boek zo correct mogelijk te presenteren, is het toch mogelijk dat er onverhoopt fouten of onvolkomenheden ingeslopen zijn. Mocht u dergelijke fouten of onvolkomenheden tegenkomen, of op- en aanmerkingen hebben, dan bent u van harte welkom om deze te sturen naar mijn e-mailadres peter@peterbond.nl.

Tot slot zou ik graag mijn proeflezers, in het bijzonder Rob van Berkel, Jorn Trommelen en Peter Van Mol, willen bedanken voor hun feedback op eerdere versies van dit boek.

Peter Bond
Zeist, februari 2017

Inhoudsopgave

I	Fysiologische basis	
1	Spiersfysiologie	15
1.1	Inleiding	15
1.2	Macro- en microscopische structuur	16
1.3	Spiercontractie	18
1.4	Spiervezeltypes	20
1.5	Satellietcellen	22
1.6	Neuromusculaire aansturing	23
2	Energiesystemen	27
2.1	Inleiding	27
2.2	Fosfaatenergiesysteem	28
2.3	Glycolytische energiesysteem	30
2.3.1	Cori-cyclus	32
2.4	Oxidatieve energiesysteem	33
2.4.1	Citroenzuurcyclus	35
2.4.2	Ademhalingsketen	37

3	Absorptie, metabolisme en veiligheid	39
3.1	Inleiding	39
3.2	Absorptie	40
3.2.1	Passief transport	42
3.2.2	Actief transport	43
3.3	Metabolisme	45
3.4	Veiligheid	46
4	Moleculaire mechanismen van spiergroei	49
4.1	Inleiding	49
4.2	mTOR-signalering	50
4.2.1	Regulatie door groeifactoren	51
4.2.2	Regulatie door energiestatus	54
4.2.3	Regulatie door aminozuren	56
4.2.4	Regulatie door mechanische belasting	58

II

Supplementen

5	Bèta-alanine	63
5.1	Inleiding	63
5.1.1	Biosynthese	64
5.1.2	Absorptie	64
5.1.3	Metabolisme en excretie	66
5.2	Werkingsmechanisme	67
5.2.1	pH-buffer	67
5.2.2	Verhoogde Ca^{2+} -gevoeligheid	68
5.2.3	Carnosineshuttlehypothese	69
5.2.4	Antioxidante activiteit	69
5.3	Klinische resultaten	71
5.4	Veiligheid	72
5.5	Conclusie	73
6	Bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB)	75
6.1	Inleiding	75
6.1.1	Biosynthese	76
6.1.2	Absorptie	77
6.1.3	Metabolisme en excretie	78
6.2	Werkingsmechanisme	78
6.2.1	Stimulering van mTOR-signalering	79
6.2.2	Remming proteasomale afbraak	79

6.2.3	Verbetering van de membraanintegriteit	80
6.2.4	Verhoogde satellietcelactiviteit	81
6.2.5	Remming van autofagie/lysosomale afbraak	82
6.3	Klinische resultaten	82
6.4	Veiligheid	84
6.5	Conclusie	85
7	Cafeïne	87
7.1	Inleiding	87
7.1.1	Absorptie	88
7.1.2	Metabolisme en excretie	89
7.2	Werkingsmechanisme	90
7.2.1	Verschuiving van substraatverbruik	91
7.2.2	Stimulering natriumkaliumpomp-activiteit	92
7.2.3	Verlaagde perceptie van inspanning en pijn	92
7.3	Klinische resultaten	93
7.4	Veiligheid	95
7.5	Conclusie	96
8	Creatine	97
8.1	Inleiding	97
8.1.1	Biosynthese	98
8.1.2	Absorptie	99
8.1.3	Metabolisme en excretie	100
8.2	Werkingsmechanisme	101
8.2.1	Temporele en spatiële energiebuffer	101
8.2.2	Hyperhydratie	102
8.2.3	Satellietcellen	103
8.2.4	Besparing van S-adenosylmethionine (SAM)	103
8.2.5	Modulatie van genexpressie	104
8.3	Klinische resultaten	104
8.4	Veiligheid	108
8.5	Conclusie	109
9	Eiwitpreparaten	111
9.1	Inleiding	111
9.1.1	Absorptie	112
9.1.2	Metabolisme en excretie	114
9.2	Werkingsmechanisme	116
9.2.1	Stimulering mTORC1-signalering	117

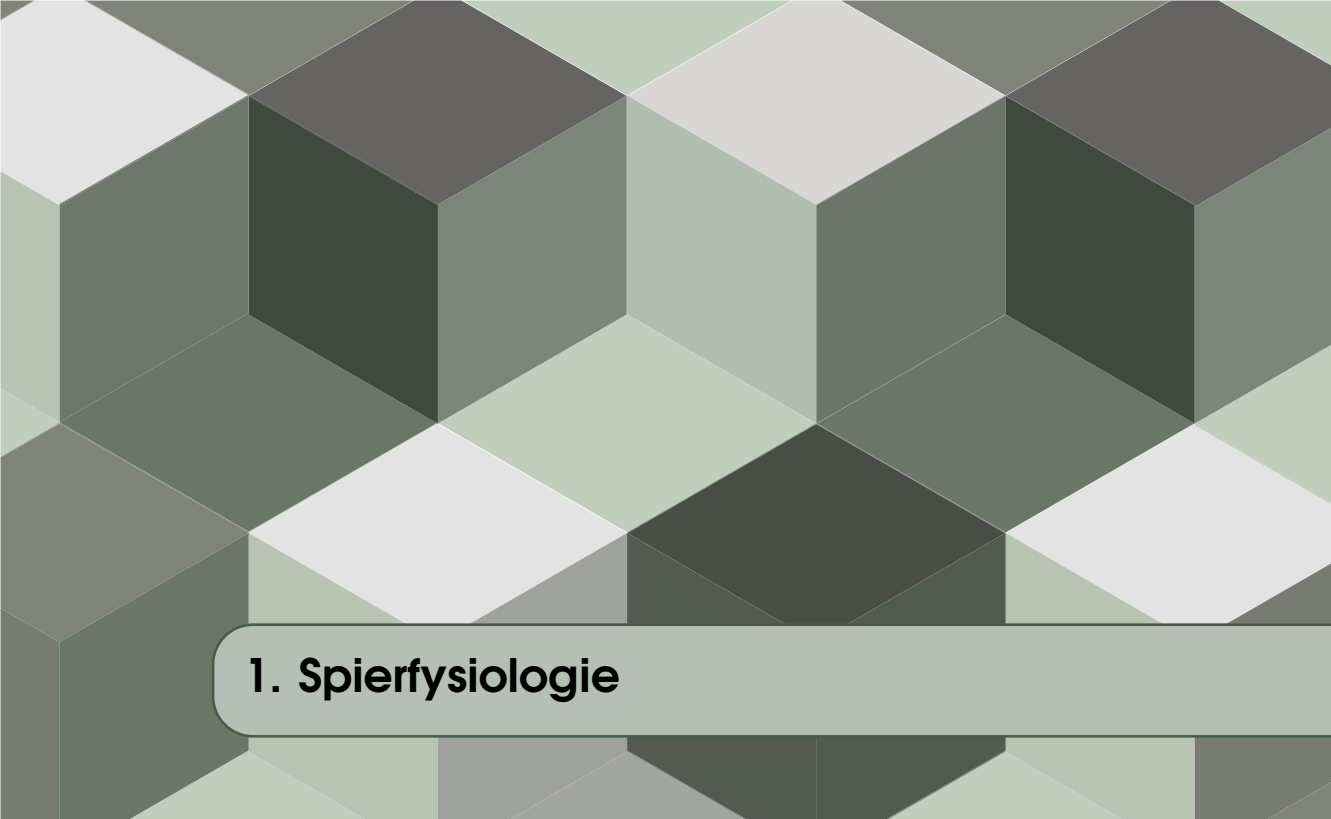
9.3	Klinische resultaten	119
9.4	Veiligheid	121
9.5	Conclusie	123
10	Fosfatidezuur	125
10.1	Inleiding	125
10.1.1	Biosynthese	126
10.1.2	Absorptie	127
10.1.3	Metabolisme en excretie	128
10.2	Werkingsmechanisme	129
10.2.1	Activatie van mTORC1	129
10.2.2	Remming ubiquitineligases	130
10.3	Klinische resultaten	131
10.4	Veiligheid	134
10.5	Conclusie	135
11	Trimethylglycine	137
11.1	Inleiding	137
11.1.1	Biosynthese	139
11.1.2	Absorptie	140
11.1.3	Metabolisme en excretie	140
11.2	Werkingsmechanisme	141
11.2.1	Bevordering glycolyse	142
11.2.2	Creatinesynthese	143
11.2.3	Eiwitstabilisator	143
11.2.4	Modulatie van genexpressie	144
11.3	Klinische resultaten	144
11.4	Veiligheid	146
11.5	Conclusie	147
12	Vitamine D	149
12.1	Inleiding	149
12.1.1	Biosynthese	150
12.1.2	Absorptie	151
12.1.3	Metabolisme en excretie	152
12.2	Werkingsmechanisme	153
12.2.1	Klassiek effect op bothomeostase	154
12.2.2	Niet-genomische effecten	155
12.2.3	Stimulering Akt/mTOR-reactiepad	155
12.2.4	Remming ubiquitineligases	156

12.3	Klinische resultaten	156
12.4	Veiligheid	158
12.5	Conclusie	159
	Referenties	161
	Index	191



Fysiologische basis

1	Spierfysiologie	15
2	Energiesystemen	27
3	Absorptie, metabolisme en veiligheid	39
4	Moleculaire mechanismen van spiergroei	49



1. Spierfysiologie

1.1 Inleiding

Skeletspieren zorgen ervoor dat wij ons kunnen bewegen in het dagelijks leven. Ze verbinden de botten van ons skelet met elkaar. Hierdoor kunnen wij deze vrijwillig ten opzichte van elkaar bewegen. Wanneer in dit boek wordt gesproken over spieren, worden skeletspieren bedoeld en niet het hartspierweefsel of het glad spierweefsel.

De skeletspieren bieden een voortdurende steun aan het skelet, zodat dit in rust niet in elkaar zakt. Zo'n 40–50% van de gehele lichaamsmassa bestaat uit spierweefsel [253]. Naast de functie om te kunnen bewegen en het skelet te ondersteunen, speelt het ook een belangrijke rol in het algemeen lichamelijk metabolisme. Bij atleten, in het bijzonder bodybuilders, kan de spiermassa zelfs ruim de helft van de gehele lichaamsmassa uitmaken. Het vergroten van deze massa neemt dan ook een centrale rol in bij het bodybuilden, tezamen met het bereiken van een zeer laag lichaamsvetpercentage en esthetische spiersymmetrie. Ook het centrale thema van dit boek is gericht op voedingssupplementen die de spiermassa doen toenemen en de spierkracht bevorderen.

Om de werking van voedingssupplementen goed te doorgronden is het cruciaal om te begrijpen hoe onze spieren werken. Daarom wordt hier in dit hoofdstuk uitgebreid aandacht geschonken. Dit hoofdstuk zal de macro- en microscopische structuur van het spierweefsel, het mechanisme van spiercontractie, de verschillende soorten spiervezeltypes, satellietcellen en de neuromusculaire aansturing bespreken. De macrostructuur van spierweefsel beschouwt de structuur op 'grof' niveau. Het beantwoordt vragen zoals: uit welke componenten bestaat een spier? En: hoe zijn deze opgebouwd? Een spier bestaat immers uit meer dan slechts de spiervezels (myocyten) die van origo naar insertie lopen (zie kader 1.1).

Kader 1.1

De origo (Latijn voor *oorsprong*) en insertie zijn de twee aanhechtingspunten van een spier aan het skelet. De spiervezels lopen over in bindweefsel, dat zich hecht aan het bot. Zo kan de kracht die gegenereerd wordt door de spiervezels worden overgedragen. Ook kunnen spiervezels direct gehecht zijn aan het bot. Traditioneel wordt de origo gedefinieerd als de proximale aanhechting van de spier, oftewel de aanhechting die het dichtst bij het midden van het lichaam ligt. De distale aanhechting, die zich het verst van het midden van het lichaam bevindt, noemt men de insertie. Het moet opgemerkt worden dat spieren meerdere origines of inserties kunnen hebben. Zo heeft de biceps brachii, die de elleboog kan buigen, twee origines (beide aan de scapula) en een insertie (aan de radius).

De spiervezels vormen specifieke structuren (bundels) en worden ondersteund door omringend materiaal (bindweefsel). Wanneer we kijken naar de microstructuur van spierweefsel kijken we op het allerkleinste niveau. Waar bestaat een spiervezel uit op moleculair niveau? Aansluitend volgt een beschouwing van het mechanisme van spiercontractie, de primaire functie van spieren, zoals beschreven door het glijdende-filamenten model (zie kader 1.3). Dit model beschrijft elegant hoe de microscopische structuren van een spiervezel leiden tot het uiteindelijke samentrekken van een spier. Vervolgens behandelen we ook de verschillende soorten spiervezeltypes. Hierin lichten we toe welke microscopische, maar vooral biochemische, verschillen er zijn tussen de verschillende types, en welke praktische implicaties dit heeft in de context van sport. Aansluitend wordt kort de rol van satellietcellen beschouwd. Deze cellen voorzien de gevestigde spiercellen van nieuwe celkernen. Tot slot wordt verteld hoe een vrijwillige spiercontractie wordt ingezet door een motorneuron, oftewel de neuromusculaire aansturing.

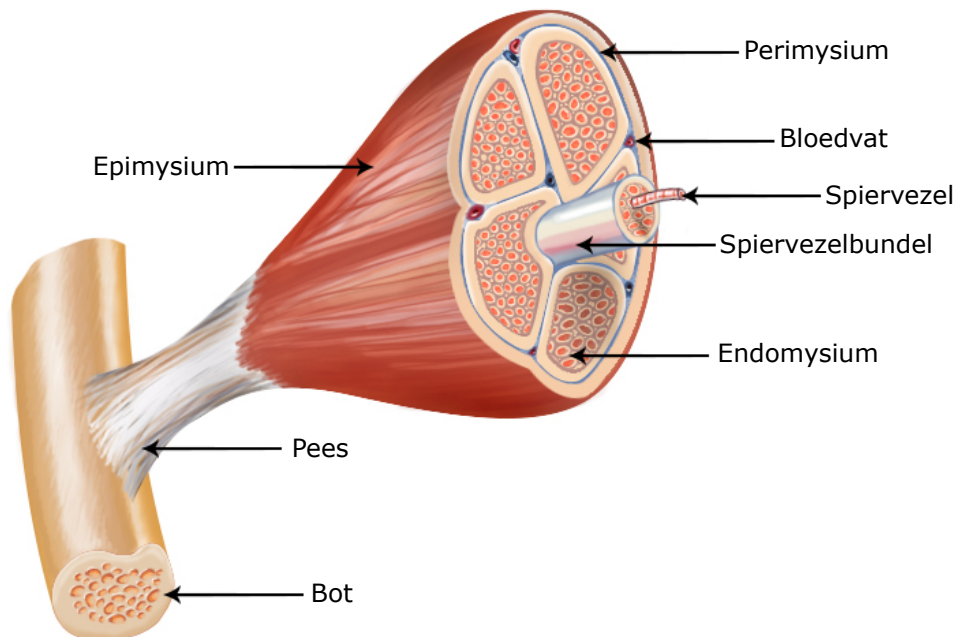
1.2 Macro- en microscopische structuur

Een spier bestaat uit spierweefsel, bindweefsel, bloedvaten en zenuwcellen. De buitenste laag van een spier bestaat uit het bindweefselvlies epimysium. Het epimysium omringt de gehele spier en loopt over in de pezen die de spier hechten aan het bot. Onder het epimysium vinden we spiervezelbundels die weer omringd worden door het bindweefselvlies perimysium. Het perimysium verbindt de spierbundels met het epimysium. De individuele spiervezels worden verder nog omringd door het endomysium. Het bindweefsel zorgt voor de overdracht van contractiekracht naar de botten, maar beschermt ook de individuele spiervezels en laat het langs elkaar schuiven van de spiervezelbundels toe tijdens contractie. Tijdens een contractie verandert de vorm van een spier aanzienlijk.

Een spiervezel wordt gevormd door een plasmamembraan, het sarcolemma. Naast de gebruikelijke functies die een plasmamembraan vervult, zoals het transport van voedings- en afvalstoffen en het integreren van signalen van buitenaf, geleidt het ook het actiepotentiaal van het aangrenzende motorneuron om contractie te initiëren (zie kader 1.2).

Kader 1.2

De plasmamembraan vormt de scheiding tussen de binnenkant van een cel (intracellulair) en de buitenkant van de cel (extracellulair). Deze scheiding wordt gevormd door fosfolipiden die een dubbellaag (bilayer) vormen. Ook zitten er in de plasmamembraan eiwitten die (selectief) transport van bepaalde moleculen toelaten. Zo bestaan er eiwitten die kanalen vormen voor ionen



Figuur 1.1: De macroscopische structuur van het skeletspierweefsel. Afbeelding: National Institutes of Health.

zoals Ca^{2+} , maar ook voor grote moleculen zoals glucose. Ook kunnen lipide blaasjes van buitenaf 'samensmelten' met de membraan om zo de inhoud in de cel te spuwen (endocytose). Zo komt materiaal van buitenaf intracellulair terecht. Omgekeerd kan de cel ook blaasjes met stoffen aanmaken om uit te spuwen (exocytose). Verder beschikt de cel over kanalen en transportereiwitten om stoffen naar buiten toe te transporteren.

Naast het uitwisselen van stoffen kan een cel extracellulaire signalen oppikken. Zo beschikt de plasmamembraan over receptoren om signalen van buitenaf te ontvangen, zoals de insulinereceptor. Binding van het peptidehormoon insuline aan de insulinereceptor op het sarcolemma activeert een reactiepad dat ervoor zorgt dat er meer glucosetransporters aanwezig zijn op het sarcolemma. Op deze manier stimuleert insuline de opname van glucose door het spierweefsel. Bovendien beschikt spierweefsel over de unieke capaciteit om onafhankelijk van insuline, als reactie op contractie, meer glucosetransporters naar het sarcolemma te transloceren (verplaatsen). Bijzonder belangrijk voor spiercellen is de regulatie van het ionentransport langs het sarcolemma, waarmee een actiepotentiaal over het sarcolemma kan worden voortgeleid. Dit proces wordt verder toegelicht in sectie 1.6.

Binnen het sarcolemma bevindt zich het sarcoplasma (het cytoplasma van een spiervezel), bestaande uit het cytosol (een geleachtige vloeistof) en de organellen. Organellen zijn componenten van de cel die eveneens door een membraan zijn omringd en unieke functies vervullen. Zo genereren de mitochondria de energie om cellulaire processen te laten plaatsvinden en vindt er in de celkern gentranscriptie plaats.

In spiervezels is er een unieke rol weggelegd voor het sarcoplasmatisch reticulum (SR,

het endoplasmatisch reticulum van een spiervezel). Het sarcolemma bevat zeer kleine instulpingen (transverse tubuli [T-tubuli]), die grenzen aan het SR. De T-tubuli geven zo het startsignaal voor contractie door aan het SR. Het SR fungeert als een Ca^{2+} -buffer. Zodra het signaal voor contractie wordt ontvangen door het SR, worden deze calciumionen vrijgegeven aan het cytosol. Het SR vormt een netwerk van buisjes door de spiervezel dat de myofibrillen omringt, tezamen met de T-tubuli.

De myofibrillen zijn de contractiele eiwitten van de cel. Zij bestaan uit verschillende soorten eiwitten die de spiercontractie verzorgen. De myofibrillen zien eruit als draadjes die over de lengte van de spiervezel lopen. Een hele hoop sarcomeren in serie vormen één zo'n myofibril.

Een sarcomeer is de kleinste eenheid van een spiervezel die kan samentrekken. Een centrale rol hierin spelen de eiwitten actine en myosine, die over elkaar heen schuiven en zo voor contractie zorgen. De eiwitten troponine en tropomyosine reguleren wanneer een sarcomeer contraheert. De calciumionen uit het SR zijn verantwoordelijk voor een conformationele (ruimtelijke) wijziging in de structuur van deze eiwitten waardoor contractie wordt geïnitieerd.

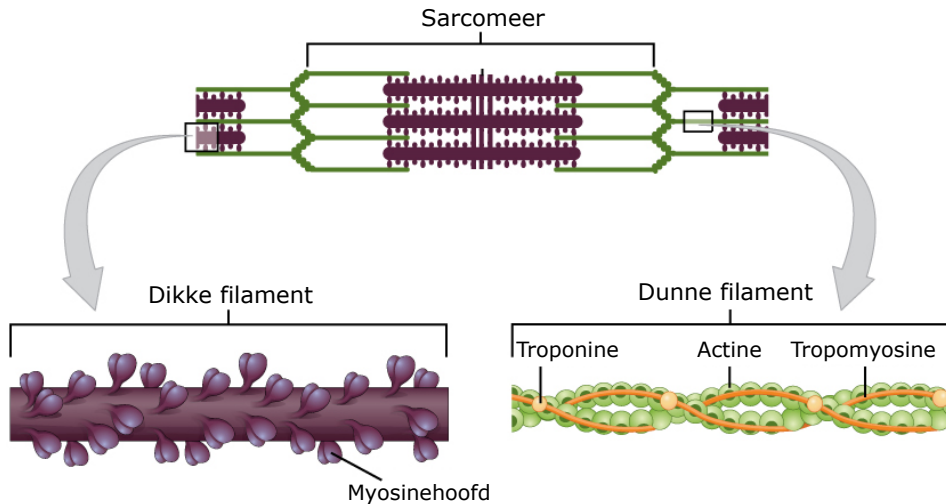
Actine, tropomyosine en troponine vormen het dunne filament. Actine maakt veruit het grootste gedeelte uit van het dunne filament. Het eiwit is bolvormig (globulaire actine [G-actine]), maar vormt als polymeer een lange dubbelwendinge helix (fibrillaire actine [F-actine]). De ruggengraat van F-actine wordt gevormd door het eiwit tropomyosine, waarlangs de G-actine zich heeft gebonden.

Na elke zeven G-actinemoleculen is er een troponine-eiwitcomplex te vinden. Het troponine-eiwitcomplex bestaat uit drie subeenheden, te weten troponine I, troponine T en troponine C. Troponine I zorgt voor de binding aan het actine en troponine T zorgt voor de binding aan het tropomyosine. Troponine C heeft een hoge affiniteit voor Ca^{2+} en veroorzaakt een conformationele verandering van het complex bij binding hieraan. Deze conformationele verandering heeft tot gevolg dat de actine niet meer geremd wordt door het complex om een binding aan te gaan met de myosinehoofden. Het myosine-eiwit vormt het dikke filament, die aan weerszijden met titine gebonden is aan de Z-schijven.

Myosine bestaat op zijn beurt uit maar liefst zes subeenheden. Twee van deze subeenheden zijn zogeheten zware ketens (MHC, Eng.: *myosin heavy chain*) en vier zijn lichte ketens (MLC, Eng.: *myosin light chain*). De MHC vormen zich ook tot een dubbele helix, met aan weerszijden structuren die op hoofden lijken. De MLC spelen vooral een ondersteunende en regulatieve rol voor deze hoofden. De myosinehoofden zijn uiteindelijk verantwoordelijk voor contractie: zij 'lopen' als het ware over de actine en trekken deze zo naar zich toe. Het mechanisme van spiercontractie wordt verder besproken in sectie 1.3.

1.3 Spiercontractie

De contractie van een spier wordt geïnitieerd door een depolarisatie van het sarcolemma. Het actiepotentiaal dat verantwoordelijk is voor deze depolarisatie wordt in gang gezet door een motorneuron. Dit wordt verder beschreven in sectie 1.6. Zodra het actiepotentiaal over de T-tubuli wordt voortgeleid openen zich hier L-type Ca^{2+} -kanalen die zijn gekoppeld aan aangrenzende Ca^{2+} -kanalen van het SR. Dit leidt tot een calciumgeïnduceerde uitstroom van Ca^{2+} uit het SR naar het cytosol. Hierdoor stijgt de concentratie Ca^{2+} in het cytosol sterk. Dit heeft als gevolg dat er meer Ca^{2+} bindt aan troponine C, zoals beschreven in sectie 1.2, en een associatie tussen actine en de myosinehoofden kan



Figuur 1.2: Een sarcomeer. Het dikke filament bestaat uit myosine-eiwitten en het dunne filament uit troponine, actine en tropomyosine. Aan weerszijden van de sarcomeer bevinden zich de Z-schijven. Hieraan zijn de dikke filamenten gebonden met titine. Afbeelding overgenomen en aangepast uit OpenStax Anatomy and Physiology. Vrijgegeven onder de Creative Commons Attribution 4.0 International-licentie (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.nl>).

ontstaan: het acto-myosine-complex. Na vorming van dit complex kunnen ATPases op de myosinehoofden het energiedragende molecuul adenosinetrifosfaat (ATP) hydrolyseren waarbij adenosinedifosfaat (ADP) en een anorganische fosfaatgroep (P_i) vrijkomen. Deze twee producten associëren met myosine, en de vrije energie afkomstig van de hydrolyse van ATP leidt tot een rotatie van myosine, waardoor deze een kruisbrug vormt met actine. De rotatie van myosine zorgt ervoor dat er spanning op het eiwit komt te staan. Net als een ingedrukte veer beschikt het eiwit in deze toestand over opgeslagen energie. Deze opgeslagen energie zorgt ervoor dat er een knik in de nek van het myosinehoofd ontstaat zodra de P_i -groep dissocieert van het myosine. Deze knik 'trekt' het dunne filament over het dikke filament heen, naar het midden van de sarcomeer toe. Dit wordt ook wel de krachtslag (Eng.: *power stroke*) genoemd. Hierna dissocieert het nog gebonden ADP en kan de cyclus zich herhalen bij aanwezigheid van ATP.

Kader 1.3



Het glijdende-filamenten model (Eng.: *sliding filament model*) werd onafhankelijk en gelijktijdig geïntroduceerd door twee onafhankelijke onderzoeksgroepen (Andrew Huxley en Rolf Niedergerke, Universiteit van Cambridge en Hugh Huxley en Jean Hanson, *Massachusetts Institute of Technology*). Beide groepen publiceerden hun werk in *Nature* in mei 1954. Dat zij gelijktijdig hun werk publiceerden was geen toeval, beide onderzoeksgroepen waren op de hoogte van elkaars werk [231]. Sinds de oorspronkelijke introductie van het model is het in essentie ongewijzigd gebleven.

1.4 Spiervezeltypes

Een spier bestaat uit verschillende types spiervezels. De onderverdeling van deze types kan gemaakt worden op verschillende gronden. Al heel lang geleden maakte men het onderscheid tussen wit spierweefsel en rood spierweefsel. Hierbij werd duidelijk een onderscheid gemaakt op het fenotype.

De kleur van rood spierweefsel is te danken aan de hoge concentratie myoglobine die het bevat. Myoglobine bevat een heemverbinding die een rode kleur heeft. Deze verbindingen zijn ook verantwoordelijk voor de rode kleur van het bloed, waarbij zij aanwezig zijn in hemoglobine. Myoglobine is verantwoordelijk voor het intracellulaire zuurstoftransport en het metabolisme van rood spierweefsel leunt dan ook sterk op zuurstof.

Naast het onderscheid dat gemaakt kan worden op fenotype kan men spiervezeltypes onderscheiden op basis van de contractiele eigenschappen. Zo kan men snelle en langzame spiervezels onderscheiden door te kijken hoelang het duurt voordat er een maximale kracht wordt bereikt na het begin van een spiervezelcontractie. Merk op dat de benoemingen van 'snel' en 'langzaam' vooral een belang kennen voor de typering en niet zozeer praktisch in het dagelijks leven; men meet de contractietijd immers in alle gevallen in milliseconden.

Ook kan er een onderscheid gemaakt worden op grond van metabole eigenschappen; aeroob dan wel anaeroob. Een aerobe (oxidatieve) spiervezel beschikt over veel mitochondria, is sterk gevasculariseerd en heeft een hoog myoglobine- en oxidatieve enzymgehalte. Al deze kenmerken zijn ingericht om de spiervezel optimaal te voorzien van zuurstof en deze ook te gebruiken voor het genereren van bruikbare energie om te kunnen contraheren. Een anaerobe spiervezel heeft daarentegen weinig mitochondria, is minder sterk gevasculariseerd, heeft een laag myoglobinegehalte en kenmerkt zich juist door een hoge glycolytische capaciteit (een anaerobe manier om energie te genereren, deze wordt behandeld in sectie 2.3). Men moet er echter altijd op bedacht zijn dat dit vooral extremen duidt van de spiervezeltypes. In de realiteit vallen veel spiervezels qua profiel tussen deze twee typering in.

Met behulp van immunohistochemie en elektroforese (kader 1.4) kwam al snel de populaire onderverdeling naar de type MHC-isovorm die het sterkst aanwezig is in een spiervezel. Op basis van de MHC-isovormexpressie maakt men onderscheid tussen vier primaire spiervezeltypes, te weten: type 1 (MHC1 β), type 2A (MHC2a), type 2X (MHC2x) en type 2B (MHC2b) [405]. Type 2B komt niet voor bij mensen in de belangrijke skeletspieren. De spiervezels die de type 1-isovorm tot expressie brengen worden ook wel *slow twitch* vezels genoemd en de spiervezels die de type 2-isovormen tot expressie brengen *fast twitch* vezels. De MHC-isovorm draagt bij aan de eigenschappen van de verschillende types en is nauwkeurig te identificeren, waardoor deze classificatie vaak als leidend wordt gezien. De snelheid waarmee een spiervezel samentrekt is gecorreleerd met de betreffende MHC-isovorm [352]. De volgorde van contractiesnelheid van snel naar langzaam is als volgt:

$$\text{type 2B} > \text{type 2X} > \text{type 2A} > \text{type 1}$$

Een belangrijke factor hierbij is de snelheid waarmee de myosinehoofden van de verschillende MHC-isovormen ATP kunnen hydrolyseren om de krachtslag te maken en zo de filamenten over elkaar heen te schuiven.

Zoals al eerder benadrukt vallen veel spiervezels qua profiel tussen deze types in, dit zijn de zogenaamde hybride spiervezels. Zij brengen twee verschillende MHC-isovormen tot expressie en in verschillende mate.

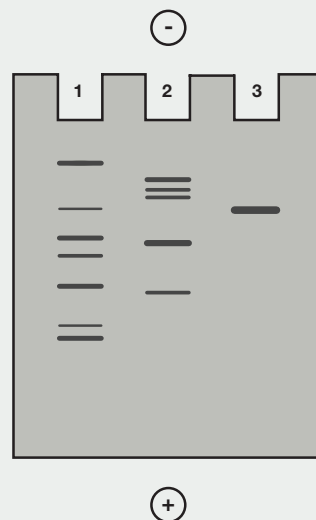
Ook zijn er zogenaamde transitiepiervezels tussen type 1 en type 2A in gehypothetiseerd, die mogelijk een nog onbekende MHC-isovorm bevatten, over bepaalde post-translationale modificaties beschikken of een afwijkende isovorm van andere myofibrillaire eiwitten tot expressie brengen [326].

De meeste spiervezels zullen naar alle waarschijnlijkheid echter 'pure' spiervezels zijn, oftewel spiervezels die slechts één MHC-isovorm tot expressie brengen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de opmaak van het gen van de type 1-isovorm. In dit gen bevinden zich twee introns die elk een miRNA beschrijven (miR-208b en miR-499). Deze miRNAs blokkeren de translatie van transcriptiefactor Sox6 [458, 368]. Deze transcriptiefactor is verantwoordelijk voor remming van expressie van de type 1-isovorm en stimuleert juist de expressie van de snelle isovormen. Door deze twee miRNAs vormt deze remming een aan/uit-schakelaar wat betreft welke MHC-isovorm tot expressie komt.

Kader 1.4



Immunohistochemie is een techniek om bepaalde eiwitten te detecteren. Hierbij wordt gebruikgemaakt van een molecuul (antilichaam) die specifiek is voor het te detecteren eiwit (antigen). Zodra de antilichaam-antigencomplexen gevormd zijn, moet deze worden gescheiden van de overige moleculen. Hierna volgt het detecteren en kwantificeren van de complexen. Dit kan op meerdere manieren gedaan worden. Populaire methoden hiervoor zijn een western blot, een radioimmunoassay (RIA) of door koppeling aan een enzym die een kleurreactie katalyseert (ELISA, Eng.: *enzyme-linked immunosorbent assay*). Elektroforese biedt de mogelijkheid om eiwitten te scheiden op basis van hun grootte of lading. Hierbij wordt een gel gebruikt met aan de ene kant een negatieve elektrode en aan de andere kant een positieve elektrode. Zo ontstaat een elektrisch veld van de ene naar de andere elektrode. Met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese (PAGE), waarbij er eerst een voorbehandeling plaatsvindt met natriumdodecylsulfaat (SDS, Eng.: *sodium dodecyl sulfate*), scheidt men op basis van grootte (SDS-PAGE). Het eiwitmengsel wordt door SDS gedenateerd en volledig negatief geladen. Wanneer het eiwitmengsel wordt losgelaten in de gel aan de zijde van de negatieve elektrode, zullen de individuele eiwitten met verschillende snelheden naar de positieve elektrode migreren. De snelheid is hierbij afhankelijk van de grootte van het eiwit, en zodoende kan men scheiden op basis van grootte.



In bovenstaand figuur is een voorbeeld te zien van het scheiden van eiwitten op basis van SDS-PAGE. Om de eiwitten zichtbaar te maken (de streepjes van de figuur), kan gebruikt worden gemaakt van autoradiografie, directe kleuring met kleurstoffen of indirecte kleuring met behulp van antilichamen. In dat laatste geval worden de gescheiden eiwitten eerst overgebracht naar een membraan waaraan ze hechten (blotten).

Om de groottes van de eiwitten te kunnen bepalen is er een referentiekolom nodig. Daarom wordt ter vergelijking een eiwitmengsel toegevoegd waarvan bekend is welke massa's de verschillende eiwitten bezitten (kolom 1 van de figuur). De mengsels in kolom 2 en 3 kunnen zo vergeleken worden met deze referentiekolom. Hierbij hebben de strepen dicht bij de negatieve elektrode een grotere molecuulmassa dan de strepen die dicht bij de positieve elektrode zijn gekomen.

Op basis van iso-elektrische focussing (IEF) wordt echter gescheiden op basis van de lading van eiwitten. Eiwitten bestaan tenslotte uit tal van aminozuren en aminozuren bevatten zijketens die een elektrische lading hebben. Voor IEF gebruikt men een gel met een pH-gradiënt, waardoor de eiwitten tot stilstand komen in de gel op de plaats waar de algehele lading van het eiwit 0 is (het iso-elektrisch punt).

Het is belangrijk om te realiseren dat spiervezeltypeclassificatie niet alles zeggend is wat betreft de specifieke eigenschappen van een spiervezel. Het biedt echter een leidraad die in het algemeen handig te gebruiken is.

1.5 Satellietcellen

Spiervezels bevatten meerdere celkernen en om die reden worden zij ook wel multinucleaire (meerkernige) cellen genoemd. Doordat de celkernen van spiervezels niet in staat zijn om te delen (post-mitotisch) zijn zij afhankelijk van een externe bron voor aanvulling en regeneratie van celkernen. Spiervezels van ratten bevatten circa 44 tot 116 celkernen per millimeter, waarbij type 1-spiervezels meer celkernen per millimeter bevatten dan type 2-spiervezels [450]. Aangezien spiervezels meerdere centimeters lang kunnen worden betekent dit dat één enkele spiervezel al over honderden tot duizenden celkernen kan beschikken.

Deze celkernen zijn voornamelijk afkomstig van de omringende satellietcellen. Naar schatting zijn 1.4% tot 7.3% van alle celkernen in de spieren van satellietcellen [248]. Satellietcellen liggen dicht tegen de spiervezels aan, tussen het sarcolemma en de basale membraan (Eng.: *basal lamina*). Zij werden voor het eerst ontdekt door Alexander Mauro [301]. Met een elektronenmicroscop gericht op spiervezels van de tibialis anterior (voorste scheenbeenspier) van een kikker zag hij cellen 'geklemd' tussen het sarcolemma van de spiervezels en de basale membraan. Ook merkte hij op dat deze satellietcellen bijna geen cytoplasma bevatten en de celkern bijna het gehele volume van de cellen opmaakten. Verschillende hypothesen werden kort door hem aangekaart, waaronder dat ze zouden kunnen dienen voor herstel van de spiervezel wanneer deze is beschadigd. Dit bleek later inderdaad ook zo te zijn [103, 391].

Niet veel later werd ook de rol van satellietcellen in spierhypertrofie onderzocht. Er ontstond namelijk een belangrijke vraag: groeien spieren doordat de mRNA- en eiwit-synthese per celkern stijgt, of blijft deze gelijk en worden er meer celkernen toegevoegd aan de spiervezel? In het laatste geval zou er een zeer belangrijke rol voor satellietcellen zijn weggelegd. Enkele bevindingen leidden dan ook tot de zogeheten myonucleaire domeinhypothese. Deze hypothese stelt dat iedere celkern slechts de regie kan hebben over

een beperkte hoeveelheid cytoplasma, waardoor er voor spiergroei dus nieuwe celkernen moeten worden toegevoegd aan de spiervezel om groei te kunnen blijven ondersteunen. Deze hypothese kwam voornamelijk voort uit drie bevindingen, namelijk dat:

- γ -straling, dat vrijwel alle satellietcellen uitschakelt, overbelastinghypertrofie (Eng.: *overload hypertrophy*) sterk remde [389];
- eiwit gesynthetiseerd door een celkern zich beperkt tot een begrensde gebied (het myonucleair domein) [345]; en
- de hoeveelheid cytoplasma om een celkern heen (de ratio cytoplasma/celkern) vrij constant blijft [11].

Verschillende experimentele modellen bleken later echter (optimale) hypertrofie te kunnen aantonen zonder dat daarbij satellietcellen benodigd waren [49]. Deze gegevens maken het aannemelijk om te stellen dat satellietcellen dus niet benodigd zijn voor spierhypertrofie. Eén studie liet zelfs een stijging van $\sim 50\%$ van de spiermassa zien in een transgeen muismodel met een continu actieve vorm van Akt (Akt is een belangrijk eiwit voor onder meer spiergroei en wordt behandeld in sectie 4.2.1) [48].

Het moet echter worden opgemerkt dat al deze experimenten slechts naar de resultaten op korte termijn (enkele weken) keken. Bovendien werpt recent onderzoek een ander licht op deze resultaten [141]. Zo zouden deze eerdere bevindingen, waarbij satellietcellen niet benodigd blijken, vertrouwen op gemeten massa als surrogaat eindpunt voor spierhypertrofie. Dit kan onbetrouwbare resultaten leveren doordat het moeilijk is in de gebruikte diermodellen om de betreffende spier (veelal de plantarisspier) anatomisch af te kaderen. Ook zouden beschadigde/regenererende spiervezels onterecht worden meegerekend.

Het aantal satellietcellen wordt doorgaans immunohistochemisch bepaald. Hierbij wordt gekeken naar de transcriptiefactor Pax7 die hiervoor als biomarker wordt gebruikt. Wanneer satellietcellen vervolgens geactiveerd worden, vormen zij myoblasten en prolifereren zij. Deze geactiveerde satellietcellen worden gekenmerkt door expressie van Myf5 en MyoD. Deze kunnen vervolgens verder differentiëren tot myotubes, die gekenmerkt worden door expressie van myogenine en Myf6. De myotubes kunnen vervolgens fuseren met spiervezels om zo hun celkernen te doneren.

De regulatie van deze proliferatie, differentiatie en fusie in de context van spiergroei wordt geregeld door de spiervezels zelf. Dit is een vorm van paracrine regulatie: de spiervezels maken moleculen aan die de omringende satellietcellen activeren. Deze regulatie wordt verzorgd door serum response factor (Srf), een transcriptiefactor die wordt gereguleerd door mechanische belasting en leidt tot de afgifte van interleukinen IL-6 en IL-4 door de spiervezel. IL-6 en IL-4 zorgen op hun beurt voor respectievelijk de proliferatie en fusie van satellietcellen met spiervezels [187].

1.6 Neuromusculaire aansturing

Spieren worden aangestuurd door motorneuronen (zie kader 1.5). Deze neuronensprongen uit het ruggenmerg naar de spieren toe, waar zij vervolgens splitsen in vele takjes. Elk takje stuurt één spiervezel aan. Een motorneuron innerveert zo meerdere spiervezels. De hoeveelheid spiervezels die een motorneuron innerveert kan variëren van slechts enkele tot zelfs honderden spiervezels. Het geheel van een motorneuron en de spiervezels die erdoor worden geïnnerveerd, wordt een motoreenheid (Eng.: *motor unit*) genoemd. Het motorneuron activeert zijn geïnnerveerde spiervezels door middel van een neuromusculaire junctie (ook wel motorische eindplaat genoemd). De neuromusculaire junctie is de

plaats waarop het motorneuron contact maakt met de spiervezel. Hierbij bevinden zich op een piepkleine afstand (de synapsspleet) van het sarcolemma de synapsknopjes van de motorneuron. Deze synapsknopjes kenmerken zich door meerdere synapsblaasjes.

Kader 1.5

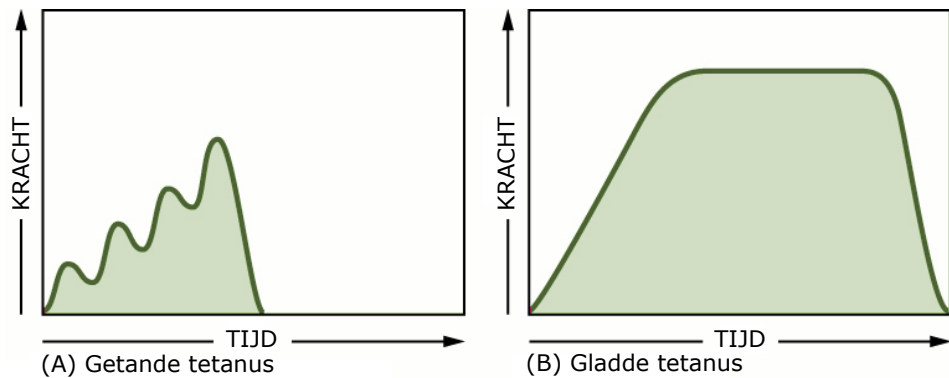


Een motorneuron is een gespecialiseerd soort zenuwcel (neuron). Neuronen hebben een algemene structuur bestaande uit een signaalontvangend deel (dendrieten), een cellichaam (soma), een langgerekt geleidend deel (axon) en tot slot een doorgeefluik van het signaal (synapsknopje). De ruimte tussen de synapsknop en de cel die het signaal ontvangt (postsynaptische cel) noemt men de synapsspleet. Zodra een actiepotentiaal ontstaat in de soma, en deze wordt voortgeleid over het axon en de synapsknop bereikt, scheidt de synapsknop een chemische stof uit in de synapsspleet. Deze chemische stof is een neurotransmitter. Het lichaam kent vele neurotransmitters, zoals de catecholamine noradrenaline of de ester acetylcholine. Vervolgens bindt de neurotransmitter aan receptoren van de postsynaptische cel waar het een reactie teweeg brengt. Acetylcholine ligt opgeslagen in de synapsblaasjes en wordt uitgescheiden door de synapsknopjes van de motorneuron wanneer deze is geactiveerd. Hierna bindt het aan acetylcholinereceptoren gelegen op het sarcolemma, waardoor de depolarisatie van de spiervezel in gang wordt gezet.

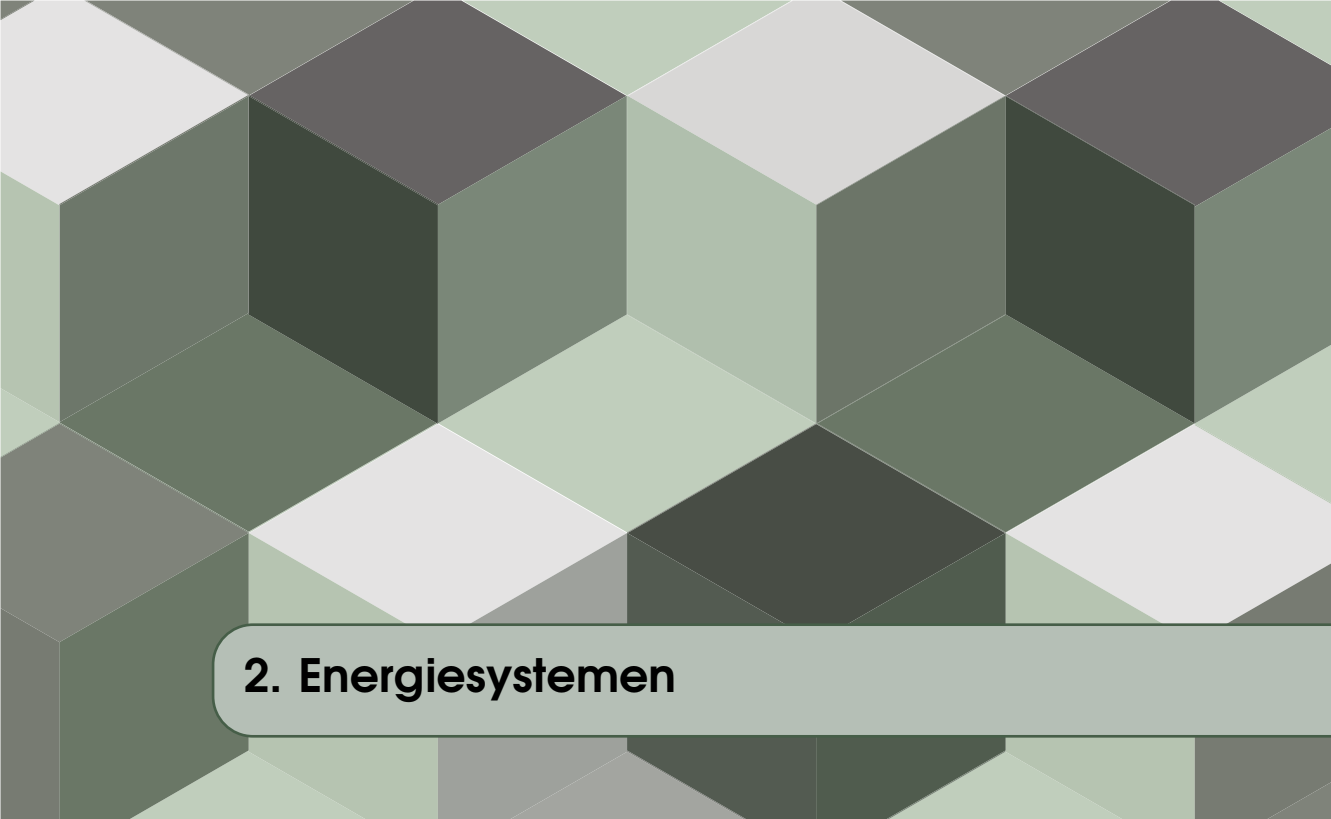
In de synapsblaasjes heeft een motorneuron de transmitter acetylcholine opgeslagen. De acetylcholine wordt middels exocytose in de synapsspleet uitgescheiden wanneer de motorneuron wordt geactiveerd. De acetylcholine bindt aan receptoren die aanwezig zijn op het postsynaptische membraan (het sarcolemma). Dit zorgt ervoor dat de membraan permeabeler wordt voor kationen. Deze verhoogde kationpermabiliteit heeft depolarisatie van de membraan tot gevolg. De acetylcholine die is vrijgekomen in de synapsspleet wordt snel weer opgeruimd, zodat de spiervezel niet continu geactiveerd blijft. Dit wordt gedaan door acetylcholinesterases die aanwezig zijn op het sarcolemma.

Eén enkele contractie van een spiervezel noemt men een twitch. In de realiteit komen twitches zelden voor. Motorneuronen worden namelijk vaak meermaals geactiveerd voor zelfs de meest fijne en kortdurende bewegingen. Door het verhogen van de frequentie waarmee de motorneuron depolariseert en acetylcholine afscheidt in de synapsspleet, en resulterend de spiervezel exciteert, weten de motorneuronen een continue contractie (en maximale contractiekracht) te realiseren. Bij een voldoende hoge frequentie stijgt de concentratie Ca^{2+} in de spiervezel tot een dergelijk hoog niveau dat er een maximale hoeveelheid kruisbruggen optreden. Dit noemt men een gladde tetanus (zie figuur 1.3). Bij een gladde tetanus volgen de depolarisaties elkaar dus dermate snel op dat er geen relaxatie (Ca^{2+} -heropname door het SR) van de spiervezel optreedt. De Ca^{2+} -concentratie blijft daardoor hoog genoeg om vrijwel al het troponine C te binden. Hierdoor komen de dunne filamenten bloot te liggen en kan het maximale aantal kruisbruggen gevormd worden met de dikke filamenten. Wanneer er genoeg tijd zit tussen de opeenvolgende depolarisaties voor gedeeltelijke relaxatie ontstaat er een getande tetanus (zie figuur 1.3).

Het hele proces beginnend met het signaal vanuit de hersenen dat via een motorneuron zorgt voor een contractie van de geïnnerveerde spiercellen wordt de excitatiecontractiekoppeling genoemd.



Figuur 1.3: (A) De opeenvolgende depolarisaties zorgen voor een opsomming van de geleverde kracht, maar de tussenpozen zijn lang genoeg om relaxatie toe te laten. De individuele depolarisaties zijn nog duidelijk te herkennen bij een getande tetanus (ook wel onvolkomen tetanus genoemd). (B) De depolarisaties volgen elkaar dermate snel op dat er geen relaxatie meer optreedt en de individuele depolarisaties niet meer te onderscheiden zijn. Er treedt een gladde tetanus op. Afbeelding overgenomen en aangepast uit OpenStax Anatomy and Physiology. Vrijgegeven onder de Creative Commons Attribution 4.0 International-licentie (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.nl>).



2. Energiesystemen

2.1 Inleiding

Spieren hebben energie nodig om te kunnen samentrekken. Deze energie halen de spiervezels, net als alle andere cellen, uit glucose en vetzuren. Spiervezels zijn vrij bijzondere cellen als het gaat om het halen van energie uit brandstoffen. Daar waar de meeste cellen een vrij constant gebruik van energie hebben, kan het energieverbruik van een spiervezel van het ene op het andere moment meer dan een honderdvoud stijgen [393]. Spiervezels zijn gelukkig uitgerust met drie zeer goed ontwikkelde energiesystemen. Deze drie energiesystemen verschillen in hun capaciteit om energie te leveren en de snelheid waarmee zij dit kunnen.

Zo heeft het fosfaatenergiesysteem een zeer kleine capaciteit, slechts genoeg om een spiercontractie enkele seconden te handhaven [472]. Het kan echter wel zeer snel energie leveren [393], i.e. het heeft een hoog vermogen. Ook verbruikt het geen zuurstof. Het fosfaatenergiesysteem speelt hierdoor een belangrijke rol bij intensieve, zeer korte, inspanningen.

Het glycolytische energiesysteem heeft een wat grotere capaciteit dan het fosfaatenergiesysteem, maar beschikt over een lager vermogen. Dit systeem kan dus langer energie leveren, maar levert minder energie per tijdseenheid dan het fosfaatenergiesysteem. Het systeem werkt net als het fosfaatenergiesysteem anaeroob en verbruikt dus geen zuurstof.

Het oxidatieve energiesysteem beschikt over een nóg lager vermogen, maar heeft een – praktisch gezien – eindeloze capaciteit. Dit systeem verbruikt, zoals de naam suggereert, wel zuurstof (aeroob).

Het is belangrijk om te realiseren dat zowel het glycolytische energiesysteem als het oxidatieve energiesysteem direct hun energie halen uit de brandstoffen die wij uit

onze voeding halen: koolhydraten, vetzuren en aminozuren. Het fosfaatenergiesysteem daarentegen is afhankelijk van deze twee energiesystemen om aangevuld te worden, wat gebeurt in een rusttoestand. Goed beschouwd fungeert het fosfaatenergiesysteem dan ook als een intermediaire buffer van snel beschikbare energie.

Tot slot moeten deze systemen niet gezien worden als sequentieel opererende energieleveranciers, maar als continu opererende en samenwerkende systemen. Zelfs bij een maximale inspanning van slechts enkele seconden wordt een gedeelte van de energie, hoewel klein, aerob (met gebruik van zuurstof) opgewekt. Des te langer de inspanning, des te groter zal de bijdrage van het oxidatieve energiesysteem zijn. Geschat wordt dat er bij maximale inspanning een gelijke bijdrage van anaerobe en aerobe energie optreedt tussen de 1 à 2 minuten, en waarschijnlijk rond de 75 seconden [159]. En hoewel traditioneel gezien maximale inspanningen van 30 seconden worden gezien als louter anaerob, lijkt ook hier al ruim een kwart van de energie afkomstig uit aerobe energie.

	Capaciteit (J/kg)	Vermogen (W/kg)
Fosfaatenergiesysteem	400	800
Glycolytische energiesysteem	1000	325
Oxidatieve energiesysteem	-	200

Tabel 2.1: De capaciteit en het vermogen van de drie energiesystemen uitgedrukt in joule per kg spiermassa. Deze waarden zijn slechts schattingen en zijn sterk afhankelijk van trainingsstatus en andere factoren. Let op: 1 W = 1 J/s; vermogen drukt dus een maat van energie per tijdseenheid uit. Overgenomen uit Cardinale e.a. [83].

2.2 Fosfaatenergiesysteem

Het fosfaatenergiesysteem levert energie in een vorm die direct benut kan worden door vele cellulaire processen, waaronder het samentrekken van de sarcomeren. Deze vorm van energie is het molecuul adenosinetriphosfaat (ATP), die onder andere door de myosinehoofden wordt gebruikt om de krachtslag te maken zoals beschreven in sectie 1.3. Bij een contractie wordt ATP razendsnel gebruikt en wordt deze ook zeer snel weer aangevuld vanuit dit energiesysteem. Hierdoor daalt de concentratie ATP in de cel nauwelijks. De ATP-omzet (Eng.: *ATP turnover*) is ontzettend groot. Voor het lopen van een marathon regeneert het lichaam van een elite-marathonloper maar liefst 60 kg ATP [73].

De reactie die de myosine-ATPases katalyseren om energie uit het ATP-molecuul te onttrekken is als volgt:



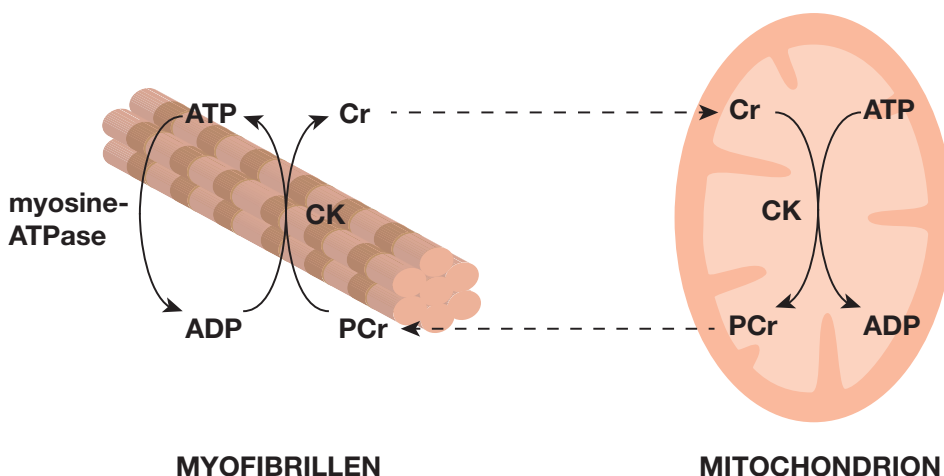
Het ATP wordt gehydrolyseerd en er ontstaan adenosinedifosfaat (ADP), anorganisch fosfaat (P_i) en een proton (H^+). De hoeveelheid ATP in een cel is echter zéér beperkt. De concentratie ATP in een spiervezel is 2-5 mM, dit is slechts genoeg om een spiercontractie enkele seconden te handhaven [472].

Het fosfaatenergiesysteem bestaat uit een reservoir van creatine (Cr), creatinefosfaat (PCr) en het enzym creatinekinase (CK). CK katalyseert de volgende omkeerbare reactie:



Met deze gegevens kunnen we afleiden wat er gebeurt op energieniveau zodra een spiersamentrekt. De spiervezel krijgt het signaal om samen te trekken waardoor de myosine-ATPases op de myosinehoofden ATP gaan hydrolyseren (vergelijking 2.1) om dit te bewerkstelligen. Er ontstaan hierdoor ADP en protonen (H^+), zoals ook aan de linkerzijde te zien is van vergelijking 2.2. De buffer PCr van het fosfaatenergiesysteem kan er nu voor zorgen dat de reactie van vergelijking 2.2 naar rechts verloopt, waardoor er direct weer ATP gegenereerd wordt. Bovendien worden de gegenereerde protonen ook direct gebruikt, waardoor deze reactie als het ware ook als pH-buffer fungeert. Een daling van de pH ten gevolge van de reactie die myosine-ATPases katalyseren wordt opgevangen.

De buffer van PCr kan weer volledig worden aangevuld in rust. Dit gebeurt vanuit het glycolytische energiesysteem en het oxidatieve energiesysteem zodra er genoeg ATP is om reactie 2.2 naar links te laten verlopen. Dit gebeurt zowel in het cytosol als in de mitochondria. In de mitochondria vindt ATP-generatie door het oxidatieve energiesysteem plaats. Tijdens een spiercontractie is er hierdoor veel ATP aanwezig in de mitochondria ten opzichte van de myofibrillen waar het ATP wordt verbruikt. In het cytosol verloopt hierdoor de door CK-gekatalyseerde reactie naar rechts, om ATP te genereren, terwijl het in de mitochondria naar links verloopt om PCr te leveren. Het in de mitochondria gegenereerde PCr diffundeert vervolgens naar de myofibrillen, waar het gebruikt wordt om weer ATP te genereren. Dit wordt ook wel het creatinefosfaat-shuttlesysteem genoemd (zie figuur 2.1).



Figuur 2.1: Het creatinefosfaat-shuttlesysteem. De myosine-ATPases hydrolyseren ATP om contractie te bewerkstelligen waardoor ADP wordt gegenereerd. De door CK-gekatalyseerde reactie kan vervolgens het ADP herfosforyleren tot ATP met gebruik van de fosfaatgroep afkomstig van PCr. Het hierdoor ontstane Cr diffundeert terug naar de mitochondria waar deze door CK terug wordt gefosforyleerd tot PCr met energie afkomstig van de ATP-generatie door het oxidatieve energiesysteem. Afkortingen: ADP, adenosinedifosfaat; ATP, adenosinetrifosfaat; CK, creatinekinase; Cr, creatine; PCr, creatinefosfaat.

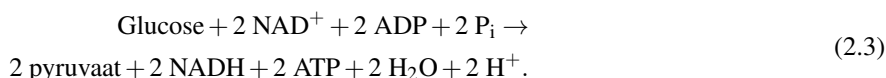
Kader 2.1

Creatinesuppletie is in staat om de totale hoeveelheid Cr (en hiermee ook de hoeveelheid PCr) in spiervezels te vergroten. Hierop berust het prestatiebevorderende effect van creatinesuppletie. Creatinesuppletie wordt verder behandeld in hoofdstuk 8.

2.3 Glycolytische energiesysteem

Het glycolytische energiesysteem berust op de energie die vrijkomt bij het biochemische proces genaamd glycolyse. Glycolyse splitst het molecuul glucose in twee moleculen pyruvaat. Hierbij worden twee moleculen ATP gegenereerd, alsook twee moleculen NADH. Het pyruvaat kan vervolgens worden omgezet naar acetyl-CoA om als substraat te dienen voor de citroenzuurcyclus, zoals beschreven in sectie 2.4.1. Echter, bij een zuurstoftekort wordt het pyruvaat met name gereduceerd tot lactaat door het enzym lactaatdehydrogenase. In rust wordt ook lactaat geproduceerd, maar in kleinere hoeveelheden.

De glycolyse bestaat uit tien stappen die gekatalyseerd worden door enzymen. Samenvattend vormen deze tien stappen de volgende reactie:

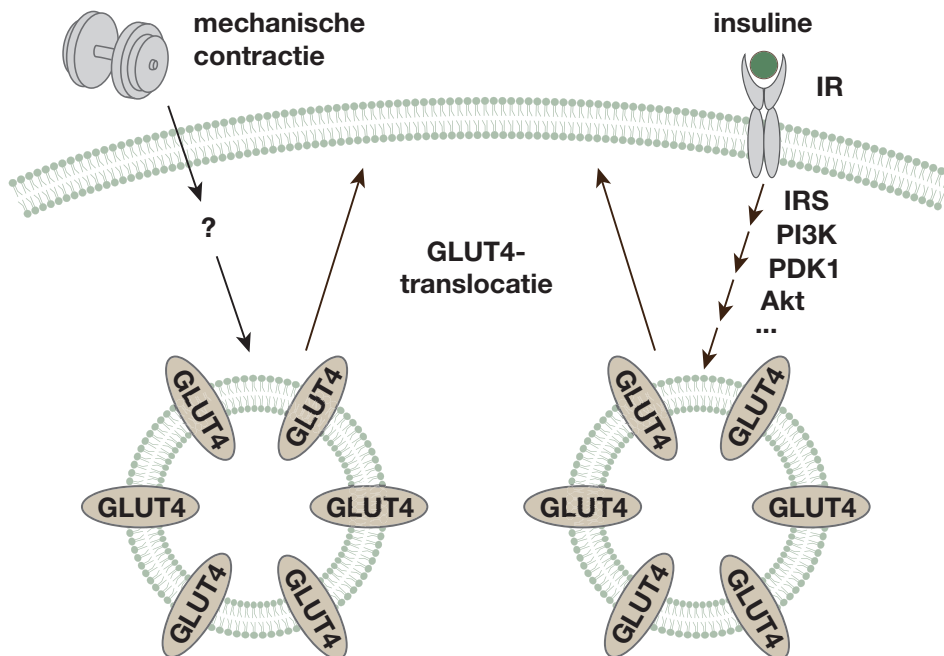


Zoals te zien in bovenstaande vergelijking is de gegenereerde energie beperkt. Er worden slechts twee ATP-moleculen geproduceerd. Het gevormde NADH kan overigens, bij voldoende zuurstof, ook 1.5 ATP vormen per molecuul via de glycerolfosfaatshuttle [40].

De glucose die het substraat vormt voor de glycolyse is direct afkomstig uit de circulatie of wordt aangevoerd vanuit het in de spiervezel opgeslagen glycogeen in de vorm van glucose-6-fosfaat. In dit laatste geval levert de glycolyse drie in plaats van twee moleculen ATP, hetgeen later wordt toegelicht. De glucose wordt opgenomen door de spiervezels door middel van gefaciliteerde diffusie (transportmechanismen worden behandeld in sectie 3.2). Hiervoor brengen spiervezels glucosetransporters tot expressie, namelijk GLUT1 en GLUT4.

GLUT1 wordt gezien als de transporter voor een basale instroom van glucose voor de spiervezels en komt slechts beperkt tot expressie in spiervezels. GLUT4 daarentegen neemt de belangrijkste rol aan voor de instroom van glucose in spiervezels en wordt gereguleerd door zowel insuline als spiercontractie [289]. Zonder stimulans (insuline of spiercontractie) is GLUT4 vrijwel volledig afwezig in het sarcolemma en bevindt het zich intracellulair in lipide vesikels [70]. Doordat de GLUT4 al ligt opgeslagen in deze vesikels kan de cel snel reageren op een stimulans om glucose op te nemen. Bij binding van insuline aan de insulinereceptor wordt een reactiepad geactiveerd dat tot een snelle translocatie van de intracellulaire GLUT4 naar het sarcolemma en de T-tubuli leidt.

Hoe spiercontractie leidt tot translocatie van GLUT4 naar het sarcolemma en de T-tubuli is slecht bekend. De sterke stijging in Ca^{2+} speelt mogelijk een rol, maar ook het actinecytoskelet, stikstofoxidesynthaseactiviteit en de energiesensor AMP-geactiveerde eiwitkinase (AMPK) [383]. Er is tevens gehypothetiseerd dat er twee 'verschillende' soorten GLUT4-opslagplaatsen bestaan. De ene reageert op binding van insuline aan de



Figuur 2.2: GLUT4-translocatie in reactie op mechanische contractie en insuline. Zowel mechanische contractie als activatie van de IR zorgen voor GLUT4-translocatie naar het sarcolemma. Het is gehypothetiseerd dat mechanische contractie en IR-activatie aanspraak doen op verschillende GLUT4-opslagplaatsen. Afkortingen: GLUT4, glucosetransporter 4; insulinerceptor, IR; IRS, insulinerceptorsubstraat; PDK1, 3-fosfoinositide-afhankelijke-eiwitkinase 1; PI3K, fosfatidylinositol-3-kinase.

insulinerceptor en de andere reageert op spiercontractie. Dit verklaart mogelijk waarom er een additief effect van insuline en spiercontractie is op glucoseopname van spierweefsel.

Zodra de glucose is opgenomen wordt deze gefosforyleerd tot glucose-6-fosfaat door een hexokinase. Dit zorgt ervoor dat er een concentratieverschil tussen het intracellulaire milieu van de spiervezel en het interstitiële vocht wordt gehandhaafd. Dit is nodig aangezien de glucosetransporters slechts de diffusie van glucose langs het sarcolemma faciliteren: er vindt geen actief transport tegen een concentratiegradiënt in plaats. Eenmaal gefosforyleerd is de glucose-6-fosfaat 'opgesloten' in de cel. Spiervezels beschikken niet over het enzym (glucose-6-fosfatase) om het molecuul te defosforyleren. De lever beschikt wél over dit enzym en kan zo opgeslagen glucose (in de vorm van glycogeen) weer omzetten in glucose om dit vervolgens aan de circulatie af te geven om andere weefsels te voorzien van deze brandstof.

De vorming van glucose-6-fosfaat kost één molecuul ATP. Dit verklaart het hiervoor genoemde verschil tussen de ATP-opbrengst van glycolyse uit glucose of uit glycogeen. Voor het verkrijgen van glucose-6-fosfaat uit glycogeen wordt geen ATP verbruikt. Vervolgens wordt de glucose-6-fosfaat omgezet naar fructose-6-fosfaat, wat daarna wordt

omgezet naar fructose-1,6-bifosfaat. Ook dit kost wederom één ATP-molecuul. Deze stappen worden daarom ook wel de 'investerende fase' van de glycolyse genoemd: zij kosten energie maar leveren nog niets op.

Nadat de fructose-1,6-bifosfaat is gevormd, wordt deze gesplitst in de twee triosefosfaten glyceraldehyde-3-fosfaat en dihydroxyacetonfosfaat. Deze laatste wordt vervolgens ook omgezet naar glyceraldehyde-3-fosfaat. Resulterende stappen vormen daarna pyruvaat uit glyceraldehyde-3-fosfaat, wat voor elk molecuul twee moleculen ATP oplevert (totaal dus vier). Dit noemt men de herstel- of energieleverende fase. Samengevat worden er dus twee moleculen ATP verbruikt en vier gegenereerd, resulterend in een nettowinst van twee moleculen ATP per glucosemolecuul.

Naast glucose worden de monosachariden fructose en galactose ook benut voor energie door glycolyse. Fructose, onder andere aanwezig in fruit en onderdeel van tafelsuiker (sucrose), wordt door het enzym fructokinase gefosforyleerd tot fructose-1-fosfaat. Aansluitend wordt deze gesplitst door het enzym aldolase tot dihydroxyacetonfosfaat (net als het geval is bij fructose-1,6-bifosfaat) en glycerinaldehyde. Deze laatste wordt vervolgens gefosforyleerd tot glyceraldehyde-3-fosfaat en sluit zo ook aan op de glycolyse.

Galactose, onderdeel van de disacharide lactose die te vinden is in zuivelproducten, wordt eveneens eerst gefosforyleerd op het eerste C-atoom tot galactose-1-fosfaat. Deze reactie wordt gekatalyseerd door galactokinase. Het enzym galactose-1-fosfaat-uridylyltransferase vormt vervolgens, samen met UDP-glucose, glucose-1-fosfaat en UDP-galactose. Aansluitend zet een epimerase de UDP-galactose om in UDP-glucose en fosfoglucomutase zet de glucose-1-fosfaat om in glucose-6-fosfaat, wat daarna dezelfde reacties ondergaat zoals eerder beschreven (de productie van dihydroxyacetonfosfaat en glyceraldehyde-3-fosfaat).

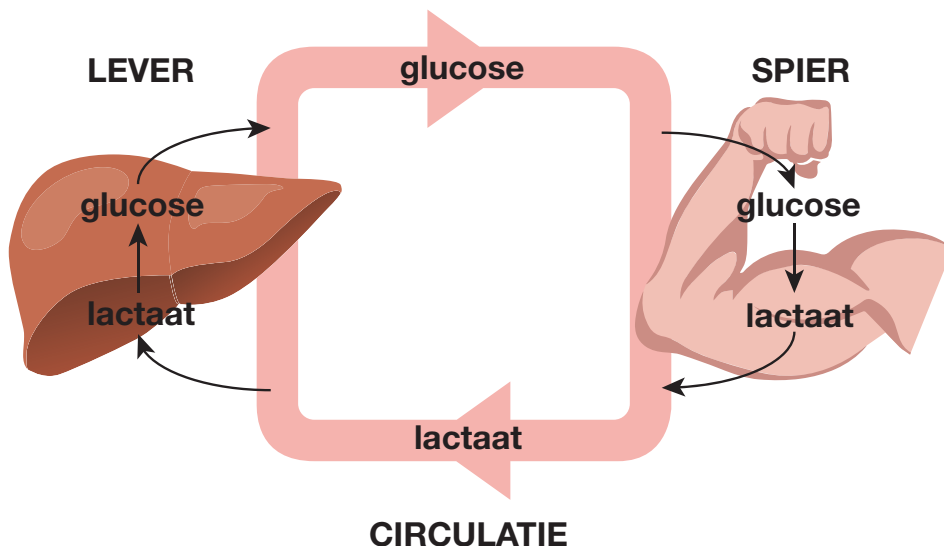
2.3.1 Cori-cyclus

Het eindproduct van de glycolyse, pyruvaat, heeft twee metabole bestemmingen. Bij voldoende zuurstof (aerobe omstandigheden) wordt het pyruvaat getransporteerd naar de mitochondria, waar het verder geoxideerd kan worden om energie te leveren. Echter, bij een zuurstoftekort (anaerobe omstandigheden) zal pyruvaat worden gereduceerd tot lactaat of getransamineerd tot alanine. Hoewel lactaat continu wordt geproduceerd stijgt de productie hiervan aanzienlijk tijdens een intensieve inspanning.

Het enzym lactaatdehydrogenase verzorgt de conversie van pyruvaat naar lactaat, waarbij NADH wordt geoxideerd tot NAD^+ . De reactie is omkeerbaar en levert geen energie. Wel zorgt het ervoor dat er voldoende NAD^+ aanwezig blijft om de glycolyseflux te handhaven (zie de linkerkant van reactie 2.3). Bovendien wordt er een proton geconsumeerd waardoor de vorming van lactaat uit pyruvaat de stijgende protonconcentratie remt, door toedoen van ATP-hydrolyse en glycolyse [384]. Lactaat kan terug converteren naar pyruvaat, dan wel getransporteerd worden via de circulatie naar de lever. In de lever kan het lactaat vervolgens weer omgezet worden naar glucose dat weer terug naar het spierweefsel kan worden getransporteerd. Deze cyclus heet de Cori-cyclus (zie figuur 2.3).

Ook kan bij een lage glycolytische flux het lactaat geoxideerd worden in de mitochondria. Deze oxidatie vindt met name plaats in de oxidatieve type 1-spiervezels, terwijl de productie van lactaat met name plaatsvindt in de glycolytische type 2-spiervezels [166, 67]. Er lijkt dan ook een lactaatuitwisseling plaats te vinden tussen beide types spiervezels. Deze intercellulaire uitwisseling van lactaat vormt onderdeel van de lactaatshuttlehypothese.

Analoog aan de Cori-cyclus bestaat er een zogeheten glucose-alanine-cyclus. Spiercellen beschikken over de capaciteit om de vertakte keten aminozuren (Eng.: *branched-chain amino acids*) te oxideren. Om dit voor elkaar te krijgen vindt er eerst transaminatie plaats van het aminozuur. Hierbij wordt de aminogroep overgedragen aan α -ketoglutaraat. Het α -ketoglutaraat wordt hiermee omgevormd tot glutamaat, en het betreffende aminozuur is veranderd in zijn α -ketozuur die geoxideerd kan worden. Hierna vindt er wederom een transaminatiereactie plaats, waarbij de zojuist verkregen aminogroep van glutamaat wordt overgedragen aan pyruvaat. Het pyruvaat wordt hiermee omgezet in alanine (en het glutamaat vormt weer α -ketoglutaraat). Het gevormde alanine verlaat vervolgens de spiercel en wordt in de lever weer getransamineerd met α -ketoglutaraat om pyruvaat te vormen. Het pyruvaat wordt omgezet tot glucose in de lever, waarna het aan de circulatie wordt afgegeven en kan worden opgenomen door het spierweefsel. Het gevormde glutamaat kan eveneens glutamine vormen, maar de vorming hiervan speelt geen significante rol in het energiemetabolisme.



Figuur 2.3: De Cori-cyclus. Pyruvaat wordt gegenereerd uit glucose als eindproduct van de glycolyse. Wanneer het pyruvaat wordt gereduceerd tot lactaat door het enzym lactaatdehydrogenase kan deze aan de circulatie worden afgegeven waarna het de lever bereikt. In de lever kan het lactaat terug geconverteerd worden naar glucose. Hierna kan de lever het gevormde glucose weer afstaan aan de circulatie zodat de spieren het weer kunnen opnemen. De Cori-cyclus is vernoemd naar Carl Cori en Gerty Cori, het echtpaar dat de cyclus heeft ontdekt.

2.4 Oxidatieve energiesysteem

Zowel het fosfaatenrgiesysteem als de glycolyse hergenereren ATP zonder verbruik van zuurstof. Het oxidatieve energiesysteem, zoals de naam al suggereert, verbruikt echter wel zuurstof. Dit laat een volledige verbranding van de substraten toe, waardoor er meer

energie per substraat geleverd kan worden. Dit betekent echter niet dat het vermogen ook hoger is, deze is lager dan dat van de overige twee energiesystemen (tabel 2.1).

Het oxidatieve energiesysteem kan tevens vetzuren gebruiken als energiebron, in tegenstelling tot de glycolyse. Vetzuren kunnen alleen aeroob verbrand worden. De oxidatieve verbranding van substraten vindt plaats in de mitochondria in plaats van in het cytosol, waar de glycolyse plaatsvindt. Voordat vetzuren verbrand kunnen worden moeten zij eerst gebonden worden aan carnitine om in de mitochondria te komen. Dit transport wordt verzorgd door het mitochondriale carnitinepalmitoyltransferasesysteem, hetgeen de fluxbepalende stap is in de oxidatie van vetzuren [305].

Het oxidatieve energiesysteem kan men opsplitsen in drie stappen. Eerst moet er acetyl-CoA gevormd worden, vervolgens wordt dit de citroenzuurcyclus in geleid en tot slot wordt het grootste gedeelte van de energie vrijgemaakt in de ademhalingsketen.

Voor de eerste stap moet dus acetyl-CoA gegenereerd worden uit het substraat. Voor het glucosemetabolisme komt dit neer op het omzetten van pyruvaat (geleverd door de glycolyse) tot acetyl-CoA door oxidatieve decarboxylatie. Deze stap is onomkeerbaar en tevens wordt er een molecuul NAD^+ gereduceerd tot NADH . Deze levert later in de ademhalingsketen circa 2.5 ATP. Voor vetzuren vindt er eerst β -oxidatie plaats (kader 2.2). Hierbij wordt er in vier stappen een acetyl-CoA-molecuul afgesplitst van de vetzuurketen. Zodoende wordt de vetzuurketen steeds met twee C-atomen ingekort. Naast de generatie van de ingekorte vetzuurketen en een acetyl-CoA-molecuul worden ook NADH en FADH_2 gegenereerd. Het gegenereerde NADH en FADH_2 leveren tezamen uiteindelijk 5 ATP voor iedere ronde β -oxidatie die een vetzuurketen ondergaat.

Kader 2.2



De β -oxidatie heeft zijn naam te danken aan het gegeven dat hierbij het β -C-atoom van de vetzuurketen wordt geoxideerd. Het β -C-atoom is het tweede C-atoom geteld vanaf de functionele groep (de carboxylgroep $[\text{COO}^-]$ waar het CoA aan is gehecht). Hierbij wordt de Griekse naamgeving gevolgd, zo vindt er ook α - en ω -oxidatie plaats (al spelen deze geen noemenswaardige rol bij energiemetabolisme).

In onderstaande afbeelding zijn met pijlen de C-C-bindingen weergegeven van het vetzuur palmitaat die verbroken worden in de β -oxidatie. De β -oxidatie vindt hier 'van rechts naar links' plaats. De twee C-atomen aan de rechterzijde worden als eerst afgesplitst. In totaal ontstaan er door β -oxidatie van dit C16-vetzuur acht C2-eenheden.



Bij α -oxidatie wordt het eerste C-atoom geoxideerd, geteld vanaf de functionele groep, terwijl bij ω -oxidatie (ω is de laatste letter van het Griekse alfabet) het C-atoom wordt geoxideerd dat het verst gelegen is van de functionele groep.

De bekende omega-3-, omega-6- en omega-9-vetzuren hebben hier ook hun naam aan te danken. Zo hebben omega-3-vetzuren hun eerste dubbele binding, geteld vanaf het verst van de carboxylgroep gelegen C-atoom (het ω -C-atoom), op het derde C-atoom. Evenzo hebben omega-6-vetzuren en omega-9-vetzuren de eerste dubbele binding op respectievelijk het zesde en negende C-atoom geteld vanaf het ω -C-atoom.

Het glucose- en vetzuurmetabolisme hebben met elkaar gemeen dat beide het uit twee C-atomen bestaande molecuul acetyl-CoA genereren. Acetyl-CoA vormt dan ook het substraat voor de citroenzuurcyclus (beschreven in sectie 2.4.1), die uiteindelijk de

potentiële energie levert om het gros van het ATP uit een substraat te genereren. Hoewel aminozuren vaak niet als bron van energie worden beschouwd, worden zij gewoon verbruikt voor het leveren van energie. Gezien een mens onder normale omstandigheden netto geen eiwitmassa verliest noch aanzet, staat de inname van de hoeveelheid eiwit die men neemt ongeveer gelijk aan de hoeveelheid eiwit (en zodoende aminozuren) die gebruikt wordt om energie te leveren. Aminozuren kunnen worden omgevormd tot glucose, vetzuren of ketonen, waarna zij energie kunnen leveren op de 'reguliere' wijze. De aminozuren die omgevormd kunnen worden tot glucose zijn glucogene aminozuren, de aminozuren die omgevormd kunnen worden tot vetzuren of ketonen zijn ketogene aminozuren. Sommige aminozuren zijn zowel glucogeen als ketogeen.

Verder kunnen aminozuren ook direct energie leveren doordat sommige aminozuren omgevormd kunnen worden tot pyruvaat en aansluitend tot acetyl-CoA. Voorbeelden hiervan zijn de aminozuren alanine, cysteïne, glycine en serine. Weer andere aminozuren kunnen rechtstreeks intermediaire metabolieten van de citroenzuurcyclus vormen zoals succinyl-CoA. Voorbeelden hiervan zijn isoleucine, methionine en valine.

De citroenzuurcyclus is echter nog niet de eindbestemming. Hoewel de meeste potentiële energie wordt geleverd tijdens de citroenzuurcyclus, wordt er nog nauwelijks ATP gegenereerd. De energie wordt tijdens de citroenzuurcyclus gevangen in een andere vorm dan ATP, namelijk NADH en FADH₂. De meeste ATP wordt pas gegenereerd, met gebruik van deze eerder gevangen energie, in de derde en laatste stap waarin men het oxidatieve energiesysteem kan onderverdelen. Deze laatste stap betreft de oxidatieve fosforylering gemedieerd door het elektronentransport in de zogeheten ademhalingsketen. Tijdens de citroenzuurcyclus worden namelijk veel energierijke elektronenparen gegenereerd die gevangen zijn door de elektronendragers NADH en FADH₂. De ademhalingsketen peutert stukje bij beetje de potentiële energie los waarover deze elektronenparen beschikken, om zo een H⁺-gradiënt langs de binnenste mitochondriale membraan te doen ontstaan. De potentiële energie die nu opgeslagen ligt in dit gradiënt wordt vervolgens gebruikt door ATP-synthase in de binnenste mitochondriale membraan tijdens de terugstroom van de protonen. ATP-synthase fungeert als een soort waterrad waar de protonen langs stromen. De energie die dit levert wordt gebruikt om ADP en P_i terug te vormen tot ATP. Dit gehele proces wordt ook wel de oxidatieve fosforylering genoemd.

2.4.1 Citroenzuurcyclus

De citroenzuurcyclus (zie kader 2.3) is een acht-staps proces waarbij een acetyleenheid volledig geoxideerd wordt tot kooldioxide en water. Gedurende deze acht stappen komt energie vrij die wordt gevangen door de elektronendragers NADH en FADH₂, zoals eerder beschreven. NAD⁺ en FAD vormen dus de elektronenacceptoren voor de citroenzuurcyclus. En hoewel er niet direct ATP gegenereerd wordt tijdens de citroenzuurcyclus, wordt er wel een energierijke fosfaat gegenereerd in de vorm van guanosinetrifosfaat (GTP). Deze wordt vervolgens vrijwel direct gebruikt om ADP te herfosforyleren tot ATP, door het enzym nucleosidedifosfokinase die de volgende reactie katalyseert:



Kader 2.3



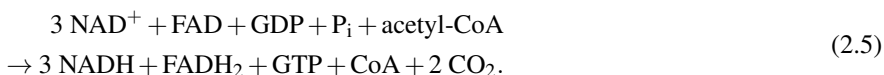
De citroenzuurcyclus wordt ook wel de krebscyclus genoemd, vernoemd naar

de biochemist Hans Krebs. Krebs had, samen met William Johnson, de cyclus ontdekt en won hier de Nobelprijs voor de Fysiologie of Geneeskunde voor. Opmerkelijk genoeg werd Krebs' idee eerst geweigerd bij het zeer prestigieuze wetenschappelijk tijdschrift *Nature* wegens gebrek aan ruimte. Hierna heeft hij zijn werk opnieuw ingestuurd bij het wetenschappelijk tijdschrift *Enzymologia*, waar het vrij snel geaccepteerd werd.

Het is niet noodzakelijk om alle stappen van de citroenzuurcyclus te kennen. De geïnteresseerde lezer kan deze opzoeken in vrijwel ieder biochemieboek. Deze sectie zal zich met name richten op de essentie van de citroenzuurcyclus.

Het is belangrijk om te beseffen dat de citroenzuurcyclus centraal staat in het oxidatieve energiemetabolisme van alle drie de macronutriënten. Vetzuren, koolhydraten en aminozuren kunnen alle dienen om via deze weg energie te leveren, doordat zij het algemene substraat van de citroenzuurcyclus kunnen vormen (acetyl-CoA).

De nettoreactie van de citroenzuurcyclus is als volgt:



Naast de acetyleenheid zijn ook de energiedragers NAD, FAD en GDP benodigd. Voor deze laatste is ook P_i benodigd om het GDP te kunnen fosforileren tot het energierijke fosfaat GTP. De meeste energie wordt uiteindelijk gedragen door de nucleotidecofactoren NAD en FAD. De energie die hiermee wordt opgeslagen komt later vrij in de ademhalingsketen en wordt gebruikt om ATP te vormen. Het dient ook opgemerkt te worden dat er nog géén zuurstof wordt verbruikt in de citroenzuurcyclus. Dit gebeurt pas later in de ademhalingsketen (zie sectie 2.4.2). Desalniettemin is zuurstof benodigd om de citroenzuurcyclus gaande te houden, omdat anders de geoxideerde vorm van de benodigde nucleotidecofactoren snel uitgeput raakt.

Kader 2.4



Hoewel er volledige oxidatie plaatsvindt van de acetyleenheid in de citroenzuurcyclus, gebeurt dit volledig in de afwezigheid van zuurstof. De benaming oxidatie kan soms verwarrend werken, omdat deze de aanwezigheid van zuurstof lijkt te impliceren. Dit hoeft echter niet altijd het geval te zijn. Naast het verkrijgen van zuurstof door een molecuul is ieder verlies van elektronen of waterstof ook een vorm van oxidatie. Anderzijds is het verlies van zuurstof of het verkrijgen van elektronen of waterstof door een molecuul een vorm van reductie.

Oxidatie kan niet plaatsvinden zonder dat er gelijktijdig reductie van een ander molecuul plaatsvindt. Wanneer de acetyleenheid wordt geoxideerd in de citroenzuurcyclus, vindt er reductie plaats van de nucleotidecofactoren NAD^+ en FAD. De gereduceerde vorm hiervan is respectievelijk NADH en FADH_2 .

De potentiële energie die opgeslagen ligt in de geproduceerde NADH en FADH_2 wordt in de ademhalingsketen gebruikt om ATP te hergenereren uit ADP. Ieder NADH-molecuul beschikt over de potentiële energie om ongeveer 2.5 ATP te hergenereren en ieder FADH_2 -molecuul om ongeveer 1.5 ATP te hergenereren. Eén volledige cyclus levert 3 NADH, 1 FADH_2 en 1 GTP. Dit geeft in totaal 7.5 ATP voor de 3 NADH-moleculen, 1.5 ATP voor het FADH_2 -molecuul, en 1 ATP voor het GTP-molecuul. Bij elkaar opgeteld dus 10 ATP voor één acetyleenheid.

Bedenk echter dat glucose opsplijt in twee pyruvaatmoleculen, waardoor de cyclus dus per glucosemolecuul tweemaal doorlopen wordt. Dit geeft een totaal van 20 ATP. Bovendien levert de oxidatieve decarboxylatie van pyruvaat tot acetyl-CoA 2.5 ATP, zoals eerder beschreven. Ook dit gebeurt tweemaal per glucosemolecuul, wat een totaal maakt van 5 ATP.

Naast de 2 ATP die gegenereerd wordt gedurende de glycolyse, worden er ook twee moleculen NAD^+ gereduceerd tot NADH (zie reactie 2.3). Deze twee moleculen beschikken niet over de potentiële energie voor 2.5 ATP, maar 1.5 ATP per molecuul. De NADH wordt namelijk gegenereerd in het cytosol, waar de glycolyse plaatsvindt, en niet in de mitochondria. De energie van de NADH in het cytosol kan wel worden overgedragen naar de mitochondriale ademhalingsketen, maar de kosten voor dit transport bedragen 1 ATP.

Als we alles bij elkaar optellen, dan levert volledige verbranding van 1 glucosemolecuul dus 30 ATP. Dit is schril contrast met de slechts 2 ATP die gegenereerd worden met de onvolledige (anaerobe) verbranding hiervan.

Kader 2.5



Veel leerboeken vermelden een totale opbrengst van 36 of 38 ATP-moleculen in plaats van 30 voor de volledige verbranding van een molecuul glucose. Hoewel dit theoretisch het geval is, valt dit getal in de praktijk wat lager uit. De geschatte hoeveelheden ATP die gegenereerd worden uit de potentiële energie van de NADH en FADH_2 zoals beschreven in de tekst, benaderen de behaalde opbrengst in de praktijk beter. Een groot gedeelte van de opgeleverde energie wordt namelijk benut voor het transport van ATP uit de mitochondriale matrix naar het cytosol. Dit transport wordt verzorgd door de antiporter ATP-ADP-translocase, die de ATP inwisselt voor ADP uit het cytosol.

2.4.2 Ademhalingsketen

De ademhalingsketen, ook wel de elektronentransportketen genoemd, bestaat uit enkele eiwitten gelegen in de binnenste mitochondriale membraan die de potentiële energie van de energiedragers uiteindelijk omzetten in ATP. Hierbij worden de energierijke elektronenparen van NADH en FADH_2 langs deze eiwitten in de binnenste mitochondriale membraan geleid door opeenvolgende redoxreacties. NADH en FADH_2 worden in dit proces geoxideerd, waardoor zij weer energierijke elektronenparen kunnen 'opvangen' vanuit de citroenzuurcyclus.

Tijdens de geleiding van de energierijke elektronenparen langs de eiwitten van de ademhalingsketen wordt steeds een beetje energie uit de elektronenparen geput om protonen vanuit de mitochondriale matrix naar de intermembranaire ruimte (de ruimte tussen de binnenste en buitenste mitochondriale membraan) te pompen. Aan het einde van de rit, wanneer alle energie uit de elektronenparen is geput, worden de elektronenparen gebruikt om zuurstof te reduceren tot water. Door het pompen van protonen vanuit de mitochondriale matrix naar de intermembranaire ruimte, ontstaat een elektrochemisch gradiënt. De protonen in de intermembranaire ruimte hebben hierdoor de neiging om terug te stromen naar de mitochondriale matrix. Dit doen zij door aparte kanalen in de binnenste mitochondriale membraan, die zijn ingericht om de energie die hierbij vrijkomt te benutten om ATP te synthetiseren. De kanalen zijn hiervoor gekoppeld aan het enzym ATP-synthase, die deze energie benut om ADP en P_i om te zetten naar ATP. Het ATP kan vervolgens uitgewisseld worden voor ADP door ATP-ADP-translocase, zodat het in het cytosol terecht kan komen.

Een gedeelte van het gegenereerde ATP wordt echter ook gebruikt om in de mitochondria creatine te fosforyleren tot creatinefosfaat. Het creatinefosfaat diffundeert vervolgens naar het cytosol, waar het gebruikt kan worden om ter plekke ADP te herfosforyleren tot ATP, gekatalyseerd door creatinekinase (zie reactie 2.2). Dit wordt het creatinefosfaat-shuttlesysteem genoemd. Dit systeem zal vooral een rol spelen in spiervezels tijdens energie-eisende omstandigheden, zoals maximale contractie.

Ook wordt een gedeelte van de energie afkomstig van het protonengradiënt benut om ADP naar de mitochondriale matrix te transporteren en ATP naar de intermembranaire ruimte.

Tot slot gaat een gedeelte van de energie uit het protonengradiënt verloren aan de productie van warmte door 'lekkage' in de binnenste membraan. Door deze lekkage stromen protonen terug zonder dat de hierbij vrijkomende energie wordt gekoppeld aan ATP-synthese. Deze ont koppeling is het gevolg van ont koppelingseiwitten (Eng.: *uncoupling proteins*) die aanwezig zijn in de binnenste mitochondriale membraan. Het middel 2,4-dinitrofenol (DNP) ont koppelt ook de ademhalingsketen en werd vroeger gebruikt om vetverlies te bevorderen (zie kader 2.6).

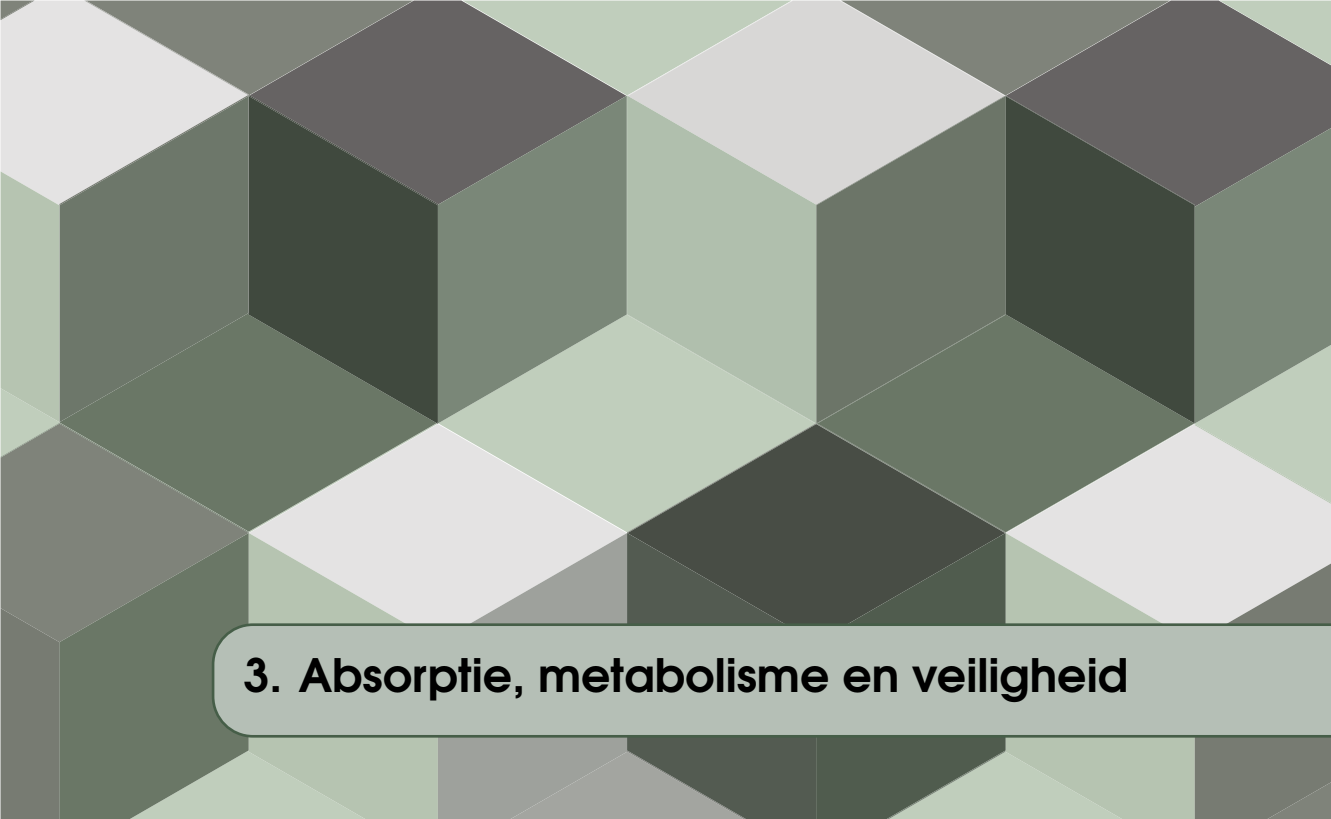
Kader 2.6



In 1933 publiceerden Tainter e.a. klinische resultaten van het middel 2,4-dinitrofenol (DNP, Eng.: *2,4-dinitrophenol*) voor de behandeling van obesitas [436]. De resultaten waren verbluffend en al snel was het middel zonder recept te verkrijgen in de Verenigde Staten. Makkelijk te behalen gewichtsverlies door het slikken van een pil: het klonk te mooi om waar te zijn. En dat was het ook. In 1938 werd het middel in de Verenigde Staten verboden doordat het zeer gevaarlijke bijwerkingen bleek te hebben, zoals hoge koorts (hyperthermie), verhoogde hartslag (tachycardie), overmatig zweten (hyperhidrose), versnelde ademhaling (tachypnoe), cataract, en in sommige gevallen overlijden van de gebruiker.

DNP is werkzaam doordat het de ademhalingsketen ont koppelt, waardoor er warmte wordt geproduceerd in plaats van ATP. Het remt de opname van P_i door de mitochondria (benodigd voor de synthese van ATP uit ADP en P_i door ATP-synthase) en bevordert het 'lekker' van protonen naar de mitochondriale matrix als ionofoor.

Het middel is nog te vinden in het illegale circuit en wordt sporadisch toegepast door bodybuilders en mensen die trachten snel af te vallen.



3. Absorptie, metabolisme en veiligheid

3.1 Inleiding

Een supplement is pas werkzaam als het op zijn plaats van bestemming is aangekomen. Een voedingssupplement wordt oraal, oftewel via de mond, ingenomen. Vervolgens wordt het supplement door het maag-darmstelsel opgenomen en wordt het, doorgaans, door de bloedcirculatie naar zijn plaats van bestemming gebracht. Zodra het op zijn plaats van bestemming is aangekomen kan het een effect teweeg brengen.

Tijdens deze reis naar de plaats van bestemming kan een supplement onderhevig zijn aan metabolisatie. Onder metabolisatie wordt biotransformatie (chemische omzetting) van het oorspronkelijke molecuul naar een ander molecuul (een metaboliet) verstaan. Een metaboliet van het ingenomen supplement heeft doorgaans andere effecten op het lichaam dan het oorspronkelijke molecuul. In sommige gevallen heeft het oorspronkelijke molecuul geen werking, en berust de werking van het supplement op biotransformatie van het molecuul naar een actief metaboliet: bio-activatie. In andere gevallen is de werking van een metaboliet vergelijkbaar met die van het oorspronkelijke molecuul. In de meeste gevallen leidt biotransformatie echter tot deactivatie, waardoor het zijn werking verliest en de uitscheiding van het molecuul door het lichaam wordt bevorderd.

In dit hoofdstuk zullen enkele concepten die centraal staan in de absorptie en het metabolisme van supplementen worden uitgelicht. De absorptie en het metabolisme zijn immers fundamenteel voor de uiteindelijke fysiologische werking van een supplement. Naast deze beoogde werking zijn zij ook van cruciaal belang voor eventuele bijwerkingen die kunnen voortvloeien uit supplementgebruik. Aan het einde van dit hoofdstuk wordt dan ook kort het aspect veiligheid van voedingssupplementen aangestipt.

3.2 Absorptie

Zoals eerder vermeld worden de meeste supplementen oraal genomen. Het supplement bereikt dus als eerste de mond. In de context van normale voeding, zoals rijst, brood of vlees, speelt de mond geen directe rol in de absorptie van deze middelen. De mond dient dan vooral als maal- en keurmachine. Het malen zorgt ervoor dat het oppervlak van de ingenomen voeding flink wordt vergroot, wat later een bevorderende werking heeft voor de absorptie. Bovendien speelt de smaakbeleving in combinatie met het reukvermogen een belangrijke rol: bedorven voedingswaren worden zo al snel vermeden. Echter, de meeste supplementen zijn bijna altijd beschikbaar in capsule-, tablet, poeder- of kant-en-klare vloeibare vorm. In geen enkel geval speelt het malen een belangrijke rol, en de smaakbeleving wordt doorgaans gestimuleerd door de toevoeging van smaakstoffen wanneer het zich in poeder of kant-en-klare vloeibare vorm bevindt.

Vanuit de mond belandt het supplement in de maag. De maagwand is opgebouwd uit spierlagen die in verschillende richtingen lopen. Deze spierlagen mengen de maaginhoud. Bovendien heerst in de maag een bijzonder zuur milieu en bevat de maag het eiwitsplitsende enzym pepsine. Dit leidt tot snelle denaturatie (het ontvouwen van de ruimtelijke structuur) en afbraak van eiwitten tot kleinere peptiden.

Door het zure milieu van de maag kan er soms al spontane degradatie, dat wil zeggen niet-enzym-gekatalyseerde degradatie, van het supplement optreden. Om die reden wordt soms aangeraden om bepaalde supplementen op een lege maag in te nemen. Wanneer een supplement wordt ingenomen op een lege maag verkort dit de verblijftijd hierin. Deze korte verblijftijd kan de biologische beschikbaarheid bevorderen.

De maag speelt doorgaans geen noemenswaardige rol bij de directe absorptie van voedingsstoffen. Slechts weinig middelen worden significant geabsorbeerd door de maagwand. Uitzonderingen zijn bijvoorbeeld alcohol en cafeïne. Zo wordt van cafeïne circa zo'n 20% opgenomen door de maag [96].

Kader 3.1



Het supplement Kre-Alkalyn[®], een creatinevariant, bevat natriumcarbonaat om in te spelen op het gegeven dat sommige supplementen voor een flink deel al gedegradeerd worden in het zure milieu van de maag. Zo zou creatine degraderen tot het nutteloze creatinine bij lage pH-waarden. In het zure milieu van de maag reageert het natriumcarbonaat dat Kre-Alkalyn[®] bevat met de waterstofionen. Dit leidt tot de vorming van natriumionen, water (H₂O) en kooldioxide (CO₂). Resultierend geeft dit een lichte verhoging van de pH-waarde in de maag.

Het is echter een mythe dat creatine significante degradatie ondergaat bij lage pH-waarden. De halfwaardetijd van creatine naar creatinine bedraagt 55 dagen bij een pH-waarde van 1.4, 7.5 dagen bij een pH-waarde van 3.7, en 40.5 dagen bij een pH-waarde van 6.8 [350]. Gezien de verblijftijd in de maag een fractie van de halfwaardetijd bedraagt, en de langste halfwaardetijd nota bene bij een pH-waarde van 1.4 werd gemeten, is het beschermen van creatine tegen lage pH-waarden zinloos.

Vanuit de maag belandt een supplement in de dunne darm. Het eerste gedeelte van de dunne darm heet de twaalfvingerige darm (ook wel duodenum genoemd). De alvleesklier zorgt ervoor dat de lage pH-waarde van het uit de maag gearriveerde mengsel (chymus), wordt geneutraliseerd door toevoeging van waterstofcarbonaat. Daarnaast scheidt de alvleesklier verscheidene zymogenen uit. Deze zymogenen zijn de voorlopers van actieve

enzymen (peptidasen), die peptideketens verder kunnen afbreken tot vrije aminozuren, di- en tripeptiden. Ook wordt er hier gal toegevoegd. Het gal zorgt voor emulgering van lipiden, waardoor zeer veel kleine lipidedruppeltjes ontstaan. Dit zorgt voor een grote stijging van het oppervlak, waar lipasen – enzymen die vetten splitsen in losse vetzuren – op in kunnen werken en zo de absorptie ervan bevorderen. Ook worden kleine lipofiele moleculen beter geabsorbeerd door de darmwand door toevoeging van galzouten.

De dunne darm beschikt over een enorm oppervlak om absorptie te bevorderen. Dit grote oppervlak komt tot stand doordat de dunne darm enkele meters lang is en, nog belangrijker, de darmwand sterk geplooid is. De cellen van de darmwand zijn in karakteristieke vingerachtige vormen (villi) geordend. Bovendien bevat de celmembraan van enterocyten aan de apicale zijde (de zijde gericht naar de binnenzijde van de darm) eveneens vingerachtige vormen (microvilli), die het oppervlak verder vergroten.

De enterocyten, de cellen die de binnenwand van de dunne darm bekleeden, zijn verantwoordelijk voor de absorptie van moleculen. Verschillende transportmechanismen spelen hierbij een rol, die kunnen worden verdeeld in twee groepen: paracellulair transport en transcellulair transport.

Paracellulair transport betekent dat het molecuul tussen de enterocyten door wordt opgenomen. Tussen de enterocyten bevinden zich namelijk zeer kleine ruimtes: zonula occludens (Eng.: *tight junctions*). In principe vinden alleen kleine moleculen hun weg tussen de enterocyten door. Bovendien is het oppervlak van deze ruimte een fractie van het oppervlak die de membranen van de enterocyten vormen, waardoor deze weg doorgaans geen rol van betekenis heeft bij de absorptie van een supplement dat ook transcellulair wordt opgenomen.

Bij transcellulair transport passeert het molecuul de membraan van de enterocyt. Eerst vindt het transport plaats langs de apicale membraan (de membraan gericht naar de binnenzijde van de darm). Vervolgens beweegt het zich door de cel naar de andere zijde, waar het de membraan passeert en terechtkomt in het interstitiële vocht en de bloedvaten die leiden richting de lever. Het transport langs de membraan kan zowel actief als passief plaatsvinden. Actief transport vereist energie die de cel moet leveren, terwijl passief transport kan plaatsvinden zonder dat de cel hier energie voor hoeft te leveren.

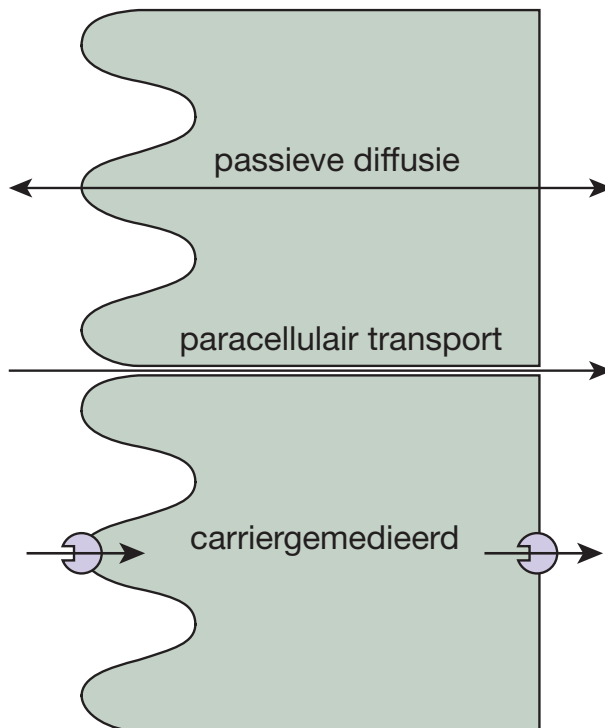
Tot slot kunnen resten in de dikke darm belanden. De dikke darm is vooral belangrijk voor waterabsorptie en het verteren van resten koolhydraten (met name voedingsvezel en resistente koolhydraten) die de dunne darm zijn ontsnapt. In de dikke darm bevinden zich veel bacteriën die deze restproducten verder kunnen verteren. Uit de bacteriële vertering van koolhydraten ontstaan onder meer korteketenvezuren. Deze worden vervolgens geabsorbeerd door het darmepitheel en kunnen dan benut worden om energie te leveren. De rol van de dikke darm is bijzonder beperkt in de context van voedingssupplementen. Een uitzondering vormt hydroxypropyldizetmeelfosfaat (zie kader 3.2).

Kader 3.2



Hydroxypropyldizetmeelfosfaat (HDP, Eng.: *hydroxypropyl-distarch phosphate*) wordt toegevoegd aan voedingsmiddelen als verdikkings- of bindmiddel en is een resistent soort zetmeel. Het wordt nauwelijks verteerd in de dunne darm. In de dikke darm wordt het gedeeltelijk gefermenteerd tot korteketenvezuren door bacteriën, een deel hiervan wordt gebruikt door deze residente bacteriën en de rest wordt geabsorbeerd door de darmwand. Klinisch onderzoek wijst uit dat HDP sterk het energieverbruik verhoogt na inname ten opzichte van een normaal soort koolhydraat (waxy maize) [416]. Ook zou het

goed verzadigen. Om deze redenen worden enkele voedingssupplementen verkocht die HDP bevatten om te helpen bij het verliezen van lichaamsvet.



Figuur 3.1: Verschillende vormen van transport. Zie tekst voor toelichting.

3.2.1 Passief transport

Bij passief transport vindt er transport langs de membraan plaats zonder dat het de cel chemische energie kost. Het transport wordt gedreven door het concentratiegradiënt van het betreffende molecuul. Dit betekent dat een stof zich bij passief transport altijd netto beweegt van de plaats met een hoge concentratie naar de plaats met een lage concentratie van de stof. Derhalve vindt passief transport nooit plaats tegen het concentratiegradiënt in.

Passief transport kan op twee manieren plaatsvinden. De simpelste manier is middels diffusie, waarbij de stof vrij diffundeert door de fosfolipidendubbellaag. Sommige stoffen beschikken echter niet over de fysisch-chemische eigenschappen om vrij langs de fosfolipidendubbellaag van de celmembraan te diffunderen, zoals glucose. Voor een aantal van deze stoffen bestaan transporters in de celmembraan die toch diffusie mogelijk maken. Wanneer er gebruik wordt gemaakt van zo'n transporter om langs de membraan te diffunderen, heet dit gefaciliteerde diffusie.

Passief transport middels diffusie kan beschreven worden door de eerste diffusiewet

van Fick. De eerste diffusiewet van Fick wordt beschreven met:

$$I_D = D_m \cdot \frac{\Delta C \cdot O}{d_x} \text{ mol/s.} \quad (3.1)$$

Aan de linkerzijde staat de diffusiestroom (I_d) geschreven (hoeveelheid moleculen die per seconde langs de membraan diffunderen [in mol/s]). Aan de rechterzijde van de vergelijking vindt men D_m , de membraandiffusiecoëfficiënt (in cm^2/s); ΔC , het concentratieverschil tussen beide zijden (in mol/cm^3); O , het membraanoppervlak (in cm^2); en d_x , de membraandikte (in cm).

Het membraanoppervlak O en de membraandikte d_x spreken voor zich. Des te groter het membraanoppervlak waarlangs de moleculen kunnen diffunderen, des te sneller zal de diffusiestroom I_d zijn. En des te dikker de membraan waarlangs het moet diffunderen, des te trager de diffusie verloopt.

De membraandiffusiecoëfficiënt D_m verdient enige toelichting. Deze is afhankelijk van verschillende factoren en is sterk afhankelijk van het soort molecuul waar het om gaat. D_m wordt bepaald door de temperatuur, molecuulmassa, viscositeit ('stropigheid' van de vloeistof waarin het molecuul is opgelost), en permeabiliteit van de membraan voor het molecuul. Een groot molecuul diffundeert moeilijker langs de membraan dan een klein molecuul. Evenzo diffundeert een geladen molecuul moeilijker langs de membraan dan een ongeladen molecuul. Gezien de celmembraan bestaat uit een fosfolipidendubbellaag, moet het molecuul ook beschikken over enige lipofiliteit om de membraan te kunnen passeren. De membraan is vrijwel niet permeabel (doorgankelijk) voor zuiver hydrofiele stoffen, tenzij hier speciale transporters voor aanwezig zijn in de membraan. Wanneer deze transporters louter diffusie in de hand werken en geen chemische energie noch direct noch indirect gebruiken, dan betreft het gefaciliteerde diffusie. Gefaciliteerde diffusie verloopt echter niet volgens de eerste diffusiewet van Fick, maar is te beschrijven volgens vergelijking 3.2 zoals beschreven in sectie 3.2.2.

3.2.2 Actief transport

Actief transport onderscheidt zich van passief transport doordat de cel energie moet leveren om het transport te laten plaatsvinden. Bij passief transport is de energie afkomstig uit het concentratiegradiënt en volgt de netto moleculenstroom het gradiënt van een hoge concentratie naar een lage. Echter, bij actief transport kunnen er moleculen tegen het concentratiegradiënt in worden getransporteerd. Dit vereist energie dat niet uit het concentratiegradiënt geput kan worden. Bij actief transport vindt er dus transport plaats van een lage concentratie naar een hoge, het tegenovergestelde van passief transport.

Hoewel het geen vereiste is dat er transport van een lage naar een hoge concentratie plaatsvindt bij actief transport, is dit wel vaak de stroomrichting die men in de praktijk treft. Immers gaat een cel niet zomaar zijn energie verspillen. Een voorbeeld van een uitzondering vormen de natrium/glucose-cotransporters aanwezig in enterocyten van de dunne darm en nefronen van de nieren. Het is belangrijk om zoveel mogelijk glucose op te nemen uit de darmen om te voorkomen dat er energie verloren gaat doordat deze niet wordt geabsorbeerd. De energie die benodigd is voor het actieve transport valt in het niet bij de energie die het getransporteerde glucosemolecuul uiteindelijk kan gaan leveren. Eveneens is het belangrijk om geen glucose, en dus energie, kwijt te raken in de urine. Bovendien zou het ontbreken van glucosereabsorptie door de nefronen leiden tot meer vochtverlies van het lichaam als gevolg van het osmotisch gradiënt die glucosemoleculen in het filtraat veroorzaken.

Actief transport vindt plaats doordat de transporter (een membraaneiwit) een reactie die energie levert koppelt aan het transport van een molecuul. Deze energie is vrijwel altijd afkomstig uit de energiedrager ATP. Een bekend voorbeeld is de natriumkaliumpomp die de lage intracellulaire concentratie van natrium en de hoge intracellulaire concentratie van kalium waarborgt. De natriumkaliumpomp transporteert natrium uit de cel en kalium in de cel, beide tegen een concentratiegradiënt in. Dit transport wordt hierbij gekoppeld aan de energieleverende reactie van ATP-hydrolyse.

Ook kan een transporter indirect zijn energie halen uit ATP-hydrolyse. In veel gevallen wordt het transport van twee moleculen aan elkaar gekoppeld. Hierbij levert één van de moleculen de benodigde energie voor het actieve transport van het andere molecuul, doordat het zijn concentratiegradiënt volgt. Zo is er intracellulair een zeer lage concentratie van natrium aanwezig ten opzichte van extracellulair (buiten de cel). De stroom van natrium langs zijn concentratiegradiënt, i.e. van extracellulair naar het cytoplasma, kan dan worden gekoppeld aan het actief transport van een ander molecuul tegen zijn concentratiegradiënt in, om hiervoor de energie te leveren. De energie is in dit geval afkomstig uit het concentratiegradiënt van natrium. Dit concentratiegradiënt wordt op zijn beurt weer gehandhaafd door transporters die actief natrium de cel uitpompen, zoals de eerder genoemde natriumkaliumpomp, die de energie afkomstig van ATP-hydrolyse koppelt aan het transport van natrium uit de cel. Indirect wordt zo de energie afkomstig van ATP-hydrolyse gekoppeld aan actief transport van een molecuul. Dit wordt ook wel secundair actief transport genoemd.

Wanneer het transport van een molecuul langs de membraan gemedieerd wordt door een transporter, heet dit carriergemedieerd transport. De snelheid waarmee dit transport plaatsvindt wordt gelimiteerd door de transportcapaciteit van de betreffende transportereiwitten. Dit transport kan beschreven worden met de volgende vergelijking:

$$I_a = \frac{T_{\max} \cdot C}{K_d + C} \quad (3.2)$$

Aan de linkerzijde staat de actieve transportstroom (I_a) geschreven (de hoeveelheid moleculen die per seconde langs de membraan getransporteerd wordt). Aan de rechterzijde van de vergelijking staan de maximale transportcapaciteit van het transportereiwitsysteem $T_{\max}$, de concentratie C van het te transporteren molecuul, en de dissociatieconstante van het transportereiwit-molecuulcomplex K_d (uitgedrukt als concentratie).

Wanneer C gelijk is aan K_d is de halfmaximale snelheid bereikt waarmee het transportereiwitsysteem het molecuul kan transporten, i.e. $0.5 \cdot T_{\max}$.

Dit brengt ons tot enkele belangrijke verschillen tussen een passieve diffusiestroom van een molecuul langs een membraan en een carriergemedieerde stroom. In het geval van een passieve diffusiestroom is de stroom evenredig met het concentratieverschil ΔC tussen beide zijden. Bij een carriergemedieerde stroom zal deze slechts binnen een beperkte bandwijde ongeveer evenredig lopen met C . Wanneer de concentratie een stuk hoger is dan K_d verloopt het transport ongeveer even snel als $T_{\max}$. Het transport is hierdoor gelimiteerd, oftewel: het transportsysteem kan verzadigd worden, waardoor het transport niet sneller verloopt vanaf een bepaalde concentratie. Het is voor te stellen dat vanaf een bepaalde concentratie (vrijwel) alle transportereiwitten bezig zijn met het transporteren van een molecuul langs de membraan, waardoor een hogere concentratie hier verder geen invloed op heeft.

De $T_{\max}$ van een transportereiwitsysteem kan gereguleerd worden door de cel, zoals het geval is met de GLUT-familie die glucosetransport langs de membraan toelaat. Insuline

zorgt voor translocatie van meer GLUT4 naar de membraan van een cel, waardoor $T_{\max}$ stijgt; een vorm van up-regulatie. Analoot hieraan kunnen er transporters van de membraan verwijderd worden (down-regulatie). Ook kunnen er post-translationele modificaties, zoals fosforylering, plaatsvinden aan de transportereiwitten die K_d beïnvloeden. De boodschap is alleszins dat carriergemedieerd transport op meerdere manieren actief gereguleerd kan worden door de cel, en dat deze verzadigd kan raken vanaf een bepaalde concentratie waardoor transport niet sneller verloopt (in tegenstelling tot passieve diffusie waarbij het transport evenredig loopt met de concentratie).

Hoewel carriergemedieerd transport hier wordt behandeld onder actief transport, kan carriergemedieerd transport ook prima passief transport faciliteren. Dit wordt gefaciliteerde diffusie genoemd (zoals eerder aangehaald in sectie 3.2.1). Het wordt echter hier behandeld omdat actief transport altijd carriergemedieerd is en carriergemedieerd transport dezelfde kinetische kenmerken heeft ongeacht of het passief of actief verloopt.

3.3 Metabolisme

Direct nadat een molecuul oraal is ingenomen kan er al metabolisme plaatsvinden. Dat wil zeggen dat er biotransformatie kan plaatsvinden van het molecuul. Biotransformatie zorgt ervoor dat een ander molecuul (of moleculen) wordt gevormd. Dit wordt verzorgd door enzymen die zich bevinden in het lichaam.

Bij voedingssupplementen loopt het doel van metabolisme van moleculen door het lichaam uiteen. Zo kan het doel zijn om het molecuul in een geschikte vorm te krijgen om er gebruik van te maken, zoals het opknippen van polysachariden naar monosachariden, of om door chemisch modifieren een biologisch actief metaboliet te leveren (bio-activatie). Ook kan het doel zijn om het molecuul onschadelijk te maken en excretie hiervan te bevorderen, zodat deze niet opstapelt in het organisme en geen schade kan berokkenen. (Al speelt dit vooral een rol bij medicijnen en xenobiotica. Veel voedingssupplementen zijn al hydrofiel en kunnen vaak zonder verdere biotransformatie makkelijk uitgescheiden worden). Dit laatste wordt doorgaans onderverdeeld in fase I- en fase II-metabolisme. Samen zorgen deze fases er in de regel voor dat het molecuul beter wateroplosbaar (polairder) wordt. Hierdoor kan het makkelijker worden uitgescheiden door de nieren in de urine.

Het fase I-metabolisme stoomt het molecuul klaar voor het fase II-metabolisme (al hoeft fase II-metabolisme zeker niet altijd plaats te vinden na fase I-metabolisme). Dit doet het door een functionele groep zoals een hydroxylgroep (-OH), thiolgroep (-SH), aminegroep (-NH₂) of formylgroep (-CHO) te vormen. Enkele typen reacties die het lichaam hiervoor katalyseert zijn oxidatie, reductie, hydrolyse, hydroxylering, desulfering, deanimering, dehydrogenering en dealkylering.

Aansluitend op het fase I-metabolisme kunnen er polaire groepen geconjugueerd worden aan het molecuul (fase II-metabolisme). Centraal hierbij zijn onder andere sulfatering en glucuronidering, waarbij respectievelijk een sulfaatgroep en een glucuronzuur geconjugueerd worden aan het molecuul. Ook acetylering, methylering en koppeling aan een aminozuur vinden plaats.

Om dit proces te illustreren kunnen we kijken naar het metabolisme van vitamine D, dat doorgaans wordt gesuppleerd in de vorm van cholecalciferol (vitamine D₃). Vitamine D₃ is vrij apolair/lipofiel en wordt middels passieve diffusie geabsorbeerd door de enterocyten in de dunne darm (en ook door cholesteroltransporters [375]). In de enterocyten wordt een groot gedeelte van het vitamine D₃ vervolgens in chylomicronen verpakt met andere

lipiden, waarna het via het lymfesysteem in de circulatie terechtkomt en de verschillende weefsels bereikt. Vitamine D₃ kent zelf echter geen biologische activiteit. Het molecuul moet eerst omgezet worden (biotransformatie) naar een actief molecuul (bio-activatie). Hiertoe vindt er eerst hydroxylering (toevoeging van een hydroxylgroep [-OH]) plaats op het 25ste C-atoom. Deze reactie vindt plaats in de lever en resulteert in 25-hydroxyvitamine D (25[OH]D). Vervolgens vindt er nogmaals hydroxylering plaats op het eerste C-atoom (dit gebeurt met name in de nieren) wat 1,25-dihydroxyvitamine D, ook wel 1,25(OH)₂D, geeft. 1,25(OH)₂D is het biologisch actieve molecuul.

De afbraak van 25(OH)D en 1,25(OH)₂D vindt met name plaats door hydroxylering op positie C-24. Het product van deze reactie, calcitroïsch zuur in het geval van 1,25(OH)₂D, is al goed wateroplosbaar. Hierdoor kan het makkelijk uitgescheiden worden in de urine door de nieren. Ook kan er glucuronidering plaatsvinden van 1,25(OH)₂D [198]. Dit metaboliet kan worden uitgescheiden in het gal, waarna er in de dunne arm weer reabsorptie kan plaatsvinden (enterohepatische cyclus).

3.4 Veiligheid

Voedingssupplementen ondergaan niet dezelfde (streng) uitgevoerde klinische studies als geneesmiddelen. Dit heeft als gevolg dat van met name de wat nieuwere voedingssupplementen weinig klinische data beschikbaar is. Hierdoor is het vaak moeilijk om goed gefundeerde conclusies te trekken over de veiligheid van inname. Behalve dat de klinische studies van voedingssupplementen vaak zijn uitgevoerd met weinig proefpersonen, wordt doorgaans ook vrij beperkt gezocht naar bijwerkingen of schadelijke effecten. Het budget van dergelijke studies is immers meestal ook vrij beperkt. Doordat er doorgaans weinig onderzoek is naar de veiligheid van voedingssupplementen, krijgt het in het algemeen ook minder aandacht. Dit terwijl veiligheid vanzelfsprekend een belangrijk aspect is in de beslissing om iets wel of niet te suppleren.

Veiligheid van voeding en voedingssupplementen is een ontzettend breed onderwerp waar heel veel over te vertellen valt. In deze sectie wordt het onderwerp slechts kort aangesneden met enkele bruikbare punten.

Studies naar veiligheid kunnen op verschillende manieren ingedeeld worden. Een manier is om deze in te delen naar het proefmodel dat gebruikt is: cellen, dieren of mensen. Celstudies geven een idee over het effect van een voedingssupplement op een zeer kleine schaal, namelijk dat van de cel. Dit type studies is vooral handig voor het in kaart brengen van mogelijke mutagenen (stoffen die het DNA kunnen aantasten) of bijvoorbeeld het effect op de activiteit van bepaalde enzymen. Belangrijk bij dit soort studies is onder meer het gebruikte celtipe, maar uiteraard ook de gebruikte concentratie van de te onderzoeken substantie. Celstudies kennen uiteraard veel beperkingen en zouden nooit leidend mogen zijn in het oordeel over de veiligheid van een supplement. Wel geeft het nuttige informatie die gebruikt kan worden in vervolgonderzoek bij dieren of mensen, om zo extra aandacht te vestigen op bijvoorbeeld een bepaald orgaan of schadelijk effect.

Dierstudies laten het vervolgens toe om schadelijke effecten te onderzoeken in een organisme. Tijdens een experiment kunnen eenvoudig monsters worden afgenomen van dieren en tevens kunnen de organen na de dood worden onderzocht. Dierstudies kunnen, mits correct uitgevoerd, een voorspellende waarde hebben voor wat plaats zou kunnen vinden bij de mens. Er kleven echter veel haken en ogen aan dieronderzoek, waardoor dit lang niet altijd correct wordt uitgevoerd of niet kan worden geëxtrapoleerd naar de

mens. Een belangrijk punt is dat een correct diermodel moet worden uitgezocht, wat vaak niet makkelijk is wanneer er nog weinig bekend is over de substantie in kwestie. Veelal wordt er simpelweg gebruikgemaakt van knaagdieren zoals ratten en muizen, omdat zij veel praktische voordelen kennen. Zo zijn zij relatief makkelijk om te onderzoeken, weten we al heel veel over deze knaagdieren, en zijn er zeer veel verschillende stammen en genetisch gemodificeerde varianten beschikbaar om uit te kiezen. Ook zijn zij relatief goedkoop en hebben de meeste onderzoekers ethisch gezien minder problemen met proeven uitvoeren op een rat of muis dan op bijvoorbeeld een primate. Een belangrijk aspect bij het kiezen van een juist diermodel zijn de overeenkomsten tussen het dier en de mens op gebied van absorptie, distributie, metabolisme, en excretie (ADME) van de substantie. De grootste verschillen tussen dieren onderling en de mens worden meestal veroorzaakt door verschillen in metabolisme van een substantie. Desalniettemin is het, zonder diepgaande kennis van dierproeven, vaak moeilijk te beoordelen of een dierproefmodel goed is gekozen en uitgevoerd.

Leidend blijven klinische studies, waarbij de mogelijk schadelijke effecten en bijwerkingen van een substantie in kaart worden gebracht bij de mens. Omdat onderzoekers te maken hebben met een beperkt budget moeten zij concessies doen op wat zij wel en niet onderzoeken gedurende een klinische studie. Resultaten van eerdere celproeven en dierstudies kunnen helpen om de juiste focus te leggen. Mocht uit dierstudies blijken dat een middel een bepaald orgaan aantast, dan is het logisch om bij klinisch onderzoek met name dit orgaan in de gaten te houden. Als bijvoorbeeld de lever is aangedaan bij dierproeven, dan kun je de focus op de lever leggen. Dit kan vervolgens weer op meerdere manieren gedaan worden. Een goedkope en toch vrij betrouwbare methode om de status van de lever te testen is door middel van een simpele bloedtest. Hierbij wordt gekeken naar enkele bloedwaarden die wat zeggen over de lever. Een kort overzicht van bloedwaarden en waar zij betrekking op hebben is gegeven in tabel 3.1.

Bloedwaarden	Zegt wat over	Opmerkingen
ALAT, ASAT, GGT, AF	Leverschade	ALAT en ASAT kunnen ook verhoogd zijn door krachttraining (zie ook kader 9.2) .
Creatinine, GFR, ureum	Nierfunctie	Creatinine kan ook verhoogd zijn door creatinesuppletie of een grote spiermassa (zie ook kader 8.3). Ureum kan ook verhoogd zijn door een eiwitrijk dieet.
Leukocyten	Immuunsysteem	
Hemoglobine	Zuurstoftransport	
Cholesterol, triglyceriden	Risico op hart- en vaatziekten	Waarden worden sterk beïnvloed door dieet.

Tabel 3.1: Overzicht van enkele vaak gemeten bloedwaarden. Afkortingen: ALAT, alanine-aminotransaminase; ASAT, aspartaat-aminotransaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; AF, alkalische fosfatase; GFR, glomerulaire filtratiesnelheid.

Naast het objectief in kaart brengen van schadelijke effecten door een onderzoeker door bijvoorbeeld bloedtests, is het ook belangrijk dat proefpersonen worden aangemoedigd om bijwerkingen te rapporteren. Een bijwerking hoeft namelijk niet noodzakelijkerwijs zichtbaar te worden voor de onderzoeker door de tests die worden uitgevoerd. Aan de andere kant hoeft een bijwerking die optreedt tijdens suppletie niet door het middel

zelf te komen. Er moet daarom een statistisch significant verschil gevonden worden ten opzichte van de placebogroep. Een probleem hierbij is dat veel klinische studies klein van opzet zijn, waardoor een type II-fout makkelijk kan optreden. Een bijkomend nadeel van kleinschalige studies is dat de kans heel klein is dat een wat minder vaak voorkomende bijwerking wordt opgepikt. Immers, als er in een studie géén bijwerkingen worden gevonden, betekent dit niet dat het middel geen bijwerkingen kent. Het maximale kansrisico (met een betrouwbaarheidsinterval van 95%) op bijwerkingen kan benaderd worden met de formule $\frac{3}{n}$, waarbij n het aantal proefpersonen is [192]. Wanneer er bijvoorbeeld geen bijwerkingen worden gevonden bij veertien proefpersonen, is het maximale kansrisico alsnog circa 1 op 5.

4. Moleculaire mechanismen van spiergroei

4.1 Inleiding

Het vakgebied van de moleculaire sportfysiologie is een vrij jong subspecialisme binnen de sportfysiologie. In de afgelopen jaren zijn er dan ook ontzettend veel nieuwe ontwikkelingen geweest binnen dit vakgebied. In de jaren zeventig en tachtig van de vorige eeuw maakten veel nieuwe onderzoeksmethodes binnen de moleculaire biologie hun entree. Denk hierbij aan het kunnen manipuleren van DNA in levende organismen, zodat transgene diermodellen ontwikkeld konden worden. Zo konden genen selectief worden toegevoegd (knock-in) of uitgeschakeld (knock-out). Door de effecten hiervan te observeren kan beredeneerd worden bij welke processen het gen betrokken is.

Een bekend voorbeeld in de context van spiergroei is de myostatine-knock-out-muis door McPherron e.a. [307]. De onderzoekers schakelden hierbij het gen voor myostatine uit in muizen. Dit had als gevolg dat de muizen een sterk vergrote spiermassa hadden ten opzichte van normale muizen die het gevolg is van zowel hypertrofie als hyperplasie. Dit onderzoek wist ons te vertellen dat myostatine dus een belangrijke negatieve regulator van spiergroei is.

Naast de manipulatie van het genoom werden er ook methodes ontwikkeld om te kunnen meten wat zich afspeelt in cellen. Denk bijvoorbeeld aan de ontwikkeling van de zogeheten western blot-techniek (zie ook kader 1.4) die de detectie van eiwitten mogelijk maakt. Of de detectie van RNA door middel van reverse transcriptase polymerase kettingreactie (RT-PCR, Eng.: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) die het zogeheten northern blotting opvolgde, hetgeen het in kaart brengen van veranderingen in genexpressie mogelijk maakt.

En zo zijn er nog meer analytische technieken ontwikkeld die de evolutie van molecu-

laire sportfysiologie verder hebben gestuwd. Door de inzet van vele onderzoekers die deze technieken hebben toegepast in de context van spiergroei, zijn we veel te weten gekomen over het moleculaire samenspel dat leidt tot vergroting van de spiercellen.

De effecten van voeding en sport worden, uiteindelijk, gemedieerd door signaaltransductie. De spiercellen vangen signalen op die geïnterpreteerd worden door de cel en uiteindelijk leiden tot een reactie, hetzij spierhypertrofie, hetzij spieratrofie. Dit kunnen signalen zijn over de beschikbaarheid van energie in de vorm van glycogeen of ATP. Maar ze kunnen ook aangeven of er voldoende bouwstoffen zijn voor de daadwerkelijke eiwitsynthese, oftewel de aminozuurbeschikbaarheid. De mechanische prikkel veroorzaakt door spiercontractie, of een circulerend hormoon zoals testosteron, fungeert eveneens als een signaal dat kan worden opgepikt door de spiercel.

Eiwitsensoren van de spiercel vangen deze signalen op en vervolgens worden deze geïnterpreteerd. Deze interpretatie wordt weer verzorgd door een complex samenspel van eiwitten die de verschillende signalen door de cel vervoeren en laten samenkomen. Telkens spelen veel van dezelfde eiwitten een rol in het mediëren van een bepaald signaal en komen ze vaak samen op eenzelfde punt. Samen vormen zij zogeheten reactiepaden.

In de volgende sectie wordt zo'n reactiepad dat nauw betrokken is bij spiergroei beschreven. De eiwitten die onderdeel zijn van zo'n reactiepad 'berekenen' de uiteindelijke reactie die moet plaatsvinden door middel van verschillende mechanismen. Denk hierbij aan eiwit-eiwit-interacties, posttranslationele modificaties (bijvoorbeeld fosforylering), translocatie (bijvoorbeeld verplaatsing van het cytosol naar de celkern) en invloed op de synthese/afbraak van signaalmoleculen betrokken in het reactiepad. Uiteindelijk zorgt dit ervoor dat er veranderingen plaatsvinden in cellulaire processen zoals de genexpressie en mRNA-translatie, maar ook de eiwitaafbraak. Denk hierbij aan veranderingen in de concentratie van metabole enzymen of van de eiwitten die de sarcomeren vormen en zo het functioneren van de spier beïnvloeden. Onderzoek gericht op spierhypertrofie kijkt vooral naar de effecten op de eiwitsynthese en genexpressie van myofibrillaire eiwitten en eiwitten die betrokken zijn bij spieraafbraak, zoals ubiquitine-ligases.

4.2 mTOR-signalering

Centraal in de intracellulaire signalering van spiergroei is het *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-reactiepad [59]. mTOR-signalering heeft zijn naam te danken aan het mTOR-molecuul, een eiwitkinase betrokken bij de fosforylering van moleculen die de eiwittranslatie-initiatie reguleren. Om zijn rol te vervullen vormt de kinase een eiwitcomplex (mTORC1) met andere eiwitten: mLST8 en raptor [127].

mTORC1 staat te boek als een zeer belangrijk signaleringscomplex dat de spiermassa beheert [5]. Het integreert de signalen van krachttraining (mechanische en metabole stress), aminozurenbeschikbaarheid, beschikbare energie (cellulaire energiestatus) en groeifactoren. Deze signalen kunnen mTORC1 activeren. Dit leidt tot fosforylering van twee belangrijke substraatsets: eIF4E-bindingseiwitten en ribosomale S6-kinases. Fosforylering van deze substraten bevordert vervolgens de eiwitsynthese, in het bijzonder de initiatie hiervan.

Kader 4.1



De eiwitsynthese (mRNA-translatie) kan onderverdeeld worden in drie fases: initiatie, elongatie en terminatie. De initiatie vormt het begin van de mRNA-

translatie. Hierbij bindt een eiwitcomplex (*small ribosomal subunit*) aan de 5'-cap van het mRNA-molecuul die vervolgens op zoek gaat naar het startcodon om translatie van het mRNA naar het eiwit te beginnen met het eerste aminozuur (methionine). Het eiwitcomplex wordt hierbij geholpen door verscheidene factoren (eukaryotische initiatiefactoren). Aangekomen bij het startcodon dissociëren de initiatiefactoren zich en voegt de large ribosomal subunit zich bij de small ribosomal subunit om een volledig functionerend ribosoom te vormen. Het proces waarbij de aminozuren vervolgens één voor één aan de groeiende polypeptidestreng worden gebonden door het ribosoom heet de elongatie. Aangekomen bij het stopcodon begint de terminatie en dissocieert het hele complex van het mRNA.

Met name de initiatie-fase is sterk onderhevig aan regulatie bij anabole reactiepaden in spiercellen. Zo fosforyleert mTORC1 het eukaryotische initiatiefactor 4E-bindingseiwit 1 (4E-BP1) [164]. 4E-BP1 bindt aan één van de eukaryotische initiatiefactoren (eIF4E) die ervoor zorgt dat de small ribosomal subunit aan de 5'-cap van het mRNA-molecuul bindt. De binding van 4E-BP1 aan eIF4E remt deze rekrutering van de small ribosomal subunit, en remt zodoende de mRNA-translatie. Fosforylering van 4E-BP1 door mTORC1 zorgt voor dissociatie van het eiwit, zodat de mRNA-translatie zijn gang kan gaan.

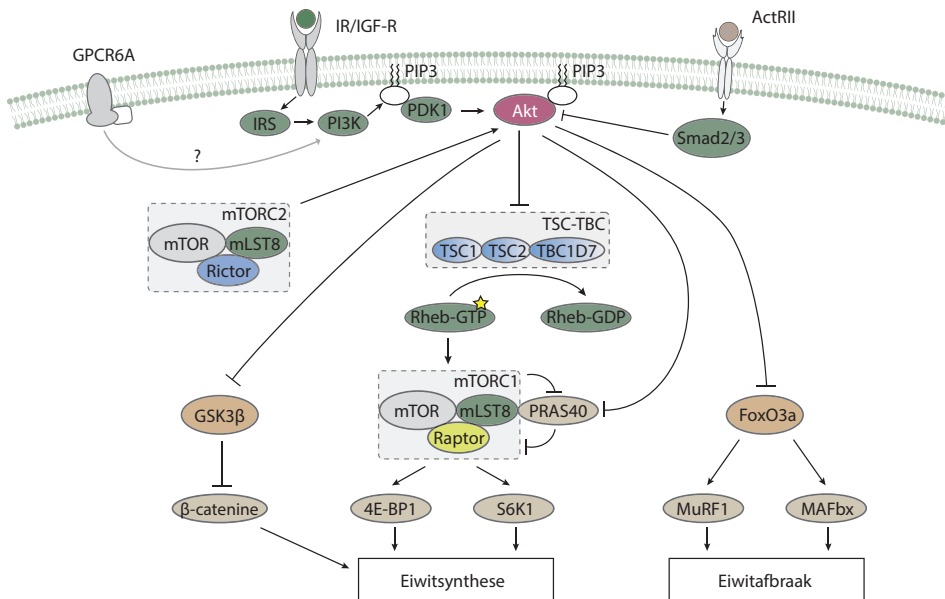
4.2.1 Regulatie door groeifactoren

De regulatie van mTORC1 door de groeifactoren insuline en insuline-achtige groeifactor-1 (IGF-1) is goed in kaart gebracht. Activatie van de insulinerceptor (IR) of insuline-achtige groeifactor-1-receptor (IGF-1R) zorgt voor interactie en fosforylering van insulinerceptor-substraten (IRSen). Zowel de IR als de IGF-1R zijn zogeheten tyrosinekinasereceptoren: zij beschikken over intrinsieke kinase-activiteit om eiwitten te fosforyleren op tyrosineresiduen. Tyrosinefosforylering van de IRSen zorgt voor het ontstaan van bindingsplaatsen op deze eiwitten waaraan weer andere eiwitten kunnen binden die over bijbehorend domein (SH2-domein) beschikken.

Eén van deze eiwitten die over zo'n domein beschikt is de kinase fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K, Eng.: *phosphatidylinositol-3-kinase*). PI3K wordt vervolgens geactiveerd na associatie met een IRS [323]. Geactiveerd PI3K fosforyleert inositolfosfolipiden (gelegen in de celmembraan) op de 3-hydroxylgroep (-OH) en geeft zo 3'-fosfoinositides, waaronder fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfaat (PIP3, Eng.: *phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*). Eiwitten die beschikken over het Pleckstrin homologie (PH)-domein kunnen interacteren met PIP3 en worden zo naar de cytosolzijde van de plasmamembraan gerekruteerd. Hiertoe behoren o.a. 3-fosfoinositide-afhankelijke-eiwitkinase 1 (PDK1, Eng.: *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*) en Akt (ook wel bekend als eiwitkinase B, Eng.: *protein kinase B*). De associatie van PIP3 met Akt zorgt ervoor dat deze makkelijker geactiveerd kan worden door fosforylering. Eveneens zorgt de associatie van PIP3 met PDK1 ervoor dat deze Akt fosforyleert.

De Akt-familie bestaat uit drie isovormen, oftewel drie verschillende kinases die dezelfde reactie katalyseren, maar verschillen in hun aminozuursequentie. De drie isovormen zijn Akt1, Akt2 en Akt3. In het kader van spiergroei zijn alleen de eerste twee interessant, aangezien Akt3 niet tot expressie komt in spierweefsel [487]. PDK1 fosforyleert Akt1 en Akt2 op respectievelijk residu Thr308 en Thr309. Voor volledige activiteit van Akt is echter ook fosforylering op een serineresidu benodigd [9, 150], te weten Ser473 en Ser474 voor respectievelijk Akt1 en Akt2. Deze fosforylering wordt (waarschijnlijk) verzorgd door mTORC2 (een complex dat eveneens de mTOR-kinase bevat) [401].

In mechanistische studies wordt vaak gekeken naar de fosforyleringsstatus van één of



Figuur 4.1: mTORC1-regulatie door groeifactoren. Activatie van de IR en IGF-1R zorgen ervoor dat de IRSen worden gefosforyleerd en hiermee geactiveerd. Dit leidt tot activatie van PI3K. PI3K genereert vervolgens PIP3, die PDK1 en Akt naar de plasmamembraan rekruteert. Hier kan Akt vervolgens geactiveerd worden. Dit gebeurt door fosforylering door zowel PDK1 als mTORC2. Geactiveerd Akt remt verscheidene substraten door deze te fosforyleren, waaronder het TSC-TBC-complex, GSK3 β , FoxO3a en PRAS40. Akt-activiteit wordt ook gestimuleerd door androgenen, mogelijk door het versterken van PI3K-activiteit, een effect gemedieerd door GPCR6A. Ten slotte wordt Akt-activatie geremd door activatie van ActRII-receptoren, een effect gemedieerd door Smad2 en Smad3. Figuur overgenomen uit Bond [59]. Afkortingen: 4E-BP1, eukaryotische initiatiefactor 4E-bindingseiwit 1; ActRII, activine type 2-receptor; FoxO3a, forkhead Box O 3a; GSK3 β , glycogeensynthasekinase 3 β ; MAFbx, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle RING finger 1; IGF-R, insuline-achtige factorreceptor; IR, insulinerceptor; IRS, insulinerceptorsubstraat; mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein 8; mTORC1/2, mechanistic target of rapamycin complex 1/2; S6K1, S6-kinase 1; TSC-TBC, tubereuze sclerose-Tre2-Bub2-Cdc16.

beide van deze residuen om Akt-activatie in kaart te brengen. Er wordt hierbij meestal gekeken naar de fosforyleringsstatus van Akt1, waarbij dus wordt gekeken naar fosforylering van de residuen Thr308 en Ser473.

Myostatine, een potente negatieve regulator van spiergroei [387] reguleert ook Akt-activiteit [445]. Myostatine behoort tot de transforming growth factor β (TGF- β) superfamilie en is een ligand voor activine type II-receptoren (ActRIIA en ActRIIB). Het eiwit en de functie ervan werden ontdekt in 1997 door McPherron e.a. [307]. Zij schakelden het gen voor myostatine uit in muizen en zagen dat zij enorm gespierd werden. Deze enorme spiergroei was niet alleen te danken aan het groter worden van de spiercellen (spierhypertrofie), maar ook doordat de spiercellen in aantal toenamen (spierhyperplasie). Sindsdien is er enorm veel onderzoek gedaan naar myostatine-signalering om te kijken

of er een medicijn ontwikkeld kan worden wat hierop inspeelt en zou kunnen worden toegepast bij ziektebeelden waarin de spiermassa in het geding is, zoals bij kankercachexie.

Recentelijk is ook ontdekt hoe myostatine de Akt-activiteit weet te remmen. Normaal gesproken is er een micro-RNA (miR-486) aanwezig in de spiercellen die Akt-fosforylering bevordert doordat het fosfatase en tensine homolog (PTEN, Eng.: *phosphatase and tensine homolog*) weet te remmen. PTEN doet de werking van PI3K teniet door defosforylering van PIP3 tot PIP2 [293]. Myostatine remt de expressie van miR-486 op transcriptieel niveau waardoor het effectief dus Akt-fosforylering door PI3K remt [212].

Akt heeft verschillende substraten die worden gefosforyleerd door de kinase na activatie. De substraten waarover het meeste bekend is zijn: glycogeensynthasekinase 3β (GSK3 β) [108], proline-rich Akt substrate of 40 KDa (PRAS40) [265], tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) [234] en forkhead box class O (FoxO)-familie-eiwitten [444].

TSC2 en PRAS40 remmen mTORC1-activiteit en wanneer Akt deze moleculen fosforyleert heft dat deze remming op. TSC2 remt mTORC1-activiteit door een eiwitcomplex te vormen samen met TSC1 en het in 2012 ontdekte TBC1D7 [126]. TSC is het acroniem van tubereuze sclerose (Eng.: *tuberous sclerosis*), een ziekte waarbij TSC1 of TSC2 gemuteerd is waardoor de remmende werking hiervan op mTORC1 vervalt. Deze ziekte kenmerkt zich door de wildgroei van goedaardige tumoren in verschillende organen, wat inderdaad in lijn ligt met wat men weet over de centrale rol van mTORC1 in een cel: het stimuleren van groei en proliferatie. Wanneer het TSC-complex gevormd is remt het mTORC1-activiteit door toedoen van zijn GTPase-activating protein (GAP)-domein [279, 126]. mTORC1 wordt namelijk geactiveerd door GTP-gebonden Rheb-eiwitten (Rheb-GTP) op de lysosomale membraan [284]. Door de hoeveelheid Rheb-GTP te reguleren weet het TSC-complex mTORC1-activiteit te beïnvloeden. Het moet echter worden opgemerkt dat het TSC-complex de hoogste affiniteit kent voor Rheb-GDP [309] en zodoende belemmert het wellicht vooral de uitwisseling van guanosinedifosfaat (GDP) voor guanosinedifosfaat (GTP), zodat de Rheb-eiwitten als het ware niet 'herladen' kunnen worden.

Zoals gezegd remt fosforylering van TSC2 (op Ser939 en Thr1462) door Akt de inhiberende werking hiervan op mTORC1. Er zijn verschillende hypothesen geformuleerd die zouden verklaren waarom deze fosforylering het TSC-complex weet te remmen. Zo zou de fosforylering leiden tot een bemoeilijkte vorming van het TSC-complex, dan wel een verminderde stabiliteit. Echter toont recent onderzoek aan dat dit in ieder geval niet het geval is tot twaalf uur na stimulering van het PI3K-Akt-reactiepad [309]. Ditzelfde onderzoek toonde eveneens aan dat er geen verminderde GAP-activiteit optrad van het TSC-complex, hetgeen ook eerder was gesuggereerd als een potentieel mechanisme. Bovendien kwamen de onderzoekers met een zeer verleidelijke alternatieve verklaring. Fosforylering van het TSC-complex zou ervoor zorgen dat het dissocieert van de lysosomale membraan, de plek waar mTORC1 wordt geactiveerd door Rheb-GTP. Deze spatiale regulatie vormt momenteel de leidende hypothese wat betreft TSC-complex regulatie door Akt.

Kader 4.2



Lysosomen werden tot voor kort gezien als ovale organellen die in het cytoplasma van cellen voorkomen. Recent is echter ontdekt dat lysosomen een tubulair netwerk vormen in de spieren van *Drosophila* (fruitvliegjes, een modelorganisme dat veel wordt gebruikt in het biologisch onderzoek) [241]. Defecten aan deze tubulaire organisatie lijken ten grondslag te liggen aan verschillende spierziekten. De verdere implicaties van deze ontdekking staan

echter nog in de kinderschoenen.

Ook wordt mTORC1-activiteit geremd door de binding van PRAS40 aan het complex [473]. Dit eiwit bindt aan de mTORC1-subeenheid raptor waardoor deze zijn substraten niet meer kan binden. Groeifactorreceptoractivatie zorgt ervoor dat PRAS40 dissocieert van mTORC1, waardoor deze remming wordt opgeheven. De dissociatie wordt veroorzaakt door fosforylering van het eiwit op drie residuen; één threonineresidu (Thr246) en twee serineresiduen (Ser181 en Ser221). Het threonineresidu wordt gefosforyleerd door Akt en de serineresiduen worden beide gefosforyleerd door mTORC1 wanneer deze geactiveerd is, zoals door Rheb-GTP.

Fosforylering van GSK3 β , eveneens een substraat van Akt, leidt tot accumulatie van β -catenine in het cytoplasma. GSK3 β zorgt er normaal gesproken namelijk voor dat β -catenine wordt afgebroken door een complex te vormen met andere eiwitten [233]. Wanneer GSK3 β wordt gefosforyleerd door Akt vervalt deze werking. β -catenine transloceert vervolgens naar de celkern, waar het gentranscriptie beïnvloedt van genen die betrokken zijn bij groei [19]. Ook kan GSK3 β de mRNA-translatie remmen door blokkering van de GDP-GTP-uitwisseling van eIF2B [366], hetgeen benodigd is voor de vorming van een functioneel eiwittranslatiecomplex [160].

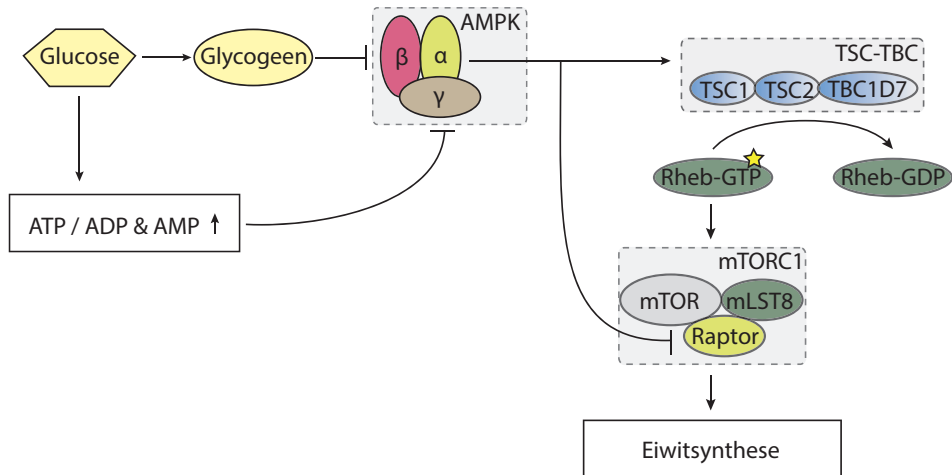
De FoxO-familie-eiwitten, waar Akt-activiteit een remmende invloed op uitoefent, spelen een zeer belangrijke rol bij de afbraak van eiwitten. Zij moduleren het ubiquitine-proteasome proteolytische reactiepad, als ook autofagie van eiwitten [399]. Met name het ubiquitine-proteasome systeem speelt een belangrijke rol bij de eiwitafbraak in spieren. Dit systeem gaat te werk door eiwitten te markeren voor afbraak met een markering (ubiquitine). Zogeheten ubiquitine-ligases voeren deze markeringen uit. Vervolgens herkent een groot eiwitcomplex (het proteasoom) deze markeringen, waarna dit het gemarkeerde eiwit afbreekt. Twee belangrijke ubiquitine-ligases waar veel onderzoek naar is verricht, zijn *muscle atrophy F-box* (MAFbx/Atrogine 1, Eng.: *muscle atrophy F-box*) en *muscle ring finger 1* (MuRF1) [56, 55].

Ten slotte wordt Akt-activiteit ook nog gereguleerd door androgenen [59]. Dit effect lijkt gemedieerd te worden door de G-proteïnegekoppelde receptor GPRC6A, alsook door de intracellulair androgeenreceptor (AR). Mogelijk vindt er interactie tussen deze receptoren plaats met PI3K.

4.2.2 Regulatie door energiestatus

De integratie van de cellulaire energiestatus wordt geregeld door AMP-geactiveerde eiwitkinase (AMPK, Eng.: *AMP-activated protein kinase*). AMPK is een heterotrimeer bestaande uit een combinatie van α -, β - en γ -subeenheden. Van de α - en β -subeenheden zijn van ieder twee isovormen bekend ($\alpha 1$, $\alpha 2$ en $\beta 1$, $\beta 2$). Van de γ -subeenheid zijn drie isovormen bekend ($\gamma 1$, $\gamma 2$ en $\gamma 3$). De α -subeenheid vormt de katalytische eenheid, de overige twee subeenheden hebben een regelende rol en 'voelen' de energiestatus van de cel. Zo kan de β -subeenheid interacteren met glycogeen [303] en de γ -eenheid met de nucleotiden adenosinetrifosfaat (ATP), adenosinedifosfaat (ADP) en adenosinemonofosfaat (AMP) [193].

Een daling van de energiestatus van de cel (dat wil zeggen een vermindering van glycogeen of stijging van de ADP:ATP- of AMP:ATP-ratio) activeert AMPK. Activatie van AMPK leidt, algemeen genomen, tot bevordering van katabole reactiepaden om energie te genereren en zo de energiestatus te herstellen. Daarnaast leidt het tot remming van anabole



Figuur 4.2: AMPK-regulatie door energiestatus. De γ -subeenheid interacteert met de nucleotiden ATP, ADP en AMP. Een hoge ATP tot ADP/AMP ratio remt AMPK en een daling in deze ratio activeert de kinase. Interactie van glycogeen met de β -subeenheid zorgt voor allosterische remming van AMPK. Geactiveerd AMPK fosforyleert TSC2 op twee residuen (Thr1227 en Ser1345) die belangrijk zijn voor de activatie van het TSC-TBC-complex. Ook fosforyleert geactiveerd AMPK het eiwit raptor op twee residuen (Ser722 en Ser792), hetgeen mTORC1-activiteit remt. Figuur overgenomen uit Bond [59]. Afkortingen: ADP, adenosinedifosfaat; AMP, adenosinemonofosfaat; AMPK, AMP-geactiveerde eiwitkinase; ATP, adenosinetrifosfaat; GDP, guanosinedifosfaat; GTP, guanosinetrifosfaat; mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein 8; mTOR, mechanistic target of rapamycin; TSC1/2, tubereuze sclerose 1/2; TBC1D7, Tre2-Bub2-Cdc16 1 domain family member 7.

reactiepaden om zodoende het energieverbruik te verminderen. Via de β -subeenheid integreert AMPK de status van de energiereserve glycogeen. De interactie tussen beide leidt tot allosterische remming van AMPK-activiteit. Een daling van glycogeen vermindert deze remming en leidt dus tot activatie van het complex. Dit is logisch, aangezien een daling van glycogeen duidt op energieverbruik. Daarnaast interacteert AMPK met de nucleotiden, om zo de actuele energiestatus van de cel te 'meten'. Op de γ -subeenheid vindt hiertoe concurrentie plaats tussen de drie nucleotiden ATP, ADP en AMP om te binden aan deze eenheid. Een daling van ATP en een stijging van AMP en ADP duiden op energieverbruik (zie hoofdstuk 2) en zodoende stelt concurrentie tussen deze nucleotiden voor binding aan de γ -subeenheid het complex in staat om het energieverbruik te meten.

Van de twaalf verschillende combinaties die gemaakt kunnen worden uit de verschillende subeenheidisovormen, zijn slechts drie verschillende hiervan in spiercellen (afkomstig van de quadriceps) van de mens gevonden: $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$, $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ en $\alpha 1/\beta 2/\gamma 1$ [46]. De distributie van deze drie heterotrimeren wordt geschat op 15% voor $\alpha 1/\beta 2/\gamma 1$, 65% voor $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$ en 20% voor $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$. De drie heterodimeren worden verschillend gereguleerd en hebben onderscheidende effecten [320]. De $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ -heterotrimeer wordt al snel geactiveerd door fysieke arbeid, terwijl de overige twee pas (veel) later geactiveerd

worden. De $\alpha 1$ -houdende isovorm lijkt de spiergroei te remmen, terwijl de $\alpha 2$ -houdende isovormen dit niet lijken te doen [319].

De remming van spiergroei door AMPK verloopt, in ieder geval ten dele, via inhibitie van mTORC1. AMPK fosforyleert namelijk twee residuen (Thr1227 en Ser1345) op TSC2 die belangrijk zijn voor de activatie ervan [235]. Zoals beschreven in sectie 4.2.1 remt TSC2 mTORC1-activiteit, waardoor AMPK door activatie van TSC2 mTORC1 weet te remmen. Daarnaast is raptor, een van de eiwitten die het mTORC1-complex vormt, ook een substraat voor AMPK [189]. Fosforylering hiervan (op Ser722 en Ser792) leidt eveneens tot remming van het complex. De antagonistische werking van AMPK op mTORC1 komt dus door fosforylering van zowel TSC2 als raptor.

4.2.3 Regulatie door aminozuren

In de laatste paar jaren hebben onderzoekers veel duidelijkheid verschaft over de manier waarop aminozuren de spiergroei stimuleren. Aminozuren staan uiteraard centraal in de eiwitsynthese, aangezien zij de letterlijke bouwstenen vormen van eiwitten. Het is dan ook niet verbazingwekkend dat de evolutie heeft geleid tot een strakke regulatie van de eiwitsynthese op basis van de beschikbaarheid van deze bouwstenen voor dit proces.

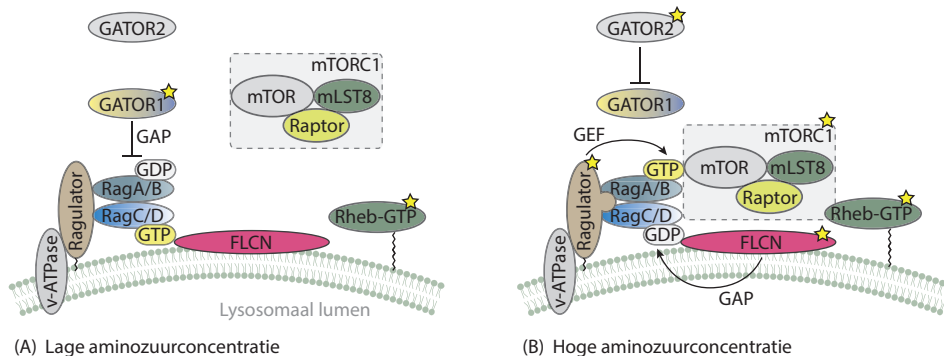
De regulatie van mTORC1 door aminozuren speelt vooral in op het beïnvloeden van de locatie van mTORC1 in de cel. Wanneer een cel aminozuurarm is, is mTORC1 verspreid door het cytoplasma te vinden [398]. Toevoeging van aminozuren zorgt ervoor dat het complex transloceert naar de lysosomale membraan [397], de plaats waar mTORC1 wordt geactiveerd door Rheb-GTP (zie ook sectie 4.2.1). De aanwezigheid van aminozuren zorgt er dus voor dat het complex op de juiste plaats in de cel terechtkomt om uiteindelijk geactiveerd te worden.

Verschillende mechanismen spelen een rol bij de translocatie van mTORC1 naar de lysosomale membraan. Deze translocatie komt tot stand door interactie met zogeheten Ras-gerelateerde GTPases (Rags, Eng.: *Ras-related GTPases*). Rags associëren op hun beurt weer met een eiwitcomplex genaamd Ragulator, die verankerd is in de lysosomale membraan. De interactie van Rags met mTORC1 is afhankelijk van hun guaninenucleotidebindingsstaat. Oftewel de binding aan GDP of GTP.

Er bestaan vier Rag-eiwitten (RagA, RagB, RagC en RagD). RagA en RagB (RagA/B) binden aan RagC en RagD (RagC/D) en vormen zo paren van heterodimeren. In een aminozuurarme toestand zijn RagA/B gebonden aan GDP en RagC/D gebonden aan GTP. In een aminozuurrijke toestand zijn RagA/B gebonden aan GTP en RagC/D gebonden aan GDP en rekruteren zij zodoende mTORC1 naar de lysosomale membraan. Aminozuren weten dus de guaninenucleotidebindingsstaat van de Rag-eiwitten te reguleren. Dit zorgt er vervolgens voor dat mTORC1 naar de lysosomale membraan transloceert voor activatie.

Een belangrijke rol hierbij speelt het Ragulator-complex. Het associeert met de Rag-eiwitten, waardoor deze lokaliseren naar de lysosomale membraan. Daarnaast fungeert het complex als een zogeheten guaninenucleotide-uitwisselfactor (GEF, Eng.: *guanine nucleotide exchange factor*) voor RagA/B [34]. Dit betekent dat het de GDP van RagA/B kan uitwisselen voor GTP, waardoor de actieve vorm van RagA/B wordt gevormd.

De GEF-activiteit van Ragulator wordt weer gereguleerd door v-ATPase [34]. v-ATPase is een protonenpomp aanwezig in de lysosomale membraan die protonen de lysosoom instuurt, ten koste van ATP, om zo het zure milieu binnen de lysosoom te waarborgen. Ragulator associeert met v-ATPase, en aminozuren zorgen ervoor dat er een conformationele wijziging plaatsvindt aan het eiwit die doorslaat op Ragulator om



Figuur 4.3: mTORC1-regulatie door aminozuren. (A) De Rag-eiwitten bevinden zich in inactieve toestand bij een lage aminozuurconcentratie en kunnen daardoor mTORC1 niet rekruteren naar de lysosomale membraan voor activatie door Rheb-GTP. Ragulator en v-ATPase bevinden zich eveneens in inactieve toestand, terwijl GATOR1 GAP-activiteit vertoont richting RagA/B, waardoor zij inactief blijven. (B) Een stijging in de aminozuurconcentratie veroorzaakt een conformationele verandering in v-ATPase en Ragulator, waardoor GEF-activiteit richting RagA/B wordt geïnitieerd door Ragulator. FLCN en de eiwitten die zich met FLCN associëren vertonen GAP-activiteit richting RagC/D waardoor ook zij geactiveerd worden. Ook wordt de GAP-activiteit van GATOR1 geremd door GATOR2. Samen leiden deze acties tot de vorming van de actieve Rag-heterodimeren: GTP-gebonden RagA/B en GDP-gebonden RagC/D. Deze rekruteren op hun beurt mTORC1 naar het oppervlak van de lysosomale membraan waardoor deze geactiveerd kan worden door Rheb-GTP. Figuur overgenomen uit Bond [59]. Afkortingen: FLCN, folliculine; GATOR1/2, GAP activity towards Rags 1/2; GDP, guanosinedifosfaat; GTP, guanosinetrifosfaat; mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein 8; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1.

de GEF-activiteit ervan te activeren. Hoe v-ATPase wordt gereguleerd door aminozuren is vooralsnog onduidelijk, maar het signaal lijkt van binnen de lysosoom te komen door opstapeling van aminozuren in het lumen [507].

Samenvattend zorgt het Ragulator-complex, dat associeert met de lysosomale membraan, ervoor dat Rag-eiwitten ermee kunnen interacteren en zich daardoor ook aan het oppervlak van de lysosomale membraan bevinden. Bovendien kan Ragulator de RagA/B-eiwitten activeren, doordat aminozuren de GEF-activiteit van Ragulator aanzetten via v-ATPase. Dit zorgt voor translocatie van mTORC1 naar de lysosomale membraan, waar het geactiveerd kan worden.

Daar waar Ragulator als GEF optreedt voor RagA/B, treedt een ander eiwit op als GAP voor deze eiwitten. Het zogeheten GATOR1-complex (Eng.: *GAP activity towards Rags*) vertoont GAP-activiteit voor RagA/B [33] en wisselt zodoende GTP uit voor GDP, hetgeen leidt tot deactivatie. GATOR1 heeft zo dus een remmende werking op mTORC1.

Een ander eiwitcomplex, GATOR2 genaamd, heeft weer een remmende werking op GATOR1 [33], waardoor deze juist een stimulerende werking heeft op mTORC1. Hoe GATOR2 GATOR1 weet te remmen is onbekend. De remmende werking van GATOR2 op GATOR1 wordt gestimuleerd door aminozuren, een effect dat gemedieerd wordt door zogeheten Sestrin-eiwitten [89]. Ook hiervan is vooralsnog nauwelijks bekend hoe het GATOR2 weet te reguleren.

Tot slot vindt er regulatie plaats van de guaninenucleotidebindingsstaat van RagC/D door aminozuren. Het enzym dat tRNA laadt met leucine (leucyl tRNA-synthetase) vertoont GAP-activiteit voor RagD op een leucine-afhankelijke manier [191], al wist een latere studie deze resultaten niet te reproduceren [451]. Wat deze latere studie wel aantoonde was dat het folliculine-complex GAP-activiteit vertoont voor RagC/D, hetgeen uiteindelijk mTORC1-activiteit bevordert.

Een ander mechanisme waarmee leucyl-tRNA-synthetase mTORC1 zou activeren verloopt via de lipide kinase Vps34 [492]. Op een leucine-afhankelijke manier vindt er interactie plaats tussen de tRNA-synthetase en Vps34, waardoor deze laatste actief wordt. Geactiveerd Vps34 produceert vervolgens fosfatidylinositol-3-fosfaat (PI(3)P). Aansluitend vindt er interactie plaats tussen het gevormde PI(3)P en het PX-domein van de fosfolipase PLD1 waardoor deze naar het lysosoom transloceert. PLD1 hydrolyseert fosfatidylcholine tot fosfatidezuur dat vervolgens in staat is om direct mTORC1 te activeren. De regulatie van mTORC1 door fosfatidezuur wordt nader beschouwd in de volgende sectie.

4.2.4 Regulatie door mechanische belasting

Gezien de belangrijke rol van mTOR-signalering in de regulatie van de eiwitsynthese en spiervolume, is het voor de hand liggend dat mechanische belasting, zoals door kracht-training, hier ook effect op heeft. Tot op heden zijn er twee belangrijke mechanismen geïdentificeerd die het mTORC1-complex reguleren door mechanische belasting.

Eén van deze mechanismen is, net als het geval is bij het PI3K-Akt-reactiepad, de dissociatie van TSC2 van de lysosomale membraan [237]. Mechanische belasting zorgt voor fosforylering van TSC2, waardoor deze dissocieert van de lysosomale membraan en geen GAP-activiteit meer kan uitoefenen op de Rheb-GTP-eiwitten, die direct verantwoordelijk zijn voor mTORC1-activering. Bovendien bevordert mechanische belasting de associatie van mTORC1 met de lysosomale membraan, wat de activering ervan verder bevordert. Men is onzeker welk mechanisme dit in werking stelt.

Naast de Rheb-GTP-eiwitten die direct mTORC1 kunnen activeren, blijkt een ander molecuul, fosfatidezuur, dit ook te kunnen [493]. Fosfatidezuur is een diacylglycerolfosfolipide. De stimulerende werking van fosfatidezuur op mTORC1 leunt met name op twee werkingsmechanismen:

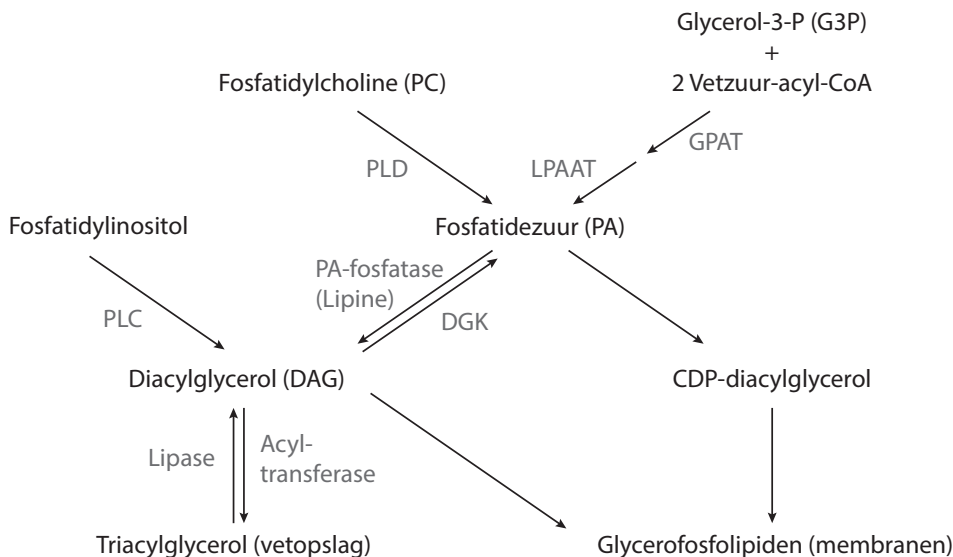
1. verdringing van binding van een endogene mTORC1-remmer (FKBP38) aan het FRB-domein (competitieve inhibitie);
2. allosterische activatie van de kinase.

Kader 4.3



Gebaseerd op de bevindingen van mechanistische studies, waaruit naar voren kwam dat fosfatidezuur een belangrijke rol speelt bij mTORC1-activatie, heeft men ook een klinische studie uitgevoerd waarbij fosfatidezuur werd gesuppleerd aan krachttrainende mannen [217]. Het onderzoek werd dubbelblind placebogecontroleerd uitgevoerd. De mannen die fosfatidezuur gesuppleerd kregen, zagen een grotere stijging van de magere lichaamsmassa dan de placebogroep. Het resultaat was echter niet statistisch significant ($P = 0.065$). Hierna hebben nog enkele studies met een vergelijkbare opzet het effect van het supplement op de spierkracht en spiermassa onderzocht. Fosfatidezuursuppletie wordt verder behandeld in hoofdstuk 10.

De hoeveelheid fosfatidezuur in een cel wordt gereguleerd door een vijftal verschillende klassen enzymen [153]. Drie hiervan zorgen voor de synthese van fosfatidezuur en twee



Figuur 4.4: Fosfatidezuur (PA) kan gesynthetiseerd worden uit glycerol-3-fosfaat (G3P), fosfatidylcholine (PC) en diacylglycerol (DAG). G3P wordt tweemaal geacetyleerd om PA te vormen. Eerst vindt er acetylering plaats door GPAT, gevolgd door LPAAT. PC wordt gehydrolyseerd door PLD om PA te leveren en DAG wordt gefosforyleerd door DGK om PA te leveren. DAG is afkomstig van triacylglycerol en fosfatidylinositol. PA-fosfatase is verantwoordelijk voor de defosforylering van PA tot DAG. Verscheidene CDP-diacylglycerolsynthesen produceren CDP-diacylglycerol uit PA. Figuur overgenomen uit Bond [59].

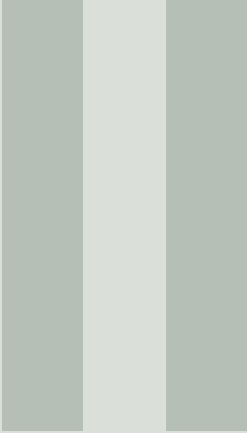
zorgen voor de degradatie. De balans tussen beide bepaalt uiteindelijk of er een stijging of daling zal plaatsvinden van de concentratie fosfatidezuur.

Glycerol-3-fosfaat, fosfatidylcholine en diacylglycerol (DAG) vormen de precursors voor de biosynthese van fosfatidezuur. Glycerol-3-fosfaat wordt tweemaal geacetyleerd om fosfatidezuur te vormen. Eerst vindt er acetylatering plaats door het enzym glycerol-3-fosfaatacyltransferase (GPAT, Eng.: *glycerol-3-phosphate acyltransferase*), waarna lysofosfatidezuuracyltransferase (LPAAT, Eng.: *lysophosphatidic acid acyltransferase*) de tweede acetylering uitvoert.

De vorming van fosfatidezuur uit fosfatidylcholine vindt plaats door een hydrolyse-reactie gekatalyseerd door fosfolipase D (PLD, Eng.: *phospholipase D*). Er werd lang aangenomen dat deze reactie, gekatalyseerd door PLD, cruciaal was in de door mechanische belasting gemedieerde stijging van fosfatidezuur. Dit bewijs stelde vooral op het gegeven dat de PLD-remmer 1-butanol mTORC1-activatie blokkeerde in diverse experimenten [224]. In 2009 kwam echter aan het licht dat niet alle biologische activiteit van 1-butanol kon worden toegekend aan PLD-remming. Bovendien kwam eerder al naar voren dat de mate van PLD-activiteit door mechanische belasting met de tijd slecht correleert met de gemeten stijging van fosfatidezuur [223]. De PLD-activiteit stijgt slechts kort (gemeten na vijftien minuten) en daalt daarna, terwijl de fosfatidezuurconcentratie na vijftien minuten nog door blijft stijgen.

Ten slotte wordt fosfatidezuur gevormd uit diacylglycerol, waarbij het molecuul wordt gefosforyleerd door een diacylglycerolkinase (DGK). Er bestaan veel verschillende iso-vormen van DGK en recentelijk is aangetoond dat waarschijnlijk de ζ -isovorm primair verantwoordelijk is voor de mechanisch belasting gemedieerde stijging van fosfatidezuur in spiercellen [495]. Bovendien demonstreerden de onderzoekers dat PLD-activiteit niet benodigd is voor de stijging van fosfatidezuur door mechanische belasting.

De regulatie van de enzymen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van fosfatidezuur door mechanische belasting is tot op heden slecht in kaart gebracht.



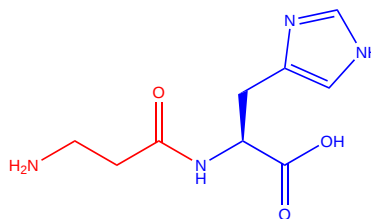
Supplementen

5	Bèta-alanine	63
6	Bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB) ..	75
7	Cafeïne	87
8	Creatine	97
9	Eiwitpreparaten	111
10	Fosfatidezuur	125
11	Trimethylglycine	137
12	Vitamine D	149
	Referenties	161
	Index	191

5. Bèta-alanine

5.1 Inleiding

Bèta-alanine is een vrij nieuw voedingssupplement dat voor het eerst onder de aandacht van sporters kwam in 2006. In 2006 toonden Roger C. Harris en zijn collega's namelijk aan dat bèta-alaninesuppletie de concentratie carnosine in het spierweefsel vergrootte [197]. Diezelfde Roger C. Harris bracht al eerder, in 1992, het succesvolle voedingssupplement creatine onder de aandacht door aan te tonen dat creatinesuppletie de totale hoeveelheid creatine in het spierweefsel vergrootte (zie hoofdstuk 8). Carnosine is een dipeptide van de twee aminozuren bèta-alanine en L-histidine. Carnosine vormt een belangrijke pH-buffer in de spiercellen, doordat het in staat is protonen (H^+) op te vangen. Dit is vooral te danken aan de imidazolgroep van het histidineresidu [3]. Het ergogene effect van bèta-alaninesuppletie is waarschijnlijk ook voornamelijk gestoeld op een verbetering van de pH-buffercapaciteit. De bèta-alaninebeschikbaarheid is zodoende limiterend voor de synthese van carnosine, hetgeen bèta-alaninesuppletie interessant maakt. Carnosine zelf zou ook gesuppleerd kunnen worden, gezien dit afgebroken wordt tot bèta-alanine en L-histidine door carnosinases. Echter is carnosine duurder om te produceren, wat het minder kosteneffectief maakt. Carnosine komt in een vrij hoge concentratie voor in spiercellen, variërend van 10



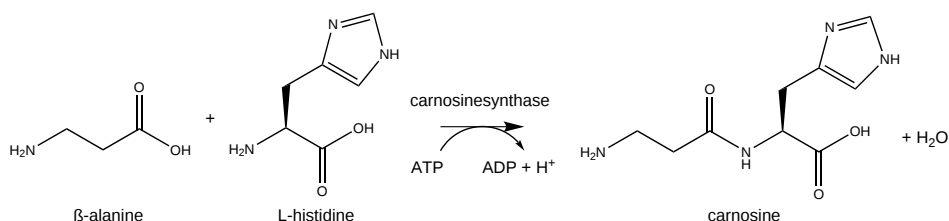
Figuur 5.1: Structuurformule van carnosine. In het rood weergegeven is het bèta-alanineresidu en in het blauw het L-histidineresidu. De imidazolgroep heeft een pKa-waarde van 6.83.

tot 40 mmol per kg droge spiermassa [448]. Dit is vergelijkbaar met de concentratie van creatinefosfaat in spiercellen.

5.1.1 Biosynthese

Bèta-alanine vormt, samen met L-histidine, de precursor voor de dipeptide carnosine. Omdat het effect van bèta-alanine te danken is aan de productie van carnosine, wordt in deze sectie vooral de biosynthese van carnosine behandeld. Het enzym carnosinesynthase is hier verantwoordelijk voor (zie figuur 5.2). De twee substraten voor dit enzym zijn bèta-alanine en L-histidine. Ook verbruikt het enzym een ATP-molecuul om de reactie te katalyseren [131]. De K_M -waarden van carnosinesynthase voor de twee substraten zijn geschat op 16 μM en 1.8 mM voor respectievelijk L-histidine [222] en bèta-alanine [260]. De beschikbaarheid van bèta-alanine vormt dan ook de limiterende factor voor de synthese van carnosine.

Suppletie van bèta-alanine of carnosine aan muizen leidt tot een verhoogde expressie van carnosinesynthase [314]. Bèta-alanine kan *de novo* worden aangemaakt in de lever door degradatie van uracil [300]. Normaal gesproken is de meeste bèta-alanine echter afkomstig uit het dieet in de vorm van carnosine. Carnosine is vooral te vinden in vlees en vis en men krijgt bij een normaal dieet circa 0.3 g bèta-alanine per dag binnen uit deze bronnen [29]. Suppletie van bèta-alanine bevordert de carnosinesynthase in spiercellen, zoals in 2006 aangetoond door Roger C. Harris en zijn collega's [197]. In deze studie kregen proefpersonen 4 weken lang 6.4 g bèta-alanine per dag gesuppleerd, waardoor de intramusculaire carnosineconcentratie met circa 65% steeg.



Figuur 5.2: De carnosinesynthase. Bèta-alanine en L-histidine zijn de twee substraten voor het enzym carnosinesynthase, dat carnosine vormt. De reactie wordt voorzien van energie door hydrolyse van een ATP-molecuul.

5.1.2 Absorptie

Bèta-alanine komt in de vorm van carnosine voor in de voeding. Het is met name te vinden in vlees en vis, zoals eerder genoemd. Vegetariërs hebben dan ook een lagere hoeveelheid carnosine in de spieren dan omnivoren [146]. Na inname van een carnosinebron via de mond komt deze in het darmstelsel terecht. Vanuit het darmstelsel wordt carnosine opgenomen door de enterocyten die de darmwand bekleeden. Dit transport wordt waarschijnlijk verzorgd door het eiwit PEPT1, die carnosine samen met een proton langs de *brush border* leidt (de membraan aan de apicale zijde van de enterocyten) [421]. In de enterocyten wordt vervolgens al een deel van de carnosine gehydrolyseerd. Onderzoek van

SKPT-cellen (niercellen) laat een lage efflux van carnosine zien aan de basolaterale zijde [240]. Mocht dit ook *in vivo* het geval zijn bij enterocyten, dan belandt slechts een klein deel van de door de darm opgenomen carnosine intact in de circulatie. De carnosine wordt door enzymen in de enterocyten afgebroken tot L-histidine en bèta-alanine. Deze afbraak wordt gekatalyseerd door carnosinases [39]. Het is onbekend of paracellulair transport van carnosine ook een rol van betekenis heeft bij de opname vanuit het darmlumen. Het overblijvende carnosine belandt in de circulatie nadat het langs de basolaterale membraan is getransporteerd. In de circulatie bevinden zich ook carnosinases die verder leiden tot afbraak van de ingenomen carnosine.

In een experiment waarbij proefpersonen 200 g rundergehakt kregen (circa 248 mg carnosine) werd na 3.5 uur een piekconcentratie gemeten van 32.7 mg carnosine per liter bloedplasma [344]. Na 5.5 uur was er geen carnosine meer detecteerbaar in het bloedplasma. Een gemiddeld persoon heeft circa 5 liter bloed door zijn vaatstelsel stromen en zo'n 55% daarvan beslaat het bloedplasma. In totaal dus iets meer dan 2.5 liter bloedplasma. Dit betekent dat er ruwweg zo'n 100 mg carnosine in de circulatie van de proefpersonen aanwezig was toen de piekconcentratie werd gemeten. Deze gegevens doen concluderen dat een flink deel van de carnosine na opname door het darmstelsel toch nog intact de bloedstroom bereikt. Echter, om nuttig te zijn voor een verhoging van de carnosineconcentratie in spiercellen, dient het alsnog gehydrolyseerd te worden. De opname van intacte carnosine door spiercellen is namelijk zeer laag [37].

De absorptie van bèta-alanine is dus cruciaal om de carnosineconcentratie in spiercellen te verhogen. Bèta-alanine wordt geabsorbeerd aan de apicale zijde van enterocyten door twee transporters [66]. Een transporter met hoge affiniteit en lage capaciteit die Na^+ - en Cl^- -afhankelijk is, en een transporter met lage affiniteit en hoge capaciteit die protonafhankelijk is. Deze laatste verzorgt ook het transport van andere aminozuren en derivaten hiervan waaronder trimethylglycine. Zodra bèta-alanine in de circulatie belandt, kan het opgenomen worden door de spiercellen, zodat het door carnosinesynthase samen met L-histidine carnosine kan vormen. De opname door spiercellen wordt waarschijnlijk ook verzorgd door Na^+ - en Cl^- -afhankelijk transport [30]. Recentelijk bevestigden onderzoekers de aanwezigheid van de Na^+ - en Cl^- -afhankelijke transporter TauT (taurine-transporter) in de m. gastrocnemius van mensen [145]. Ook toonden zij de aanwezigheid aan van de transporter PAT1 (Eng.: *proton-coupled amino acid transporter 1*), een proton-gekoppelde aminozuurtransporter. TauT-mRNA-expressie bleek tevens verhoogd na acht weken bèta-alaninesuppletie in muizen [145].

Het laden van carnosine in spierweefsel lijkt een lineaire dosisresponsrelatie te volgen [429]. Dit betekent dat de totale ingenomen hoeveelheid bèta-alanine primair bepalend is voor de stijging van de carnosineconcentratie in spiercellen. Opmerkelijk genoeg is de stijging van deze concentratie veel lager dan je zou verwachten op basis van de ingenomen hoeveelheid bèta-alanine. In een studie werd berekend dat slechts circa 2.8% van de gesuppleerde bèta-alanine als carnosine in spierweefsel werd geïncorporeerd [428]. Het loont dus om naar manieren te zoeken die de opslag van gesuppleerde bèta-alanine als carnosine in spierweefsel bevorderen.

De onderzoekers van diezelfde studie hypothetiseerden dat, net als bij creatine het geval is, insuline de opname zou kunnen verbeteren. De bèta-alaninetransporter TauT is immers Na^+ -afhankelijk en insuline stimuleert de natriumkaliumpomp-activiteit, waarschijnlijk doordat insuline zorgt voor translocatie van natriumkaliumpompen naar het sarcolemma [432]. Dit stimuleert vervolgens het secundair transport van natriumafhankelijke trans-

porters, zoals de TauT. De onderzoekers toetsten deze hypothese door proefpersonen bèta-alanine te geven bij twee maaltijden, zodat de stijging van bèta-alanine in de circulatie samenviel met een stijging van de seruminsulineconcentratie. Het samennemen met een maaltijd leidde inderdaad tot een grotere stijging van de intramusculaire carnosineconcentratie in de soleusspier, maar niet in de gastrocnemiuspier. Er wordt aangenomen dat dit komt doordat de insuline-gemedieerde translocatie van natriumkaliumpompen naar het sarcolemma alleen plaats lijkt te vinden in oxidatieve spiervezels, en niet in glycolytische spiervezels [275]. De soleusspier beschikt met name over veel oxidatieve spiervezels [171]. Eerder onderzoek bij ratten toonde ook aan dat met name de spieren die beschikten over veel oxidatieve spiervezels gevoeliger waren voor de effecten van insuline [239]. Desalniettemin lijkt de gastrocnemius ook voor een groot deel uit oxidatieve spiervezels te bestaan [110]. Derhalve is het niet goed duidelijk wat het verschil heeft veroorzaakt.

Naast het combineren met een insulinogene maaltijd, is er ook bewijs dat het trainen van een spier an sich de opslag van gesuppleerd bèta-alanine als carnosine in spierweefsel verbetert [41]. De combinatie van een training en maaltijd verbetert de opslag misschien nog wel het beste. Zo wordt een verbetering geobserveerd van 2.39% opslag als carnosine in het spierweefsel zonder maaltijd of training, tegenover 5.65 tot 5.82% met maaltijd en training [52].

5.1.3 Metabolisme en excretie

De retentie van bèta-alanine is vrij hoog (97–98%), maar slechts een fractie hiervan wordt als carnosine in het spierweefsel opgeslagen [428, 52]. Het zou kunnen dat andere weefsels dan het spierweefsel ook een deel van de ingenomen bèta-alanine opslaan als carnosine. De absolute hoeveelheid carnosine in andere weefsels is echter aanzienlijk lager [152]. De hoeveelheid in het spierweefsel is veel groter dan in de andere weefsels. Zo bevat spierweefsel 5–8 mmol carnosine per kg [124]. De molaire massa van carnosine is 226.23 g/mol. Uitgaande van een persoon van 70 kg, bij wie de spiermassa 40% van het totale lichaamsgewicht beslaat (28 kg), bevat de volledige spiermassa 31.7–50.7 g carnosine. Ter vergelijking: de nier bevat ongeveer 61 mcg carnosine per g [152]. Uitgaande van een gewicht van 150 g per nier, beslaat de totale hoeveelheid carnosine in de nieren slechts 0.02 g. Gelijkende hoeveelheden vindt men in het hart, de maag en het jejunum [152]. Met name om deze reden is het aannemelijk dat het merendeel van de bèta-alanine die niet in het spierweefsel wordt opgeslagen als carnosine wordt gemetaboliseerd en niet elders in het lichaam wordt opgeslagen.

Er wordt aangenomen dat een flink deel van de ingenomen bèta-alanine simpelweg geoxideerd wordt [428]. Onderzoek bij ratten heeft inderdaad aangetoond dat meer dan 70% van de toegediende bèta-alanine werd afgebroken tot kooldioxide en een gedeelte ook geïncorporeerd werd in acetylhoudende substanties zoals vetzuren en cholesterol [181]. Om als substraat te fungeren van de citroenzuurcyclus (zie sectie 2.4.1) moet bèta-alanine ontdaan worden van zijn aminogroep. Dit wordt verzorgd door het enzym GABA-transaminase, die de transaminatiereactie katalyseert [181, 42]. Tevens wordt de mRNA-expressie van het enzym geüpereguleerd in spiercellen door bèta-alaninesuppletie [145]. Het product van deze transaminatiereactie is malonzuursemi-aldehyde dat verder gemetaboliseerd kan worden tot acetyl-CoA of acetaldehyde [181].

De afbraak van intramusculair carnosine verloopt zeer traag. Nadat er wordt gestopt met bèta-alaninesuppletie neemt de carnosineconcentratie met 2–4% per week af [29, 429]. Na een stijging van circa 30 tot 45% van de intramusculaire carnosineconcentratie wordt

dan ook geschat dat een rustperiode (Eng.: *washout period*) van 15 tot 20 weken benodigd is voor het uitvoeren van een betrouwbare cross-over opgezette klinische studie [429].

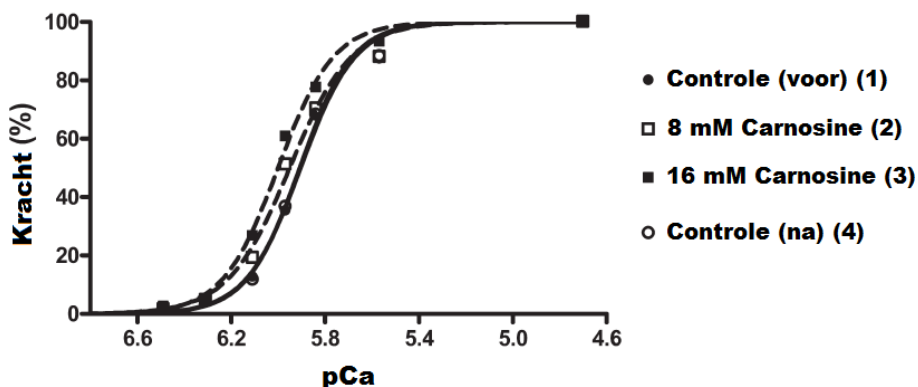
5.2 Werkingsmechanisme

Al sinds het begin van de ontdekking van carnosine heeft het onderzoek naar de fysiologische rol ervan zich geconcentreerd op spierweefsel. Desondanks is tot de dag van vandaag nog steeds niet goed bekend wat de belangrijkste rol van carnosine in spierweefsel is. De meest voor de hand liggende rol van carnosine in spierweefsel is te danken aan de imidazolgroep waarover de dipeptide beschikt. Deze imidazolgroep heeft een pKa-waarde van 6.83. Dit maakt het ideaal om als pH-buffer te fungeren en zo een stijgende concentratie protonen op te vangen. Een andere rol van carnosine lijkt te liggen in regulering van de excitatie-contractiekoppeling die de spiercontractie in gang zet (zie sectie 1.3). Hierbij worden Ca^{2+} -ionen uit het sarcoplasmatisch reticulum (SR) vrijgemaakt. Het Ca^{2+} kan vervolgens binden aan troponine C, waardoor myosine en actine kruisbruggen kunnen vormen en zo de spier kunnen laten samentrekken. Recentelijk is een hypothese voorgesteld die de regulatie van Ca^{2+} - en H^+ -ionen verenigt in één werkingsmechanisme [434].

5.2.1 pH-buffer

Tijdens een intensieve inspanning wordt er veel ATP gehydrolyseerd door de myosine-ATPases om de sarcomeren van de spier te laten samentrekken (zie ook hoofdstuk 2, vergelijking 2.1). Een product van deze reactie is een proton (H^+). Bij een laag energieverbruik worden (bijna) alle protonen die voortkomen uit de ATP-hydrolyse gebruikt in de mitochondria voor de ademhalingsketen. Echter, bij een hoog energieverbruik waarbij de ATP-omzet in het cytosol de productie van ATP in de mitochondria overschrijdt, kan er opstapeling van deze protonen plaatsvinden met verzuring van de spier als gevolg. Een gedeelte van de protonen wordt opgevangen door productie van lactaat, doordat deze reactie één proton consumeert (zie ook sectie 2.3.1). Ook wordt een gedeelte gebufferd door de geproduceerde P_i . Hoewel P_i en H^+ in een 1:1-ratio worden geproduceerd door ATP-hydrolyse, tezamen met ADP, worden alleen ADP en P_i gebruikt als substraten voor de glycolyse en H^+ niet (zie hoofdstuk 2, vergelijking 2.3). Hierdoor ontstaat een overschot aan H^+ die niet gebufferd kan worden door het gegenereerde P_i van dezelfde reactie. Tevens wordt er een proton gegenereerd wanneer glycogeen wordt gebruikt voor de glycolyse, en twee protonen wanneer glucose het substraat vormt [384]. Als resultaat zal de pH-waarde in de spiercel dalen.

Bèta-alanine beschikt over een imidazolgroep met een pKa-waarde van circa 6.8, waardoor deze kan fungeren als protonbuffer in de spiercellen. Over het algemeen wordt aangenomen dat een daling van de pH-waarde in een spiercel zorgt voor slechtere prestaties. Het negatieve effect van een door inspanning veroorzaakte verzuring op de contractiele eigenschappen lijkt echter vrij gering [10]. Desalniettemin hebben voedingssupplementen die inspelen op een daling van de pH-waarde in spiercellen die optreedt bij inspanning veel aandacht gekregen van onderzoekers, waaronder bèta-alanine. In een klinische studie werd een positieve correlatie gevonden tussen de intramusculaire carnosineconcentratie en de *in vitro*-buffercapaciteit [28]. Hierbij wordt een spierbiopt afgenomen en vervolgens gehomogeniseerd. Daarna wordt gekeken hoeveel protonen benodigd zijn om de pH-waarde van 7.1 naar 6.5 te brengen. Er werd echter geen bèta-alanine gesuppleerd in deze



Figuur 5.3: De kracht-pCa-curve in menselijke spiervezels na toevoeging van carnosine in twee verschillende concentraties (8 mM en 16 mM). De Ca^{2+} -gevoeligheid van het contractiele apparaat is toegenomen na toevoeging van carnosine, omdat de curve naar links is verschoven. Analooq aan het gebruik van pH voor de H^{+} -concentratie drukt pCa de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie uit als negatief logaritme van de Ca^{2+} -concentratie in mol/l. Figuur aangepast uit Dutka e.a. [136].

studie. In een andere studie gebeurde dit wel, hierbij werd geen verschil gevonden in de *in vitro*-buffercapaciteit tussen de groep die bèta-alanine kreeg en de groep die een placebo kreeg [183]. *In vivo* wordt de buffercapaciteit van carnosine in mensen geschat op circa 7% van het totaal [295]. Al met al lijkt de pH-buffercapaciteit an sich vrij bescheiden.

5.2.2 Verhoogde Ca^{2+} -gevoeligheid

Zoals behandeld in secties 1.2 en 1.3, initieert een stijging van de Ca^{2+} -concentratie in spiercellen de spiercontractie. De calciumionen binden aan troponine C, waardoor bindplaatsen op het actine beschikbaar komen om kruisbruggen te vormen met de myosinehoofden. Hoe hoger de Ca^{2+} -concentratie, hoe meer kruisbruggen er gevormd kunnen worden. De Ca^{2+} -concentratie is daarmee bepalend voor de uiteindelijke krachtproductie van een spiercel, het aantal gevormde kruisbruggen dicteert immers de contractiekracht. Als de Ca^{2+} -concentratie wordt uitgezet tegen de relatieve contractiekracht vormt zich een logaritmische curve, waarbij de drempelwaarde voor contractie ligt bij een Ca^{2+} -concentratie van circa 10^{-7} mol/l, en de maximale contractie wordt bereikt bij een concentratie van circa 10^{-4} mol/l. Onderzoek van humane type 1- en type 2-spiervvezels suggereert dat bèta-alaninesuppletie deze curve naar links kan verschuiven [136]. Dit houdt in dat bij eenzelfde Ca^{2+} -concentratie er meer kruisbruggen worden gevormd. Zo zorgt een Ca^{2+} -concentratie die leidt tot het behalen van 50% van de maximale krachtlevering bij een hogere carnosineconcentratie ervoor dat 60% van de maximale krachtlevering wordt behaald. Met dezelfde Ca^{2+} -concentratie wordt dus meer kracht geleverd bij submaximale inspanningen. Dit zou er mogelijk voor kunnen zorgen dat een atleet minder snel prestatieverlies zal lijden bij dit soort inspanningen. De verhoogde Ca^{2+} -gevoeligheid van het contractiele apparaat bij een hogere carnosineconcentratie is misschien te danken aan een rol van carnosine als shuttlesysteem. Deze rol wordt behandeld in sectie 5.2.3.

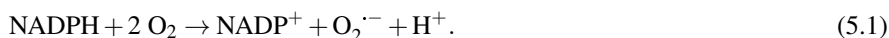
5.2.3 Carnosineshuttlehypothese

Recentelijk is een hypothese geformuleerd die de rol van carnosine als pH-buffer en Ca^{2+} -regelaar verenigt. Gezien zowel protonen als calciumionen kunnen binnen aan carnosine, stelden Swietach e.a. dat carnosine fungeert als een diffunderende $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -wisselaar [434, 433]. Beide ionen komen zelf nagenoeg niet in vrije vorm voor in het cytoplasma, waardoor zij voor diffusie afhankelijk zijn van dragermoleculen. Tijdens contractie komen er protonen vrij van de ATP-hydrolyse door de ATPases van de myosinehoofden. Zo ontstaat een grote concentratie van protonen in de nabijheid van de sarcomeren. Deze hogere protonconcentratie (en dus lokaal lagere pH-waarde) bevordert de protonering van moleculen, waaronder carnosine. Dit zorgt voor een ontlading van calciumionen, die eveneens aan carnosine binden. Anderzijds zorgt geleiding van het actiepotentiaal dat de spiercontractie initieert voor een uitstroom van calciumionen uit het sarcoplasmatisch reticulum. Deze sterke stijging van de Ca^{2+} -concentratie zorgt juist voor het tegengestelde proces: het 'laden' van carnosine met calciumionen, en ontlading van de protonen. Samenvattend vormt carnosine, als kleine dipeptide, de mobiele buffer voor deze moleculen in de cel, waardoor er een snelle uitwisseling tussen de celcompartimenten hiervan kan plaatsvinden. Mogelijk is dit een belangrijk mechanisme dat verantwoordelijk is voor de ergogene effecten van het laden van carnosine in de spieren [52].

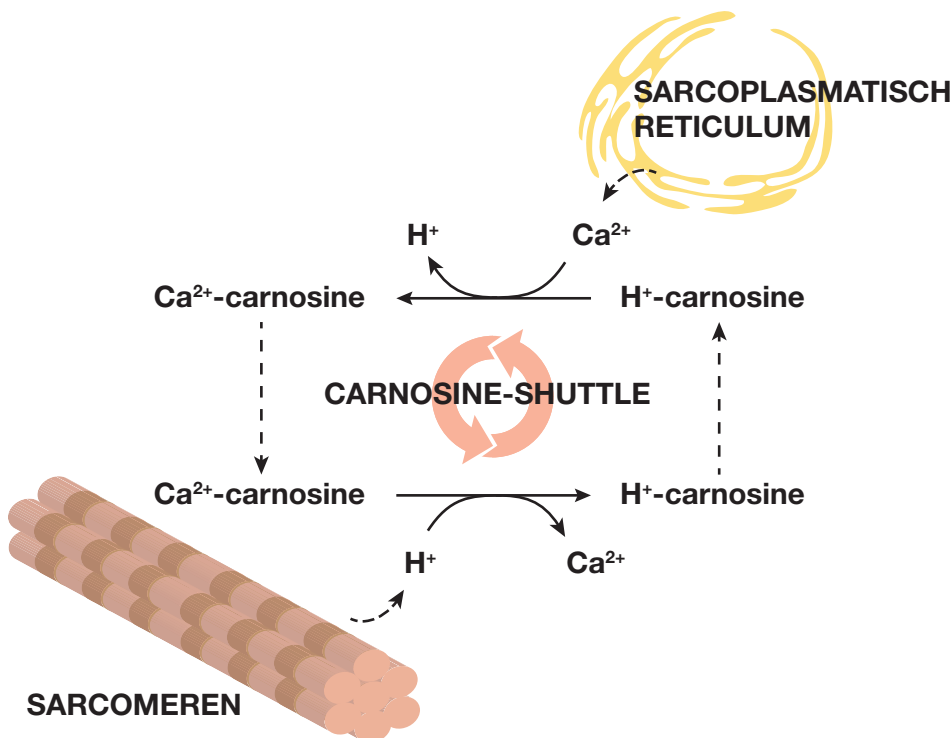
5.2.4 Antioxidante activiteit

Tijdens spiercontractie worden er meer reactieve zuurstofverbindingen (ROS, Eng.: *reactive oxygen species*) en reactieve stikstofverbindingen (RNS, Eng.: *reactive nitrogen species*) gegenereerd dan in rust [363]. Dit zijn moleculen die bijzonder reactief zijn, waardoor zij reageren met andere moleculen aanwezig in een cel, zoals lipiden, eiwitten, koolhydraten en nucleïnezuuren, en hierdoor schade berokkenen. Bijgevolg staan deze reactieve verbindingen op de voorgrond van verschillende ziektebeelden. Desalniettemin spelen zij ook een belangrijke rol voor het normaal functioneren van vele vitale processen [65]. Daarnaast spelen zij een belangrijke rol bij uitputting van de spier.

De reactieve verbindingen kunnen afkomstig zijn van de ademhalingsketen en verscheidene andere enzym-gekatalyseerde reacties die betrokken zijn bij het celmetabolisme, maar ook van straling. Desalniettemin is de primaire bron van intracellulair ROS in de meeste cellen de mitochondria en afkomstig van de ademhalingsketen [31]. Hierbij ontstaat met name superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) door het lekken van elektronen uit de ademhalingsketen op O_2 . De reactie wordt gekatalyseerd door NADPH-oxidase (NOX) en NADPH vormt het reducerend agens. Hoewel superoxide an sich geen sterke oxidant vormt, is het wel de precursor voor vele andere ROS en is daarmee betrokken bij oxidatieve kettingreacties [452]. Het moet echter opgemerkt worden dat er geen vaste relatie lijkt te bestaan tussen het mitochondriale zuurstofverbruik en $\text{O}_2^{\cdot-}$ -productie, waardoor het geen juiste aanname is dat de productie hiervan stijgt in de mitochondria wanneer er een toename van het zuurstofverbruik door spiercontractie plaatsvindt [90]. De belangrijkste bron van $\text{O}_2^{\cdot-}$ in spiercellen zijn waarschijnlijk NOX-enzymen [395]. Deze enzymen katalyseren de reductie van moleculair zuurstof tot superoxide met NADPH als reducerend agens. De reactie gekatalyseerd door NOX is weergegeven in vergelijking 5.1:



De NOX-enzymen komen op verschillende plekken voor in een spiercel. Naast de



Figuur 5.4: De carnosineshuttlehypothese. Carnosine kan als diffunderende $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -wisselaar dienen tussen de sarcomeren en het sarcoplasmatisch reticulum. Hierbij voert het calciumionen aan en protonen af van de sarcomeren. Figuur gebaseerd op Blancquaert e.a. [52].

mitochondria komen zij ook voor in het sarcolemma, de T-tubuli en het sarcoplasmatisch reticulum. Dit betekent dat superoxide die is gegenereerd door NOX-enzymen zich ook buiten de mitochondria bevindt, en daardoor een ander effect heeft op de cel dan mitochondriaal geproduceerd superoxide. Dit is een belangrijk punt, aangezien de subcellulaire locatie van ROS belangrijk is voor het positieve, dan wel negatieve effect op de spieren. Hoewel men er vroeger van uitging dat iedere stijging van ROS of RNS schadelijk was voor cellen en betrokken is bij uitputting van de spieren, is er tegenwoordig meer dan voldoende bewijs dat aantoont dat deze aanname te simplistisch is. Stijgingen van ROS of RNS spelen namelijk ook een belangrijke rol bij adaptatie van de spiercellen op inspanning, en in sommige gevallen is aangetoond dat suppletie van antioxidanten een negatief effect heeft op de adaptatie bij hoge-intensiteits training [310]. Desalniettemin wordt aangedragen dat de antioxidante werking van carnosine [261] mogelijk voordelig is [448]. Er is echter nooit direct onderzocht of dit een rol speelt bij het ergogene effect van bèta-alanine. Dergelijk onderzoek is zeer zeker noodzakelijk, gezien de complexe rol die ROS en RNS hebben in spiercellen, zoals besproken.

5.3 Klinische resultaten

Slechts een klein aantal klinische studies heeft gekeken naar het effect van bèta-alanine op de lichaamscompositie of krachtprestaties. Gezien de voorgestelde rol als pH-buffer is men met name geïnteresseerd geweest in het effect hiervan op sporten waarbij verzuring beperkend kan zijn. Denk hierbij aan roeien, sprinten, fietsen en andere sporten waarbij vaak meer dan een minuut achtereen een intensieve sportprestatie geleverd moet worden. Een in 2012 gepubliceerde meta-analyse concludeerde dan ook dat bèta-alaninesuppletie een positief effect heeft op de sportprestaties wanneer de inspanning langer dan één minuut duurde [213]. Bij korter durende inspanningen werd geen voordeel gevonden. Een recentere meta-analyse uit 2016 concludeert dat bèta-alanine vooral effectief is bij inspanningen met een duur van 0.5 tot 10 minuten [403]. Kortere durende inspanningen vertonen duidelijk geen voordeel.

Studies waarbij bèta-alaninesuppletie gecombineerd werd met krachttraining zijn beperkt. Een eerste studie gepubliceerd in 2006 onderzocht het effect van bèta-alaninesuppletie in combinatie met creatine (CA) ten opzichte van alléén creatine (C) of een placebo (P) [214]. De proefpersonen hadden tenminste twee jaar krachttrainingervaring en tijdens de tien weken durende interventie werd er viermaal per week getraind. Als maatstaf van kracht werden de 1-RM (1-herhalingsmaximum) bankdrukken en squat gehanteerd. De lichaamscompositie werd bepaald door middel van een *dual-energy X-ray* absorptiometrie (DXA)-scan. Er werd een significante daling in het lichaamsvetpercentage en stijging van de magere lichaamsmassa (LBM, Eng.: *lean body mass*) gevonden in de CA-groep ten opzichte van de P-groep. Zowel de CA- als de C-groep lieten een significante stijging zien in de 1-RM bankdrukken en squat ten opzichte van de P-groep. Verder waren het squat- en bankdrukvolume significant groter in de CA-groep ten opzichte van de P-groep. Deze resultaten suggereren dat bèta-alanine in combinatie met creatine mogelijk kan helpen bij het behalen van een hoger trainingsvolume. Dit hogere trainingsvolume zou zich dan mogelijk kunnen vertalen naar meer spiergroei. Problematisch is echter de afwezigheid van een groep die alleen bèta-alanine gesuppleerd kreeg.

Kendrick e.a. combineerden eveneens een tien weken durend krachttrainingsprogramma met bèta-alaninesuppletie [255]. In tegenstelling tot de eerdere studie van Hoffman e.a. werd deze keer het supplement niet gecombineerd met creatine. De proefpersonen waren jonge Vietnamese studenten lichamelijke opvoeding. Zij werden onderverdeeld in een bèta-alaninegroep die 6.4 g per dag gesuppleerd kreeg, en een placebogroep. Er werd tien weken lang een krachttrainingsschema gevolgd, waarbij vier dagen per week werd getraind. Na deze tien weken was de lichaamskracht (bepaald aan de hand van een 1-RM bankdrukken, box squat en deadlift) in beide groepen verbeterd, maar er werd geen significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden. Hetzelfde resultaat werd gevonden voor vermoeidheidsresistentie (Eng.: *fatigue resistance*) en de lichaamscompositie. De lichaamscompositie was in deze studie bepaald met een huidcaliper. Spierbiopten bevestigden wel een significante stijging van de spiercarnosineconcentratie in de suppletiegroep ten opzichte van de placebogroep. Deze resultaten suggereren dat bèta-alaninesuppletie an sich geen effect heeft op kracht, vermoeidheidsresistentie of de lichaamscompositie bij beginners in een tijdsbestek van tien weken.

Ander onderzoek bij rugbyspelers rapporteerde echter een significant lager gevoel van vermoeidheid en een trend ($P = 0.09$) voor een hoger trainingsvolume in de bèta-alaninegroep ten opzichte van de placebogroep. Mogelijk spelen de trainingsstatus en het totale volume hierbij een rol.

Een onderzoek verricht op worstelaars uit het hoger onderwijs liet een verrassend effect zien op de lichaamscompositie [256]. De meeste worstelaars die deelnamen probeerden gewicht te verliezen. Er werd in totaal acht weken een krachttrainingsprogramma gevolgd, waarbij driemaal per week werd getraind. In zowel de placebogroep als de bèta-alaninegroep werd vet verloren en LBM gewonnen (bepaald met een huidcaliper). De stijging van de LBM was echter het grootst in de bèta-alaninegroep (1 kg vs. 0.5 kg). De calorie-inname lag echter lager in de placebogroep (21.9 kcal/kg lgw) vergeleken met de bèta-alaninegroep (25.7 kcal/kg lgw). Dit zou de lagere LBM-winst in de placebogroep kunnen verklaren. Een studie waarbij HIIT-training gecombineerd werd met bèta-alanine of een placebo, liet een significante tijdinteractie voor de LBM (bepaald met een BODPOD) zien in de suppletiegroep die niet werd gevonden in de placebogroep [418].

Het positieve effect op de lichaamscompositie dat soms wordt gevonden zou enerzijds kunnen komen door het verbeteren van het totale trainingsvolume. Dit zou op zijn beurt kunnen leiden tot meer spierhypertrofie. Een alternatieve verklaring zou kunnen zijn dat het komt door de verhoogde spiercarnosineconcentratie an sich. De concentratiestijging is vergelijkbaar met creatine en kan zodoende leiden tot een verhoogde osmolaliteit. Dit resulteert in het aanzuigen van water door de spiercellen. (Een uitleg van osmose is gegeven in kader 11.1.)

5.4 Veiligheid

Er is momenteel te weinig data om te stellen dat langdurig bèta-alaninegebruik veilig is. Langetermijnstudies ontbreken namelijk. Wel zijn er enkele kortetermijnstudies gedaan. Een studie waarbij een kleine groep gezonde mannen 4 weken lang 3.2 g bèta-alanine suppleerde per dag liet geen significante veranderingen zien in biochemische en hematologische bloedwaarden ten opzichte van de placebogroep [197]. Later onderzoek door Stellingwerff e.a. bevestigde deze resultaten [429]. Het aantal deelnemers van deze studie was iets groter ($n = 31$) en bèta-alanine werd acht weken lang gebruikt. Naast de placebo-groep waren er twee groepen die bèta-kregen met een vertraagde afgifte. De ene groep kreeg de eerste 4 weken 3.2 g bèta-alanine per dag en de laatste 4 weken 1.6 g bèta-alanine per dag, de andere groep kreeg 1.6 g bèta-alanine per dag vanaf het begin. Ook hierbij werden geen afwijkingen gevonden in biochemische en hematologische bloedwaarden.

Op het moment lijkt de enige gerapporteerde bijwerking van bèta-alaninegebruik paresthesie. Dit voelt als speldenprikjes op de huid of tintelingen, maar wordt soms ook omschreven als een brandend gevoel. Het is vooralsnog niet goed duidelijk waardoor bèta-alanine dit veroorzaakt, maar het is gehypothetiseerd dat bèta-alanine bindt aan een G-proteïnegekoppeldereceptor gelegen op neuronen die de huid innervieren [417, 448]. Gezien de pH-bufferende capaciteit van bèta-alanine door vorming van carnosine, zou het ook mogelijk kunnen zijn dat een kortdurende alkalose wordt uitgelokt in deze neuronen. Een alkalose kan tevens leiden tot paresthesie (zoals bij hyperventileren). Geen van deze hypothesen is echter direct getoetst, en de oorzaak is dus vooralsnog speculatief. Er wordt aangenomen dat de paresthesie onschadelijk is. Een spreiding van een bèta-alaninedosis over meerdere kleinere doseringen zou de paresthesie kunnen verminderen. Ook is bèta-alanine beschikbaar als supplement met een vertraagde afgifte, wat zou kunnen helpen tegen de paresthesie [117].

Tot slot is er een zorg over belemmering van taurineopname door bèta-alaninesuppletie. Zowel taurine en bèta-alanine zijn β -aminozuren en delen dezelfde transporter. Hierdoor

zou er competitieve inhibitie kunnen optreden van taurineopname door een toename van bèta-alanine in de circulatie. In een dierstudie werd er bèta-alanine toegevoegd aan het drinkwater van katten [287]. Na twintig weken was er een vermindering van de taurineconcentratie in de hersenen en was er schade berokkend aan de kleine hersenen (het cerebellum). De hoeveelheid bèta-alanine die de katten kregen was echter vrij fors, zo'n 500 g verdeeld over twintig weken. Bovendien is taurine een essentieel aminozuur voor katten, maar niet voor de mens. Desalniettemin is bèta-alanine, in grote hoeveelheden, in verschillende diermodellen in staat om taurinedeficiëntie te veroorzaken. In de klinische studie uitgevoerd door Harris e.a. werd, ondanks een verhoogde taurineplasmaconcentratie, geen significante stijging van taurineverlies in de urine gemeten [197]. Ook bij wielrenners die tien weken lang bèta-alanine kregen, werd geen verandering gevonden van de taurineconcentratie in de spiercellen [210]. Symptomen van taurinedeficiëntie, zoals spierkrampen, zijn tot op heden ook niet vermeld in klinische studies. Het klinisch onderzoek naar het effect van langdurig bèta-alaninegebruik op de taurinehuishouding is echter beperkt. Tevens ontbreekt data van bijvoorbeeld de taurineconcentratie in andere weefsels, zoals het hartweefsel, bij bèta-alaninegebruik. Voorzichtigheid lijkt daarom, door gebrek aan data, geboden bij suppletie op de lange termijn.

5.5 Conclusie

Bèta-alanine is in staat om de carnosineconcentratie in de spieren flink te verhogen. Hiermee weet het de pH-buffercapaciteit van de spieren te verbeteren. Het supplement lijkt hierdoor vooral effectief bij inspanning waarbij verzuring beperkend kan zijn. Voor het winnen van spierkracht is het waarschijnlijk niet effectief. Mogelijk kan het gebruik ervan wel zorgen dat het trainingsvolume verhoogd wordt. Ook zijn er enige aanwijzingen dat suppletie de lichaamscompositie verbetert. Het mechanisme hiervoor is onzeker.

Een gangbare dosering ligt rond de 3-6 g per dag. De hoeveelheid die effectief in de spiercellen wordt opgeslagen als carnosine is vrij laag. Een verbeterde efficiëntie zou behaald kunnen worden door de inname te combineren met een (insulinogene) maaltijd. Het trainen van de spieren an sich verbetert wellicht ook de opslag van bèta-alanine als carnosine.

Veel mensen ervaren paresthesie (speldenprikjes) bij het gebruik van bèta-alanine. Dit lijkt de enige bijwerking van bèta-alanine te zijn. Paresthesie kan voorkomen of verminderd worden door de dosering te spreiden over de dag en het mijden van inname op een nuchtere maag. Bovendien is er een commercieel verkrijgbare vorm van bèta-alanine die vertraagd wordt afgegeven aan de circulatie, wat ook zou kunnen helpen. Langetermijnstudies naar de veiligheid van het middel ontbreken echter.

6. Bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB)

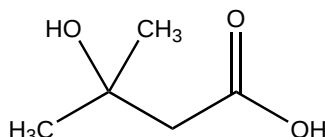
6.1 Inleiding

Bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB) is een metaboliet van het essentiële aminozuur leucine. Leucine behoort tot de vertakte keten aminozuren (BCAAs, Eng.: *branched-chain amino acids*) en wordt beschouwd als een belangrijk aminozuur voor stimulering van de eiwitsynthese, als ook remming van de eiwitafbraak [129].

In 1975 werd leucine voor het eerst naar voren geschoven als belangrijke regulator van de eiwit-omzet in spierweefsel [76]. In dit onderzoek werd ontdekt dat extracellulair leucine, maar niet isoleucine of valine (eveneens BCAAs), de eiwitsynthese verhoogde en de eiwitafbraak verlaagde in het hemidiafragma van ratten.

Door deze rol van leucine in het aminozuurmetabolisme werden ook de metabolieten ervan onder de loep gelegd. Gebaseerd op dierstudies hypothesiseerden Nissen e.a. dat het leucinemetaboliet HMB verantwoordelijk was voor het remmende effect op de eiwitafbraak [331]. Om deze hypothese te toetsen voerden zij twee experimenten uit waarbij HMB werd gesuppleerd aan mannen.

In het eerste experiment werden de proefpersonen willekeurig toegewezen aan 0, 1.5 of 3.0 g HMB-suppletie per dag en 117 of 175 g eiwit per dag. De proefpersonen deden 3 dagen per week aan krachttraining tijdens de 3 weken durende studie. De excretie van 3-methylhistidine (3-MH) in de urine werd gebruikt als surrogaatmarker voor de



Figuur 6.1: Structuurformule van bèta-hydroxy-bèta-methylbutaanzuur (HMB). Onder fysiologische omstandigheden is de carboxylgroep (-COOH) gedeprotoniseerd.

spiereiwitafbraak (zie kader 6.1). Er was na 1 week een trend ($P = 0.13$) naar een lineair effect van HMB op remming van 3-MH-excretie (deze steeg in alle groepen door de krachttraining), en na week 2 werd statistische significantie bereikt. Het effect was verdwenen na week 3. Bovendien werd een statistisch significant effect van HMB op de spierkracht gemeten ten opzichte van de controlegroep.¹

In het tweede experiment werd er 6 dagen per week aan krachttraining gedaan, en ten minste driemaal per week aerobe training. De studieduur was ditmaal 7 weken en de onderzoekers keken in het bijzonder naar het effect van HMB-suppletie op de lichaamscompositie. Deze werd bepaald middels bio-elektrische impedantie-analyse (BIA). Vanaf dag 14 tot en met dag 39 was er een statistisch significante grotere stijging van de vetvrije massa in de HMB-groep.² Aan het einde van de studie was dit verschil echter niet meer statistisch significant.

Samengenomen maakten deze gegevens het aannemelijk dat HMB, ten minste ten dele, verantwoordelijk was voor de geobserveerde effecten van leucine. Sinds deze initiële studie is er veel klinisch onderzoek gedaan naar HMB in de context van sportprestatieverbetering en het effect ervan op de lichaamscompositie.

Kader 6.1



3-Methylhistidine (3-MH) is een gemethyleerde vorm van het aminozuur histidine. 3-MH komt veel voor in de contractiele spiereiwitten actine en myosine. Als deze spiereiwitten worden afgebroken komt er 3-MH vrij. 3-MH kan niet opnieuw gebruikt worden voor de eiwitsynthese en wordt simpelweg uitgescheiden in de urine. Dit maakt 3-MH een interessant aminozuur om als surrogaatmarker voor de spiereiwitafbraak te gebruiken. Het gebruik van 3-MH als surrogaatmarker voor de spiereiwitafbraak is echter niet zonder bezwaren [381]. 3-MH komt vanzelfsprekend ook in andere weefsels dan spierweefsel voor, zoals de huid en het darmstelsel. Bovendien komt het ook in de voeding voor.

6.1.1 Biosynthese

HMB wordt gevormd uit het aminozuur leucine. De eerste stap in de biosynthese van HMB is de omkeerbare transaminatie van leucine tot zijn α -ketozuur α -ketoisocaproaat (α -KIC). Deze reactie vindt met name buiten de lever plaats en wordt gekatalyseerd door het enzym BCAA-aminotransferase (BCAAT) [53]. De BCAAT-activiteit is het hoogst in skeletspierweefsel, die naar schatting meer dan de helft van de totale BCAAT-activiteit voor zijn rekening neemt [68]. Ook vindt er aanzienlijke BCAAT-activiteit plaats in de hersenen en het vetweefsel, terwijl de activiteit in de lever vrij bescheiden is. Er wordt dus veel α -KIC gevormd in de spieren.

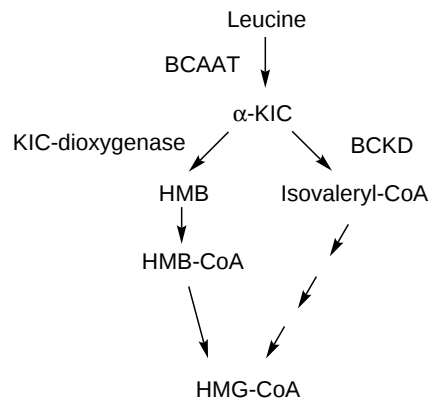
α -KIC kan vervolgens twee verschillende metabole wegen bewandelen. Eén hiervan vormt direct HMB en vindt plaats in het cytosol. Hierbij wordt α -KIC geoxideerd tot HMB in het cytosol. Deze reactie wordt gekatalyseerd door het enzym KIC-dioxygenase. De K_m -waarde van dit enzym wordt geschat op $120 \mu\text{M}$ [332]. Het tweede reactiepad dat α -KIC kan bewandelen begint met oxidatie tot isovaleryl-CoA in de mitochondria. Deze reactie wordt gekatalyseerd door het enzym vertakte keten ketozuurdehydrogenase (BCKD, Eng.: *branched-chain ketoacid dehydrogenase*), met een geschatte K_m -waarde

¹Zeven van de vijftien proefpersonen in de HMB-groep kregen echter ook een eiwitsupplement. De proefpersonen in de controlegroep kregen deze niet.

²De HMB-groep kreeg ook eiwit gesuppleerd. De placebogroep kreeg dit niet.

van 10-40 μM [332]. Vervolgens vinden er enkele reacties plaats die uiteindelijk resulteren in de vorming van 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA).

Er wordt geschat dat circa 5% van de ingenomen leucine wordt gemetaboliseerd tot HMB [497]. Uitgaande van een dagelijkse eiwitinname van 150 g waarvan circa 10% (15 g) bestaat uit leucine, levert dit een dagelijkse HMB-productie van circa 0.75 g.



Figuur 6.2: HMB-biosynthese.

6.1.2 Absorptie

HMB wordt oraal gesuppleerd in de vorm van capsules en komt vrijwel niet in de voeding voor in significante hoeveelheden. Commercieel is het verkrijgbaar als calciumzout (Ca^{2+} -HMB) en in vrije zuur vorm (HMB-FA). Vanuit het maag-darmstelsel wordt het opgenomen door het lichaam en komt het uiteindelijk in de circulatie terecht. Aangezien HMB een polair molecuul is, is het afhankelijk van een transporter om langs de celmembraan te komen. Tot op heden is er echter geen transporter voor HMB geïdentificeerd.

Toediening van 1 g Ca^{2+} -HMB in capsulevorm geeft een piek in de plasmaconcentratiecurve van ongeveer 115-130 $\mu\text{mol/l}$, circa 2 uur na inname [469, 155]. Bij inname van 3 g Ca^{2+} -HMB wordt een piek in de plasmaconcentratiecurve van $\sim 480 \mu\text{mol/l}$ bereikt al circa 1 uur na inname. Deze piek bij een inname van 3 g Ca^{2+} -HMB is lager ($\sim 350 \mu\text{mol/l}$) en wordt later bereikt (circa 2 uur na inname) wanneer deze gecombineerd wordt met 75 g glucose. De oppervlak onder de plasmaconcentratiecurve is significant kleiner wanneer Ca^{2+} -HMB gecombineerd wordt met glucose wanneer men kijkt naar de eerste 3 uur, daarna is deze nog wel kleiner maar niet statistisch significant ($P = 0.106$) [469]. De halfwaardetijd is circa 2.3–3.4 uur, onafhankelijk van dosis (1 of 3 g) [469, 155].

Toediening van 1 g HMB-FA leidt tot een aanzienlijk snellere piek in de plasmaconcentratiecurve [155]. De piek wordt bereikt circa 0.5 uur na inname en is ongeveer tweemaal zo hoog in vergelijking met inname van Ca^{2+} -HMB in capsulevorm. De oppervlak onder de plasmaconcentratiecurve is ook aanzienlijk groter wanneer men kijkt naar de eerste 3 uur na inname. Dit is niet verwonderlijk gezien de piekconcentratie pas laat bereikt wordt bij inname van Ca^{2+} -HMB in capsulevorm. Het verschil in de oppervlak onder de plasmaconcentratiecurve is dan ook een stuk kleiner wanneer gekeken wordt naar de eerste 24 uur in plaats van 3 uur na inname. De halfwaardetijd lijkt iets korter te zijn voor HMB-FA, en ook is de klaring hoger. In combinatie met het gegeven dat de 24-uurs urine-excretie van de vrije zuur gelvorm niet significant verschilt van de Ca^{2+} -HMB in capsulevorm, suggereren deze gegevens dat de vrije zuur gelvorm een hogere retentie in het lichaam heeft.

De inname van HMB leidt tot een sterke stijging in de intramusculaire HMB-concentratie. Deze stijgt van $7 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ in nuchtere toestand naar $96 \pm 13 \mu\text{mol/l}$ 2.5 uur na inname van 2.42 g HMB-FA [478]. Eenzelfde dosis leucine wist in hetzelfde onderzoek niet de intramusculaire HMB-concentratie te beïnvloeden.

Studie	Vorm	Dosis (g)	C _{max} (μmol/l)	T _{max} (u)
Vukovich e.a. (2001)	Ca ²⁺ -HMB	1	115	2
Vukovich e.a. (2001)	Ca ²⁺ -HMB	3	480	1
Vukovich e.a. (2001)	Ca ²⁺ -HMB + glucose	3 + 75	350	1.9
Fuller e.a. (2011)	Ca ²⁺ -HMB	0.8	131	2
Fuller e.a. (2011)	HMB-FA	0.8	259	0.5
Wilkinson e.a. (2013)	HMB-FA	2.42	408	0.5

Tabel 6.1: Farmacokinetische gegevens van HMB.

6.1.3 Metabolisme en excretie

De belangrijkste metabole weg die HMB volgt lijkt de conversie tot HMG-CoA te zijn [332]. Eerst vindt de overdracht van HMB aan coenzym-A plaats om HMB-CoA te vormen. Vervolgens kan er een carboxylatiereactie plaatsvinden om HMG-CoA te vormen. Eveneens kan de HMG-CoA indirect gevormd worden door dehydratie van HMB-CoA tot β -methylcrotonyl-CoA (MC-CoA), gevolgd door een carboxylatiereactie die β -methylgluconyl-CoA (MG-CoA) geeft met tot slot weer hydratatie tot HMG-CoA. HMG-CoA kan vervolgens dienst doen als vertrekpunt voor de *de novo*-cholesterolsynthese, waarbij HMG-CoA gereduceerd wordt tot mevalonaat door HMG-CoA-reductase. Dit is de fluxbepalende stap voor de *de novo*-cholesterolsynthese en is ook het doelwit van de geneesmiddelengroep statinen. In een kortdurende (3 dagen) kleinschalige ($n = 8$) studie werd een lichte stijging in de serumcholesterolconcentratie gevonden [230]. Twee andere, langer durende, studies (8 weken en 28 dagen), lieten geen verandering zien in de serumcholesterolconcentratie [156, 267]. Eén kleinschalige studie liet zelfs een daling zien [332].

Een aanzienlijk gedeelte van gesuppleerd HMB belandt echter onveranderd in de urine. Na een eenmalige toediening van 3 g Ca²⁺-HMB werd bijna 30% uitgescheiden in de urine in de daaropvolgende 24 uur [469]. Bij toediening van 1 g HMB (zowel als calciumzout als vrije zuur vorm) werd ongeveer 15% uitgescheiden in de urine [155]. Deze resultaten suggereren dat mogelijk een groter aandeel van de ingenomen HMB verdwijnt in de urine bij een hogere dosis.

6.2 Werkingsmechanisme

Tot op heden zijn er verschillende werkingsmechanismen gepostuleerd voor HMB [8], waarvan de onderlinge interactie en relatieve bijdrage van ieder vooralsnog niet opgehelderd is. De volgende mechanismen zouden een rol kunnen spelen bij de effecten van HMB-suppletie:

1. verhoogde eiwitsynthese door stimulering van mTOR-signalering;
2. remming van eiwitafbraak door het proteasoom;
3. verbetering van de membraanintegriteit van het sarcolemma door stimulering van de mevalonaatweg;
4. stimulering van proliferatie, differentiatie en fusie van de satellietcellen door de MAPK- en PI3K-reactiepaden;
5. modulatie van het autofagie/lysosomale systeem.

6.2.1 Stimulering van mTOR-signalering

Het mechanistic target of rapamycin (mTOR)-reactiepad speelt een centrale rol in de intracellulaire signalering van spiergroei, zoals uitgebreid aan bod gekomen is in sectie 4.2. In het kort: mTOR vormt samen met andere eiwitten een eiwitcomplex genaamd mTORC1. Dit eiwitcomplex integreert verscheidene signalen, waaronder bijvoorbeeld aminozuurbeschikbaarheid, om tot activatie te komen. Wanneer het complex wordt geactiveerd stimuleert het de eiwitsynthese. Dit doet het complex door eiwitten die betrokken zijn bij de eiwitsynthese te fosforyleren en daarmee hun activiteit te beïnvloeden.

In een experiment met ratten leidde HMB-suppletie tot een verhoogde fosforylering van een van deze eiwitten in het spierweefsel, namelijk S6K1 [356]. Een andere studie vond eveneens een stijging in fosforylering van S6K1 door HMB in C2C12-myoblasten geïncubeerd met *proteolysis-inducing factor* (PIF, een eiwit dat de proteolyse stimuleert en de eiwitsynthese remt) [142]. Bovendien steeg ook de hoeveelheid mTOR sterk [356]. Opmerkelijk genoeg werd er geen stijging in de fosforyleringsstatus (op Ser473) van Akt gevonden (zie sectie 4.2.1). In gedifferentieerde C2C12-cellen werd echter wel een stijging in de fosforyleringsstatus van Akt gevonden tien en dertig minuten na incubatie [259]. Het zou daarom kunnen dat deze stijging in de andere studie was gemist, omdat de metingen vijftien tot achttien uur na HMB-suppletie werden verricht. Ook werd een stijging van mTOR-P gemeten dertig minuten na incubatie met HMB [259]. Toediening van een PI3K-remmer (PI3K is een upstream regulator van Akt, en daarmee mTOR) deed deze stijging teniet.

Deze stijging van Akt-fosforylering werd echter niet gezien bij mensen na inname van 2.42 g HMB in vrije zuur gelvorm [478]. Deze bleef tot 2.5 uur na inname ongewijzigd. In dezelfde studie wist inname van 3 g leucine wél Akt-fosforylering te stimuleren. 4E-BP1- en S6K1-fosforylering vertoonden alleen 0.5 uur na HMB-inname een significante stijging, terwijl leucine ook 1.5 uur na inname nog een significante stijging vertoonde. Ook werd in deze studie de fractionele synthesesnelheid (FSR; een betrouwbare maat voor de eiwitsynthese, Eng.: *fractional synthetic rate*) van spiereiwit (de myofibrillaire eiwitten) bepaald. De FSR steeg met ~ 70% na HMB-inname, en ~ 110% na leucine-inname. Het verschil was echter niet statistisch significant. Ook bleek dat HMB-inname op een insuline-onafhankelijke manier de spiereiwitafbraak remde. Als HMB de spiereiwitafbraak meer remde dan leucine (niet gemeten), dan zou het kunnen zijn dat hierdoor de eiwitsynthese minder verhoogde. Immers zouden er minder vrije aminozuren vrijkomen uit eiwitafbraak om de eiwitsynthese te stimuleren. Desalniettemin is het maar de vraag of de stijging van de FSR additief zou zijn op dat van een eiwitrijke maaltijd met voldoende leucine.

6.2.2 Remming proteasomale afbraak

Het proteasoom is een groot eiwitcomplex dat in het midden een cilindervormige kamer bevat dat bestaat uit proteases. Eiwitten die gemerkt zijn met ubiquitine komen terecht in deze kamer, waar zij vervolgens afgebroken worden. Deze markering wordt geregeld door het ubiquitinesysteem dat bestaat uit drie componenten, E1, E2 en E3. Het eerste component bestaat uit de ubiquitine-activerende (E1)-enzymen, die ATP hydrolyseren om ubiquitine te activeren, door deze te 'dragen'. Vervolgens wordt ubiquitine overgedragen aan de ubiquitine-conjugerende (E2)-enzymen. De E2-enzymen interacteren daarna met ubiquitine-proteïne (E3)-ligases, die bepalen waar het ubiquitine aan gebonden wordt. Zodoende bepalen zij welke eiwitten gemarkeerd worden voor afbraak door het proteasoom. Twee belangrijke E3-ligases betrokken bij spieratrofie zijn muscle atrophy F-box (MAFbx,

ook wel bekend als atrogine-1) en muscle ring finger 1 (MuRF1) [56, 55]. Deze twee E3-ligases worden dan ook vaak gebruikt als biomarkers voor eiwitafbraak in spieren.

In een experimenteel model van kankergeïnduceerd gewichtverlies in ratten wist HMB de proteasoomactiviteit, afgeleid uit chymotrypsine-achtige enzymactiviteit, te remmen [419]. Hiermee werd de eiwitafbraak geremd, en men vond tevens een stijging van de spiermassa in de soleusspier van de ratten. Verder werd er een daling in E2_{14k}-expressie (een E2-enzym) gevonden.

Ander onderzoek laat een remming van de door ouderdom-geïnduceerde stijging in MAFbx-mRNA-expressie zien bij ratten [481]. Ook *in vitro*-onderzoek, waarbij gebruik werd gemaakt van L6-myoblasten, toonde het antikatabole effect van HMB aan [26]. De cellen werden geïncubeerd met dexamethason, een glucocorticóide die de expressie van MAFbx en MURF1 stimuleert en de spierafbraak bevordert. Toevoeging van HMB wist de stijging in expressie van beide E3-ligases te remmen.

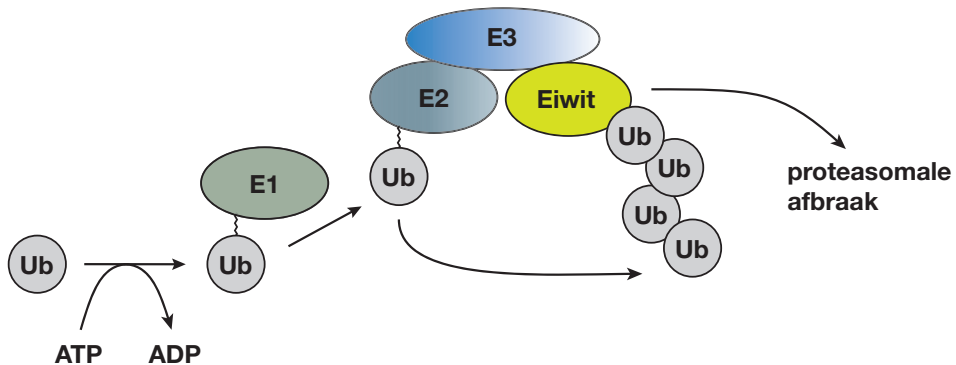
Desondanks wijst niet al het onderzoek in dezelfde richting. In een recente studie werd gekeken naar de effecten van leucine- of HMB-suppletie in twee verschillende situaties [32]. Zo werd er gekeken naar het effect van beide in combinatie met toediening van dexamethason aan ratten. Zowel HMB-suppletie als leucinesuppletie wist de spieratrofie van de soleusspier niet tegen te gaan. Wel wist HMB de stijging in MAFbx- en MuRF1-expressie te remmen; leucine remde daarentegen alleen MAFbx-expressie. Ook werd er gekeken naar het effect van beide in combinatie met spierimmobilisatie. Leucine wist de spieratrofie te minimaliseren, terwijl HMB geen effect toonde. Ook wist leucine de expressie van beide E3-ligases te minimaliseren, terwijl HMB zelfs leidde tot een stijging in MAFbx-expressie. Opmerkelijk genoeg werd ook een zesvoudige stijging in MAFbx-expressie gevonden in een niet-geïmmobiliseerde spier, terwijl leucine hier geen effect op had.

Wel wist HMB-suppletie spieratrofie te remmen in een andere studie waarbij dexamethason werd toegediend aan ratten [165]. Belangrijk is echter dat deze remming pas significant werd na achttien dagen; de eerder genoemde studie duurde niet langer dan zeven dagen, waardoor dit effect gemist kan zijn. Ook keken onderzoekers in deze laatste studie naar het effect van HMB op expressie van de E3-ligases in L6-myoblasten geïncubeerd met dexamethason. De toevoeging van HMB wist de stijging in MuRF1- en MAFbx-mRNA-expressie teniet te doen [165].

Zoals eerder opgemerkt remt HMB op een insuline-onafhankelijke manier de eiwitafbraak in mensen [478]. Dit is interessant gezien eiwit- en koolhydraatname de eiwitafbraak met zo'n 50% remmen door de stijging van insuline die het tot gevolg heeft [24]. Zonder deze stijging van insuline wordt de eiwitafbraak nagenoeg niet geremd. De vraag rest of HMB hier een additief op effect zou hebben. Tot op heden is dit niet onderzocht. Ook maakt de insuline-onafhankelijke remming van eiwitafbraak het mogelijk interessant om toe te passen bij een dieet waarbij voor langere periodes wordt gevast, zoals bij intermitterend vasten. Het zou dan toepassing kunnen vinden tijdens de vastperiodes, waarin het insulineniveau laag is.

6.2.3 Verbetering van de membraanintegriteit

Cholesterol vormt een belangrijk bestanddeel van membranen. Het beïnvloedt de membraanintegriteit en -fluiditeit. Een voldoende en goed gereguleerde concentratie van cholesterol in de membranen is daarom essentieel voor het welzijn van cellen. Daarnaast vormt cholesterol de precursor van steroïdhormonen zoals testosteron.



Figuur 6.3: Proteasomale afbraak. E1-enzymen hydrolyseren ATP om ubiquitine te activeren. Vervolgens kan deze worden overgedragen aan E2-enzymen. Hierna vindt interactie plaats tussen de E2-enzymen en E3-enzymen, zoals MAFbx en MuRF1, om eiwitten te ubiquitineren. Het proteasoom herkent deze eiwitten vervolgens en breekt ze af. Afbeelding gebaseerd op Nguyen e.a. [328].

Een cel kan op twee wijzen aan cholesterol komen. Hetzij door endocytose van LDL-deeltjes, hetzij door *de novo*-synthese in het cytoplasma van de cel. De *de novo*-cholesterolsynthese verloopt via de zogeheten mevalonaatweg. Hierbij wordt uit acetyl-CoA HMG-CoA gegenereerd. Het gegeneerde HMG-CoA wordt vervolgens gereduceerd tot mevalonaat door HMG-CoA-reductase. Mevalonaat doorloopt aansluitend tal van chemische reacties om uiteindelijk onderdeel te vormen van één cholesterolmolecuul. Meerdere mevalonaatmoleculen zijn benodigd voor de synthese van één cholesterolmolecuul.

De belangrijkste metabole weg die HMB volgt, lijkt de conversie tot HMG-CoA te zijn, de voorloper van mevalonaat [332]. Naar aanleiding hiervan is het aannemelijk dat HMB-suppletie kan helpen bij het waarborgen van de cholesterolhuishouding in een cel. Er is echter tot op heden geen directe bepaling gedaan van het effect van HMB-suppletie op membraanintegriteit. Wel laten enkele [331, 460, 484], maar niet alle [482], studies een daling van creatinekinase in de circulatie zien. Een verbeterde membraanintegriteit zou kunnen leiden tot minder 'lekkage' van creatinekinase in de circulatie na krachttraining. Voorsnog is dit werkingsmechanisme gestoeld op weinig en indirecte data.

6.2.4 Verhoogde satellietcelactiviteit

Stimulering van satellietcelactiviteit speelt mogelijk een rol bij spierhypertrofie en in ieder geval bij herstel na schade, zoals besproken in sectie 1.5. Toevoeging van HMB aan humane myoblasten en myoblasten afkomstig van kuikens, leidt tot een stijging van de satellietcelactiviteit, zo blijkt uit onderzoek [262]. Tevens werd een stijging van MyoD-expressie gevonden, een biomarker die gebruikt wordt om actieve satellietcellen in kaart te brengen. Bovendien werd er een stijging in de incorporatie van gelabeld thymidine in het DNA gemeten. Deze bevindingen zijn beide een indicatie van een stimulering van de proliferatie van de myoblasten. Ook stimuleerde de toevoeging van HMB de differentiatie,

zoals afgeleid uit een verhoogde expressie van myogenine.

Om het effect op fusie van de satellietcellen te bepalen werd de hoeveelheid celkernen van enkele honderden cellen geteld. De hoeveelheid celkernen per cel nam toe door de toevoeging van HMB. HMB stimuleert dus de proliferatie, differentiatie en de fusie van myoblasten. Het effect lijkt te worden gemedieerd door activatie van het mitogeengeactiveerde proteïne kinase/extracellulair gereguleerde kinase (MAPK/ERK)-reactiepad en het PI3K/Akt-reactiepad (zie sectie 4.2.1).

Een andere studie liet eveneens een stijging in de proliferatie en differentiatie zien van satellietcellen in ratten tijdens herstel van onbruikatrofie (Eng.: *disuse atrophy*) door toediening van HMB [13].

6.2.5 Remming van autofagie/lysosomale afbraak

Naast het proteasomale systeem regelt ook het autofagie/lysosomale systeem de eiwitafbraak. Hierbij wordt een stuk cytoplasma als het ware omsingeld door een groot aantal blaasjes die samensmelten om een autofagosoom te vormen. Het autofagosoom beschikt over een binnenste en buitenste membraan en dirigeert de inhoud die het heeft omsingeld naar het lysosoom. Het autofagosoom fuseert vervolgens met het lysosoom, waar het autofagosoom en de inhoud ervan worden verteerd. Het lysosoom beschikt namelijk over een vrij zuur milieu en een repertoire hydrolases die de afbraak verder bevorderen.

Autofagie is een belangrijk mechanisme voor cellen om verouderde of beschadigde moleculen en organellen af te breken, en om in tijden van nood de cel op de juiste plaats te voorzien van voedingsstoffen. In katabole omstandigheden wordt dit systeem gestimuleerd, waaronder bij toediening van de glucocorticoïde dexamethason.

Tot op heden is er één studie die het effect van HMB-suppletie hierop onderzocht [165]. In L6-myoblasten blootgesteld aan dexamethason wist HMB de lysosomale proteolyse te remmen, afgeleid uit LC3-II-, p62- en Bnip3-expressie (biomarkers van activiteit van het autofagie/lysosomale systeem). HMB weet dit, waarschijnlijk, te remmen door FoxO-activiteit te verminderen. In het bijzonder het FoxO3a-eiwit (een transcriptiefactor), dat onder andere de expressie van autofagie-gerelateerde genen induceert [399]. Deze remming van FoxO-activiteit is waarschijnlijk gemedieerd door Akt. Akt fosforyleert en deactiveert zo FoxO-eiwitten [502].

6.3 Klinische resultaten

Inmiddels zijn er veel studies verricht naar het effect van HMB-suppletie op onder meer de spierkracht en lichaamscompositie. Problematisch hierbij is dat deze studies niet allemaal in lijn met elkaar liggen qua resultaten en bovendien vaak verschillend van opzet zijn.

Het onderzoek van Nissen e.a., zoals al kort besproken in de inleiding, toonde een stijging van de vetvrije massa (VVM) aan in de HMB-groep ten opzichte van de placebo-groep vanaf dag 14 tot en met dag 39 [331]. Aan het einde van de studie was dit verschil niet meer significant. Bovendien kreeg de HMB-groep ook eiwitten gesuppleerd terwijl de placebogroep dit niet kreeg en waren de proefpersonen ongetraind.

Een later onderzoek van Kreider e.a. onderzocht het effect van 0 (placebo), 3 of 6 g HMB per dag in een getrainde populatie [266]. De proefpersonen moesten in dit onderzoek minstens 1 jaar ervaring hebben met krachttraining. Voor en na 28 dagen suppletie en krachttraining werd de lichaamscompositie bepaald met een dual-energy X-ray absorptiometrie (DXA)-scan. Tussen de placebo- en HMB-groep werden hierin

geen verschillen gevonden. Naast de lichaamscompositie werd er ook een 1-RM-bepaling gemaakt van de leg press en bankdrukken. Ook hier werden geen verschillen tussen de groepen gevonden na 28 dagen.

Een van de redenen waarom de resultaten van Kreider e.a. zo verschilden van die van Nissen e.a. zou de trainingsstatus van de proefpersonen kunnen zijn. Een studie van de groep van Nissen trachtte precies deze vraag te beantwoorden door zowel getrainde als ongetrainde proefpersonen te laten deelnemen [342]. De proefpersonen in deze studie volgden driemaal per week, vier weken lang een krachttrainingsprogramma. Daarnaast kregen ze HMB (3 g per dag) of een placebo gesuppleerd. Er werd een stijging van de 1-RM bankdrukken gevonden in de HMB-groep ten opzichte van de placebogroep, en een trend voor een stijging in de VVM en het vetpercentage (beide $P = 0.08$, bepaald met een huidcaliper). Opmerkelijk genoeg werd er geen effect van de trainingsstatus (ongetraind of getraind) op de resultaten gevonden.

Later onderzoek, waarbij Nissen eveneens betrokken was, suggereert dat het effect van HMB-suppletie op kracht en lichaamscompositie in combinatie met creatinesuppletie additief werkt [245]. De proefpersonen die deelnamen mochten de voorgaande zes maanden geen krachttrainingsprogramma hebben gevolgd en kunnen daarom als ongetraind worden beschouwd. Zij werden onderverdeeld in een creatinegroep (CR, 20 g per dag voor 7 dagen gevolgd door 10 g per dag), HMB-groep (HMB, 3 g per dag), creatine + HMB-groep (CR/HMB) en een placebogroep (PL). De studie duurde drie weken. Er werd gebruikgemaakt van bioelektrische impedantie-analyse (BIA) om de lichaamscompositie inzichtelijk te maken. Het effect op de lichaamscompositie is weergegeven in tabel 6.2. De stijging in LBM was significant ten opzichte van PL voor CR, en bijna significant voor HMB ($P = 0.08$). Omdat er geen significante $CR \times HMB$ -interactie werd gevonden en de stijging voor CR/HMB groter was dan van de overige groepen, suggereert dit een additief effect. Opmerkelijk was ook de grote stijging van de vetmassa voor CR/HMB. De auteurs geven hier geen verklaring voor. Kracht werd bepaald door 1-RM-metingen van de oefeningen die deel uitmaakten van het krachttrainingsprogramma (zoals bankdrukken en squatten). De cumulatieve 1-RM-krachttoename was 37.5, 39.1 en 51.9 kg hoger voor respectievelijk CR, HMB en CR/HMB ten opzichte van PL ($P = 0.001$). Ook hierbij werd geen significante $CR \times HMB$ -interactie gevonden, wat suggereert dat ook het effect op kracht van HMB- en creatinesuppletie additief werkt.

Een andere studie waarbij HMB (3 g per dag) gecombineerd werd met creatine (3 g per dag) gedurende zes weken vond echter geen effect op spierkracht, -vermogen en anthropometrie (dikte van huidplooien) bij elite rugbyspelers [334].

Uitkomstmaat	PL	CR	HMB	CR/HMB
Gewicht (kg)	+1.00	+2.01	+1.34	+3.40
Vetmassa (kg)	+0.17	+0.19	+0.08	+1.00
LBM (kg)	+0.85	+1.77	+1.24	+2.39

Tabel 6.2: Effect op lichaamscompositie van placebo (PL), creatine (CR), HMB, en gecombineerde creatine en HMB-suppletie (CR/HMB). De vetmassa en LBM werden bepaald met gebruik van BIA. Resultaten van Jowko e.a. [245].

Ander onderzoek toonde eveneens een significante stijging van de VVM in ongetrainde

mannen na 8 weken suppletie van 38 mg/kg lgw (circa 3 g) HMB per dag in combinatie met krachttraining ten opzichte van placebo [156]. Opmerkelijk genoeg werd dit niet gevonden bij de mannen die 76 mg/kg lgw (circa 6 g) HMB per dag kregen. Het is onduidelijk waarom deze hogere dosering minder effectief was.

In dezelfde studie werden van tien oefeningen de 1-RM bepaald. Voor geen enkele van deze tien oefeningen werd er een significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden. Wel werden er enkele significante verbeteringen gevonden van isometrische en isokinetische kracht van de knie-extensoren bij verschillende hoeksnelheden in de HMB-groepen.

Een studie met recreatief getrainde mannen liet dan weer geen noemenswaardig effect zien op de lichaamscompositie (bepaald met huidcaliper) na negen weken HMB-gebruik [442]. Ook werd er geen effect gevonden op kracht van het bovenlichaam, maar wel van het onderlichaam (1-RM beenextensie). In een cross-over opgezette studie werd effect van HMB op kracht van noch het bovenlichaam noch het onderlichaam gevonden bij getrainde rugbyspelers [370].

Ook een ander onderzoek bij getrainde eliterugbyspelers vond effect op kracht van noch het bovenlichaam, noch het onderlichaam na elf weken HMB-suppletie [306]. Ook werd er geen effect gevonden op het vetpercentage. Wel nam het lichaamsgewicht toe in de HMB-groep (+0.57 kg), terwijl deze afnam in de placebogroep (-1.39 kg). Opmerkelijk genoeg werd er in deze studie een negatief effect gevonden op intermitterende sprintprestaties (sprinten met tussenpozen) in de HMB-groep ten opzichte van de placebogroep. De studie leed echter aan een hoog uitvalspercentage, waardoor het aantal deelnemers per meting vrij beperkt was. Het hoge uitvalspercentage is vrij gebruikelijk bij rugbyspelers, door toedoen van de intensiteit van de trainingsschema's die zij veelal hanteren.

Tot slot is er een spraakmakende studie uitgevoerd door Wilson e.a. [483]. De deelnemers van deze studie waren ervaren met krachttraining. Zo squatten, bankdrukten en deadliften zij gemiddeld respectievelijk 1.7-, 1.3- en 2.0-maal hun lichaamsgewicht. De studie duurde twaalf weken, waarbij een golvend geperiodiseerd krachttrainingsschema (Eng.: *undulating periodized resistance-training program*) werd gevolgd. De 1-RM-squat, -bankdrukken en -deadliften werden bepaald als metingen van kracht. Met een DXA-scan werd de lichaamscompositie inzichtelijk gemaakt. Tevens werd met behulp van ultrasonografie de spierdikte van de quadriceps bepaald. Wat deze studie zo spraakmakend maakt, zijn de resultaten. Zo wist de HMB-groep 7.4 kg LBM te winnen terwijl ze 5.4 kg vetmassa verloor. Ook steeg de 1-RM-squatten van 143.7 kg naar 179.9 kg ($\uparrow 25\%$), 1-RM-bankdrukken van 112.4 kg naar 125.2 kg ($\uparrow 12\%$) en 1-RM-deadliften van 170.3 kg naar 198.4 kg ($\uparrow 16\%$). De spierdikte van de quadriceps nam toe met 14%.

Ook een andere studie van Wilsons groep, waarbij HMB werd gecombineerd met ATP-suppletie, toonde vergelijkbare verbluffende resultaten [286]. Het dient opgemerkt te worden dat beide studies gesponsord werden door Metabolic Technologies Inc, een supplementenbedrijf dat HMB verkoopt en is opgericht door Steven Nissen. Meerdere van de co-auteurs waren in dienst van dit bedrijf. De inconsistentie van de resultaten van deze studie met de overige data uit de literatuur heeft dan ook enige kritiek opgeleverd [232].

6.4 Veiligheid

In een overzichtsartikel van negen studies door Steven Nissen e.a. werd gekeken naar de veiligheid van het voedingssupplement [330]. Samengenomen kregen meer dan 100 proefpersonen HMB met een dosering van 3 g per dag variërend van 3 tot 8 weken. Er

werd geen negatief effect gevonden op serumlipiden, markers van leverfunctie en -schade, markers van nierfunctie, serumelektrolyten, hematologische waarden en bloeddruk. Bovendien werd er een daling gevonden in totaal cholesterol ($\downarrow 5.8\%$), LDL-cholesterol ($\downarrow 7.3\%$) en systolische bloeddruk ($\downarrow 4.4$ mmHg). Het is onbekend of deze daling van cardiovasculaire risicomarkers ook daadwerkelijk effect heeft op cardiovasculaire aandoeningen. Ook uit de antwoorden op bijwerkingvragenlijsten van de proefpersonen kwamen geen bijwerkingen naar voren. Een studie uitgevoerd met vrouwelijke elitejudoka's tijdens een energiebeperkend dieet liet echter een stijging in het totaal cholesterol ($\uparrow 12\%$) zien na 3 dagen suppletie [230]. Mogelijk speelde hierbij de korte suppletieduur een rol.

Een systematische review uit 2013 stelt ook dat HMB-suppletie veilig is [315]. Wel rapporteren de auteurs dat in twee studies [371, 98] een stijging van de hoeveelheid ureum in het bloed werd gevonden (BUN, Eng.: *blood urea nitrogen*). Bij beide studies werd HMB-suppletie echter gecombineerd met de aminozuren arginine en glutamine, wat mogelijk de stijging kan verklaren. Andere studies vermelden geen stijging van BUN.

Er zijn tot op heden geen langetermijnstudies beschikbaar van HMB. Daarom is enige terughoudendheid geboden bij chronisch gebruik.

6.5 Conclusie

HMB is een belangrijk metabool van leucine en lijkt nauw betrokken bij regulatie van de eiwitsynthese en eiwitafbraak. De hoeveelheid HMB die endogeen wordt aangemaakt is vrij beperkt en naar schatting minder dan één gram (afhankelijk van de hoeveelheid eiwit in het dieet). Om die reden zou suppletie mogelijk een positief effect kunnen hebben op de lichaamscompositie en spierkracht. De werking zou te danken zijn aan stimulering van mTOR-signalering, remming van eiwitafbraak door het proteasoom, verbetering van de membraanintegriteit van het sarcolemma, stimulering van proliferatie, differentiatie en fusie van satellietcellen en modulatie van het autofagie/lysosomale systeem.

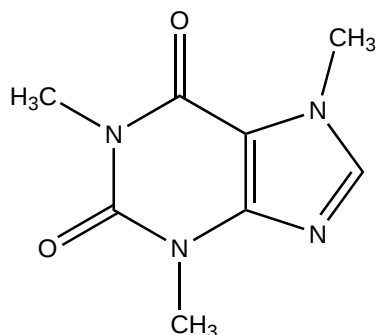
Een flink aantal klinische studies heeft de effecten van HMB-suppletie onderzocht bij zowel atleten als ongetrainde proefpersonen. De effectieve dosering die hierbij wordt gebruikt is vaak 3 g per dag. De resultaten van de klinische studies variëren sterk; van totaal geen effect tot een enorme toename van kracht en LBM. Het is onduidelijk waardoor de gevonden resultaten zo inconsistent zijn. Mogelijk spelen hierbij verschillen in de opzet van de studies een rol. Het is ook opmerkelijk dat veel van de positieve studies gesponsord zijn door het supplementenbedrijf achter HMB.

Qua veiligheid scoort het voedingssupplement goed. Tot op heden is er geen indicatie dat HMB schadelijk kan zijn voor de gezondheid op de korte termijn. Langetermijnstudies ontbreken echter.

7. Cafeïne

7.1 Inleiding

Cafeïne (1,3,7-trimethylxanthine) komt veel voor in de dagelijkse voeding van de meeste mensen. Dit komt grotendeels door de aanwezigheid van de stof in koffie. Daarnaast komt cafeïne voor in thee, chocolademelk, frisdranken zoals cola, en energiedrankjes. Het gebruik van cafeïne in de vorm van koffie en thee kent een rijke geschiedenis [154]. Beide worden inmiddels al honderden jaren gedronken en het gebruik van koffie of thee is onderdeel van veel culturen. Tegenwoordig is een groot gedeelte van de cafeïne-inname onder de Nederlandse bevolking ook te herleiden naar de stijgende consumptie van energiedrankjes. Deze maakten hun entree in de jaren tachtig en zijn vooral populair onder jongeren. Dit in tegenstelling tot koffie, dat vooral gedronken wordt door dertigplussers. Desondanks wordt nog steeds een hogere cafeïneconsumptie gezien in de leeftijdscategorie van 31-69 jaar (509-549 mg per dag voor mannen en 462-505 mg per dag voor vrouwen) dan in de leeftijdscategorie van 19-30 jaar (316 mg per dag voor mannen en 281 mg per dag voor vrouwen), gebaseerd op de consumptie van cafeïnehoudende voedingsmiddelen in de Voedselconsumptiepeiling van 2007-2010 [459]. In tabel 7.1 staat de cafeïne-inhoud weergegeven van enkele middelen.



Figuur 7.1: Structuurformule van cafeïne.

Product	Eenheid	Cafeïne (mg)
Koffie	Kopje (150 ml)	40-180
Thee	Kopje (150 ml)	25-50
Frisdranken	Blikje (250 ml)	20-40
Energiedranken	Blikje (250 ml)	30-85
Chocolade	Reep (100 g)	5-20

Tabel 7.1: Cafeïne-inhoud van verschillende middelen. Data overgenomen uit [294].

Cafeïne is tevens populair onder atleten als prestatiebevorderend middel. Voor dit doel worden dosissen van $\sim 3\text{--}6$ mg/kg lgw gebruikt [170], een inname die vergelijkbaar is met wat de meeste volwassenen dagelijks binnen krijgen. Cafeïne is in de context van sportprestaties ook één van de best onderzochte middelen.

7.1.1 Absorptie

Cafeïne wordt als supplement vaak oraal ingenomen als capsule of poeder. Vanuit de voeding is het meestal opgelost in koffie, thee of frisdranken. Het wordt vooral opgenomen door de dunne darm, maar zo'n 20% wordt al opgenomen door de maag [96]. De opname vindt vrij snel plaats. In een kleinschalige ($n = 10$) farmacokinetische studie werd 5 mg/kg lgw cafeïne oraal toegediend [51]. De gemiddelde tijd benodigd voor het bereiken van de piekcafeïneplasmaconcentratie na inname was 29.8 min, waarbij de standaardfout 8.1 bedroeg. Ook werd er in hetzelfde experiment dezelfde dosis intraveneus toegediend, om de biologische beschikbaarheid van cafeïne na orale inname te bepalen. Hieruit bleek dat cafeïne een volledige biologische beschikbaarheid kent en dus geen first-pass-effect kent. De bereikte piekplasmaconcentratie varieerde van 6.9 tot 16.1 $\mu\text{g/ml}$ met een gemiddelde waarde van 9.9 $\mu\text{g/ml}$. De halfwaardetijd bedroeg gemiddeld 4.5 uur, met een bereik van 2.7–9.9 uur, hetgeen duidt op een sterke interindividuele variabiliteit hierin.

Ander onderzoek heeft ook gekeken naar de farmacokinetiek van cafeïne in de vorm van koffie, cola en chocolade [321, 281]. Mumford e.a. gaven 7 proefpersonen een dosis van 72 mg cafeïne (gemiddeld 1.01 mg/kg lgw) als capsule, cola of chocolade [321]. In de chocolade zat tevens de dimethylxanthine theobromine. Ook in deze studie werd na 0.5 uur de piekcafeïneplasmaconcentratie gevonden in de groep die cafeïne als capsule kreeg toegediend. Bij toediening als cola of chocolade werd deze echter pas bereikt na gemiddeld 120 min. Dit kan mogelijk komen doordat suiker de maaglediging van cafeïne vertraagt [96] en een vaste substantie zoals chocolade eveneens vertraagd in de dunne darm belandt. Een andere studie vond echter geen vertraagde opname van cafeïne als cola [281]. Dit zou mogelijk kunnen komen doordat de cafeïne in deze studie hoger gedoseerd was (400 mg) en de cola geen suiker bevatte. Ook vond dezelfde studie dat cafeïne als koffie de opname ervan niet vertraagde.

Cafeïne is voldoende apolair om langs celmembranen te kunnen diffunderen en slechts een klein gedeelte wordt door eiwit gebonden in het bloed. Circa een derde wordt door albumine gebonden, zowel bij jongeren als ouderen die in de regel een lagere serumalbumineconcentratie hebben [50]. Hierdoor verspreidt cafeïne zich makkelijk over het totale lichaamsvocht. Het steady-state-verdelingsvolume ligt tussen de 0.5 en 0.8 l/kg [294]. Hoewel er wordt aangenomen dat cafeïne zich vooral via passieve diffusie langs de

celmembranen beweegt, is aangetoond dat er ook carriergemedieerdtransport (zie sectie 3.2.2) plaatsvindt van cafeïne langs de bloed-hersenbarrière [304].

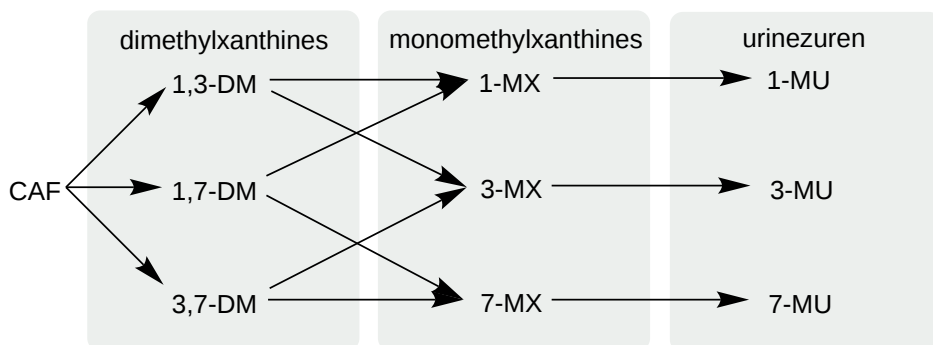
In een andere studie werd gevonden dat het verloop van de plasmaconcentratie in de tijd vergelijkbaar was met de concentratie in het extracellulaire vocht in het subcutane abdominale vetweefsel [425]. Echter, de plateauconcentratie tussen beide vertoonde geen correlatie. De concentratie waar de cellen aan blootgesteld worden, kan dus afwijken van de concentratie die men in het bloedplasma treft.

7.1.2 Metabolisme en excretie

Cafeïne wordt extensief gemetaboliseerd door de lever. Deze reacties worden met name gekatalyseerd door leden van het cytochroom P450-enzymstelsel, in het bijzonder CYP1A2. De eerste metabole stap begint met een demethyleringsreactie. Deze demethylering kan plaatsvinden op het eerste, derde of zevende N-atoom. Dit geeft respectievelijk de metabolieten: 3,7-dimethylxanthine (theobromine), 1,7-dimethylxanthine (paraxanthine) en 1,3-dimethylxanthine (theofylline). De fractionele conversie van cafeïne naar paraxanthine bedraagt gemiddeld 76.6%, naar theobromine 10.8%, en naar theofylline 3.7% [277]. Deze reacties worden gekatalyseerd door de enzymen CYP1A2 en CYP2E1 [294]. CYP1A2 is hierbij kwantitatief gezien veruit het belangrijkste. Na deze eerste demethylering vindt er een tweede demethyleringsreactie plaats, waardoor de drie gevormde dimethylxanthines worden omgezet in monomethylxanthines. Deze reactie wordt eveneens vooral gekatalyseerd door CYP1A2, al zijn er enkele andere CYP-enzymen die dit ook doen. Tot slot wordt er een oxidatiestap uitgevoerd om urinezuren te vormen. Deze oxidatie kan ook al plaatsvinden bij de gevormde dimethylxanthines. Hierdoor ontstaan 1,3-dimethylurinezuur, 3,7-dimethylurinezuur en 1,7-dimethylurinezuur. Er zijn ook andere metabole paden die cafeïne kan bewandelen, waarbij ook N-acetyltransferases, xanthineoxidasen en CYP-enzymen betrokken zijn, maar kwantitatief gezien een heel kleine rol spelen. Deze zullen hier verder niet behandeld worden.

De halfwaardetijd varieert van circa 2.5 uur tot 10 uur bij dosissen kleiner dan 10 mg/kg lgw [51, 294]. Hogere dosissen kunnen leiden tot een langere halfwaardetijd door verzadiging van de metabole paden. Van het *CYP1A2*-gen is een polymorfisme bekend dat de snelheid van metabolisme van cafeïne beïnvloedt. Het polymorfisme is een C-naar-A-transversie die zich in het eerste intron van het *CYP1A2*-gen bevindt. Mensen die beschikken over dit polymorfisme in beide allelen van het gen (homozygoot) metaboliseren cafeïne sneller dan mensen die niet over dit polymorfisme beschikken of deze slechts dragen op één allel (heterozygoot) [392]. Dit heeft als gevolg dat homozygoten hogere concentraties van cafeïne in de circulatie zullen hebben na inname van een dosis cafeïne dan heterozygoten en niet-dragers.

Verschillende externe factoren beïnvloeden ook de activiteit van het CYP1A2-enzym, hetgeen verder mogelijk de grote variabiliteit in halfwaardetijd van cafeïne verklaart. Hieronder vallen onder andere roken, geslacht, BMI, zwangerschap en fase van de menstruele cyclus bij vrouwen, maar ook voedingsfactoren zoals het eten of drinken van alcohol, gegrild vlees en grapefruitsap [86]. Sporten lijkt geen invloed te hebben op CYP1A2-activiteit. De klaring van cafeïne verloopt trager richting het einde van de luteale fase bij vrouwen [271] en ook zorgen oestrogeenbevattende contraceptiva voor een vertraagde klaring [4]. Hierdoor kan er meer accumulatie van cafeïne plaatsvinden bij herhaalde doseringen en is het langer werkzaam. Oestrogeenvervangingstherapie bij postmenopauzale vrouwen remt eveneens het cafeïnemetabolisme [358]. Dit suggereert dat oestrogeen direct



Figuur 7.2: Versimpelde weergave van het cafeïnemetabolisme. Caffeïne wordt gedemethyleerd tot één van de drie mogelijk dimethylxanthines, waarna deze verder gedemethyleerd kunnen worden tot één van de drie mogelijke monomethylxanthines. De monomethylxanthines worden vervolgens geoxideerd om een urinezuur te vormen. Ook kunnen de dimethylxanthines al geoxideerd worden om een urinezuur te vormen (niet weergegeven). Afkortingen: CAF, cafeïne; 1,3-DM, 1,3-dimethylxanthine; 1,7-DM, 1,7-dimethylxanthine; 3,7-DM, 3,7-dimethylxanthine; 1-MX, 1-methylxanthine; 3-MX, 3-methylxanthine; 7-MX, 7-methylxanthine; 1-MU, 1-methylurinezuur; 3-MU, 3-methylurinezuur; 7-MU, 7-methylurinezuur.

verantwoordelijk is voor dit effect. Het is aannemelijk dat oestrogeen CYP1A2-activiteit remt.

De metabolieten van cafeïne worden geklaard via de nieren in de urine. Slechts een klein gedeelte (< 3%) van de ingenomen cafeïne verlaat het lichaam ongewijzigd in de urine [47]. De concentratie cafeïne in de urine is ongeveer gelijk aan dat van de vrije fractie aanwezig in het bloed. Dit betekent dat er reabsorptie plaatsvindt van cafeïne in de renale tubuli tot een equilibrium met de vrije plasmafractie is bereikt.

7.2 Werkingsmechanisme

Het belangrijkste werkingsmechanisme van cafeïne vloeit voort uit de capaciteit om te binden aan adenosinereceptoren zonder deze te activeren [170]. Zodoende fungeert het als competitief receptorantagonist en voorkomt het de binding van de fysiologische ligand: adenosine.

Adenosine is een in het lichaam veelvoorkomend adeninenucleoside. Het molecuul kan binden aan adenosinereceptoren die gelegen zijn op de plasmamembraan van cellen en waarvan vier verschillende isovormen bekend zijn. De effecten van adenosine zijn daarvoor afhankelijk van de extracellulaire concentratie. Adenosine kan zowel intracellulair als extracellulair gegenereerd worden. Extracellulair wordt het gegenereerd uit adenosinetrifosfaat (ATP) door eerst adenosinemonofosfaat (AMP) te vormen. Het AMP kan vervolgens gehydrolyseerd worden om adenosine te vormen. Intracellulair wordt het, naast de vorming uit ATP, ook gevormd uit S-adenosylhomocysteïne. De adenosineconcentratie stijgt sterk wanneer de ATP-afbraak de ATP-synthese overstijgt. Immers stijgt in een dergelijke situatie de AMP-concentratie, waardoor er meer substraat beschikbaar is voor

de vorming van adenosine. Dit vindt bijvoorbeeld plaats in het spierweefsel bij intensieve inspanning of onder extreme omstandigheden zoals ischemie of hypoxie van een weefsel waardoor het aerobe energiemetabolisme wordt belemmerd. Adenosinereceptoractivatie is betrokken bij tal van biologische functies, waaronder slaapregulatie, alertheid en de lipolyse. Cafeïne grijpt in op deze normale regulatie door adenosine als het ware 'buitenspel' te zetten door receptoren bezet te houden zonder deze te activeren. Dit leidt tot onder meer het bekende effect van een verhoogde alertheid, maar ook tot de ergogene effecten. Adenosinereceptoren zijn wijdverspreid door het hele lichaam en zijn onder andere aanwezig in de hersenen, vetcellen en spiercellen. Doordat er meerdere adenosinereceptorisovormen zijn en deze een verschillende, en soms tegengestelde, werking hebben, is het een moeilijke opgave gebleken om te ontrafelen welke mechanismen ten grondslag liggen aan het ergogene effect van cafeïne. Desalniettemin zijn er enkele mechanismen voorgesteld, zoals een verschuiving van het substraatverbruik naar vetzuren, stimulering van de natriumkalium pomp-activiteit en een verlaagde perceptie van inspanning en pijn.

7.2.1 Verschuiving van substraatverbruik

In de eerste studie die een verbetering van de sportprestaties liet zien door cafeïne, werd gekeken naar het effect van cafeïne-inname op de tijd tot uitputting op een fietsergometer [104]. Cafeïne bleek effectief in het verlengen van de tijd tot uitputting. Ook werd er een stijging in de plasmaconcentratie van vrije vetzuren gezien na inname van cafeïne. Inderdaad leidt cafeïne tot een verhoogde noradrenaline- en adrenaline-afgifte [385] en ook is het aannemelijk dat antagonisme van de A1-isovorm-adenosinereceptor van adipocyten de lipolyse stimuleert [207, 435].

Bovendien trad er door de inname van cafeïne een daling op van de respiratoire uitwisselingsratio (zie kader 7.1). Deze daling suggereerde dat er meer vetoxidatie optrad. Een verhoogde plasmaconcentratie van vrije vetzuren zorgt inderdaad voor een overschakeling van vele weefsels, waaronder skeletspieren, naar vetzuurverbranding. Dit fenomeen, waarbij een verschuiving van substraatverbruik van glucose naar vetzuren plaatsvindt, heet ook wel de Randle-cyclus. Bijgevolg zou door de verhoogde vetzuuroxidatie glycogeen gespaard kunnen worden, wat tot het ergogene effect zou leiden. Meerdere vervolgonderzoeken wisten echter geen glycogeensparend effect van cafeïne aan te tonen [176]. Tegenwoordig wordt dit daarom niet meer gezien als een onderliggend mechanisme voor het ergogene effect van cafeïne.

Kader 7.1



De respiratoire uitwisselingsratio is de verhouding tussen de hoeveelheid kooldioxide die is geproduceerd en de hoeveelheid zuurstof die is gereduceerd (en dus geconsumeerd). Deze ratio wordt bepaald door de gaswisseling bij de mond te meten. Deze waarde vormt een goede benadering van de respiratoire quotiënt. De respiratoire quotiënt geeft dezelfde ratio weer, maar dan op niveau van een cel.

De ratio geeft zodoende informatie over het substraatverbruik van het energiemetabolisme. Een ratio van 1 betekent dat de geproduceerde hoeveelheid kooldioxide gelijk is aan de geconsumeerde hoeveelheid zuurstof. Een ratio lager dan 1 betekent dat er meer zuurstofmoleculen worden geconsumeerd dan dat er kooldioxidemoleculen worden geproduceerd. De volledige verbranding van glucose consumeert 6 zuurstofmoleculen en produceert 6 kooldioxide-moleculen. De ratio van iemand die alléén glucose zou verbranden zou daarom 1 zijn. De koolstofatomen van vetten (en eiwitten) zijn echter minder

geoxideerd dan die van glucose. Dit heeft als gevolg dat er meer kooldioxidemoleculen geproduceerd worden per zuurstofmolecuul bij volledige verbranding. Zo kent de volledige verbranding van palmitaat een ratio van 0.7. Er zijn namelijk 23 zuurstofmoleculen nodig voor de volledige verbranding van palmitaat en er worden slechts 16 kooldioxidemoleculen geproduceerd. Wanneer een interventie zorgt voor een lagere respiratoire uitwisselingsratio, dan heeft de interventie waarschijnlijk geleid tot een verhoogde vetzuuroxidatie. In rust en in nuchtere toestand bedraagt de respiratoire uitwisselingsratio ongeveer 0.8.

7.2.2 Stimulering natriumkaliumpomp-activiteit

De contractie van een spier wordt geïnitieerd door een actiepotentiaal (zie sectie 1.3). Er vindt een snelle depolarisatie van het sarcolemma plaats door de opening van natriumkanalen. Tijdens de repolarisatiefase openen zich kaliumkanalen die leiden tot een kaliumefflux. Bij herhaaldelijke depolarisatie verliest de spiercel steeds een beetje kalium en stijgt de extracellulaire kaliumconcentratie. Dit heeft een negatief effect op de excitatie-contractiekoppeling (en bijgevolg de spiercontractie) en zou ook een oorzaak van spierversuring kunnen zijn [380, 10, 99]. De natriumkaliumpompen kunnen de balans weer herstellen. Cafeïne, en andere methylxanthines, zijn in staat om de activiteit van de natriumkaliumpomp in skeletspieren te stimuleren [282]. Zodoende zou dit de excitatie-contractiekoppeling kunnen verbeteren en verzuring tegen kunnen gaan.

Kader 7.2



In 1996 onderzochten Vandenberghe en zijn collega's aan de Katholieke Universiteit Leuven of suppletie van cafeïne in combinatie met creatine leidde tot een hoger creatineniveau in de spieren dan creatine alleen [461]. De spiercellen nemen creatine op middels de creatinetransporter (CrT), een Na^+ - en Cl^- -afhankelijke antiporter (zie sectie 8.1.2). Een groter Na^+ -gradiënt zou dus de opname van creatine moeten stimuleren. Gezien natriumkaliumpompen dit gradiënt vergroten en cafeïne de activiteit ervan stimuleert, hypothesiseerden Vandenberghe en zijn collega's dat de toevoeging van cafeïne aan een creatinelaadfase zou leiden tot een nóg hogere intracellulaire creatineconcentratie. De uitgevoerde klinische studie toonde echter dat de toevoeging van cafeïne geen effect had op de stijging van de intracellulaire creatineconcentratie door creatinesuppletie.

7.2.3 Verlaagde perceptie van inspanning en pijn

De ervaring van pijn kan zorgen voor verslechterde sportprestaties. Pijn geeft de hersenen het signaal dat er weefselschade is opgelopen of dreigt plaats te vinden. Pijn vloeit voort uit de prikkeling van zogeheten nocisensoren die hun naam danken aan het Latijnse woord *noxa* (= schade). Nocisensoren zijn de vrije zenuwuiteinden van nocisensorische neuronen, die het signaal teruggeleiden naar het ruggenmerg. In het ruggenmerg wordt er overgeschakeld op opstijgende secundaire neuronen, die het verder geleiden naar de hersenen. Nocisensoren kunnen verschillende prikkelingen waarnemen en zo voortgeleiden via de nocisensorische neuronen. Zo zorgen zij voor een razendsnelle voortgeleiding wanneer je per ongeluk je hand onder een gloeiend hete kraan steekt, hetgeen zorgt voor een terugtrekreflex.

Belangrijk in de context van sportprestaties zijn onder andere de chemische prikkels die ontstaan bij een intensieve inspanning. Zo ontstaat er een karakteristiek pijnlijk

gevoel aan de benen tijdens het hardlopen of wielrennen. Een belangrijke rol is mogelijk weggelegd voor adenosinereceptoractivatie bij pijnsensatie door een chemische prikkel (adenosine) [404]. Zoals eerder vermeld stijgt de extracellulaire concentratie van adenosine bij intensieve inspanning. Dit zou een oorzaak kunnen zijn van pijn bij dit soort inspanning. Als adenosinereceptorantagonist zou cafeïne dit kunnen remmen en zo de sportprestaties verbeteren.

In 2003 werd voor het eerst onderzocht of cafeïne spierpijn in de benen tijdens fietsen kon verminderen [318]. Cafeïneinname (10 mg/kg lgw) zorgde inderdaad voor lagere pijnscores bij fietsen op een gematigde intensiteit (60% VO_2 -piek). Vervolgonderzoek van hetzelfde lab suggereert dat deze verlaagde pijnsensatie door cafeïne een lineaire dosis-responsfunctie volgt bij mannen [335]. Deze dosis-responsfunctie werd echter door hetzelfde lab niet gevonden bij vrouwen [317]. Het is onduidelijk waardoor dit genderverschil zou kunnen komen. Mogelijk bestaat er ook een pijnniveau waarboven cafeïne geen effect meer heeft [172]. Voor een gegeven hoeveelheid pijn kan cafeïne door een pijnverminderend effect de prestaties verbeteren, maar bij een te hoog pijnniveau vindt er geen pijnverminderend effect meer plaats. Desalniettemin laten meerdere studies een verbetering van de sportprestaties zien op hoge intensiteit. Dit betekent dat het ergogene effect bij een hoge intensiteit op een ander mechanisme berust dan een verlaagde pijnperceptie.

Nauw gerelateerd aan de perceptie van pijn is de perceptie van inspanning. De perceptie van inspanning omvat de collectieve integratie van afferente terugkoppeling van cardiorespiratoire, metabole en thermische stimuli en voorwaartskoppingsmechanismen (Eng.: *feed-forward mechanisms*), zodat kan worden aangevoeld hoe moeilijk of makkelijk een lichaams oefening voelt op een bepaald ogenblik [144]. Een meta-analyse uit 2005 toonde aan dat cafeïne de *rating of perceived exertion* (RPE, een schaal voor de perceptie van inspanning [62]) met 5,6% liet afnemen tijdens verschillende sporten zoals fietsen, hardlopen, zwemmen en roeien [130].

Het effect van cafeïnesuppletie op RPE is echter minder eenduidig wanneer men kijkt naar onderzoek dat zich richt op krachttraining. In een studie moesten proefpersonen op 60% van hun 1-herhalingsmaximum (1RM) verschillende krachttrainingsoefeningen doen, waaronder bankdrukken, deadliften en squatten [135]. Cafeïnesuppletie leidde hierbij tot een stijging van het aantal herhalingen, alsook een lagere RPE-beoordeling ten opzichte van een placebo. Andere vergelijkbare onderzoeken laten dit laatste echter niet zien [180, 227, 23, 113, 109].

Hierbij moet de kanttekening geplaatst worden dat het meeste onderzoek wel een prestatiebevorderend effect (bijvoorbeeld meer herhalingen) laat zien onder deze omstandigheden. Het is daarom misschien niet verwonderlijk dat de RPE ongewijzigd blijft: er worden betere prestaties neergezet die anders de RPE tot een hoger niveau zouden kunnen tillen.

7.3 Klinische resultaten

Er zijn veel studies uitgevoerd naar het ergogene effect van cafeïne op de prestaties bij duursporten en sporten met een hoge intensiteit (1–60 min, zoals zwemmen, roeien en [midden]langeafstandlopen) [75]. Hierbij lijkt cafeïnesuppletie effectief in het verbeteren van de sportprestaties. Minder duidelijk en effectief is het effect bij korte krachtspanningen. Het effect van cafeïnesuppletie op spierkracht (1-herhalingsmaximum [1-RM]) en

spieruithoudingsvermogen (herhalingen tot falen [RTF]) lijkt gering. Enkele studies vinden geen statistisch significant effect [22, 479, 138, 447] en andere studies vinden weliswaar een effect, alleen is dit vaak vrij klein [227, 169, 134].

Astorino e.a. onderzochten het effect van een dosis cafeïne (6 mg/kg lgw) op 1-RM bankdrukken en leg press, en RTF op een intensiteit van 60% 1-RM [22]. In totaal deden 22 proefpersonen met krachttrainingervaring mee aan deze dubbelblind placebogecontroleerde cross-over trial. Er werd geen statistisch significant effect gevonden op zowel de 1-RM- als de RTF-metingen. Wel leek er een stijging plaats te vinden in het aantal herhalingen bij de RTF-metingen en resulterend een hogere absolute belasting (stijging van 11–12%). Mogelijk bereikte dit effect geen statistische significantie door de beperkte steekproefgrootte.

Vergelijkbaar onderzoek werd uitgevoerd door Williams e.a. [479]. Ook deze studie was dubbelblind placebogecontroleerd en cross-over opgezet, met in totaal 9 getrainde proefpersonen. De cafeïnedosis was in deze studie lager (300 mg, circa 3.6 mg/kg lgw) en er werd alleen gekeken naar het effect op kracht (1-RM) en uithoudingsvermogen (RTF op 80% 1-RM) van het bovenlichaam (bankdrukken en lat pulldown). Ook bij deze studie werd geen statistisch significant effect gevonden, wel werd ook hier een stijging gevonden in de absolute belasting. Deze nam 10% toe voor het bankdrukken en 5% voor lat pulldown. Ook hier zou de kleine steekproefgrootte mogelijk een rol kunnen hebben gespeeld in het ontbreken van een statistisch significant effect. Desalniettemin vond ook een recente studie van Trexler e.a. geen significant effect van cafeïnesuppletie (300 mg) op spierkracht (1-RM) en -uithoudingsvermogen (RTF op 80% 1-RM) in een getrainde populatie [447]. Hetzelfde vonden Eckerson e.a. bij getrainde proefpersonen die 160 mg cafeïne gesuppleerd kregen [138]. Al zou een mogelijk ergoogeen effect van cafeïne onderbelicht kunnen zijn door de lage dosis in deze studie, gezien de aanname dat een minimale dosis van 3 mg/kg lgw nodig is voor een optimaal effect.

In een cross-over trial uitgevoerd door Hudson e.a. voerden proefpersonen vier sets beenextensies en armcurls uit tot falen. Het gebruikte gewicht voor deze herhalingen was gebaseerd op een geschatte 12-RM. De cafeïnegroep kreeg in deze studie een dosis van 6 mg/kg lgw. Er werd een significante stijging in het totaal aantal herhalingen gevonden ten opzichte van de placebogroep. Deze significante stijging werd echter alleen gevonden bij de eerste set van de reeks van vier. Een andere cross-over trial van Duncan e.a. vond ook een stijging in het spieruithoudingsvermogen na cafeïnesuppletie [134]. De proefpersonen in deze studie hadden gemiddeld 9.5 jaar ervaring met krachttraining. Het spieruithoudingsvermogen bepaalden Duncan e.a. aan de hand van RTF op 60% 1-RM van bankdrukken, deadlifts, prone row, en squatten. Na inname van cafeïne werden er gemiddeld 1.5 meer herhalingen gemaakt. Dit terwijl de cafeïnedosis in deze studie flink lager lag, namelijk slechts 179 mg.

Goldstein e.a. onderzochten het effect van cafeïne op kracht van het bovenlichaam in vijftien vrouwen die ervaring hadden met krachttraining [169]. Na inname van cafeïne (6 mg/kg lgw) werd er een significante stijging in de 1-RM-bankdrukken gevonden. De stijging was zeer gering (+0.8 kg). Ook werd de RTF op 60% 1-RM bepaald, echter bleef deze onveranderd na cafeïne-inname.

De resultaten in de literatuur blijken vrij wisselend. Cafeïnesuppletie lijkt een acuut effect te hebben op het spieruithoudingsvermogen, waardoor bij een gegeven intensiteit meer herhalingen kunnen worden gemaakt en resulterend een hogere absolute belasting kan worden behaald. Op spierkracht (1-RM) lijkt cafeïne ten hoogste een zeer klein effect

te hebben.

7.4 Veiligheid

Doordat een groot deel van de wereldpopulatie dagelijks cafeïne binnenkrijgt, is er veel wetenschappelijk onderzoek voorhanden naar de veiligheid ervan. Cafeïne is een middel met een acute werking. Binnen een uur na inname voelen mensen zich vaak al alerter of opgewekter. Deze snelle werking is ook terug te zien in bijvoorbeeld de bloeddruk. In een review wordt gerapporteerd dat een enkele dosis van 200–250 mg in normotensieve (een normale bloeddruk) mensen de systolische bloeddruk met 3–14 mmHg en de diastolische bloeddruk met 4–13 mmHg liet toenemen [333]. Deze stijging is al meetbaar binnen 0.5 uur, piekt na circa 1–2 uur, en kan tot wel 2–4 uur aanhouden. Ook bij mensen met hypertensie (een te hoge bloeddruk) vindt er een stijging plaats. Zo wordt bij deze mensen een stijging van de systolische druk met 8.1 mmHg en een stijging van de diastolische druk met 5.7 mmHg gevonden na inname van 200–300 mg cafeïne [311]. Het gebruik van bloeddrukverlagers lijkt hier geen invloed op te hebben. Ook laat een kleinschalige studie een lichte stijging van de systolische bloeddruk zien in normotensieve mannen voor, tijdens en na krachttraining na inname van cafeïne (6 mg/kg lgw) ten opzichte van placebo [21].

Cafeïne zorgt er tevens voor dat de myocardiale (hartspier) bloedtoevoer afneemt tijdens inspanning [209]. Deze gegevens klinken in eerste instantie zorgelijk. De Europese Voedselveiligheidsautoriteit (EFSA) concludeert echter dat er geen klinische relevante daling van de coronaire bloedtoevoer plaatsvindt met dosissen tot 200 mg in gezonde mensen [441]. Van hogere dosissen is onvoldoende bekend. Ook stelt de EFSA dat het effect op de bloeddruk met dosissen tot 200 mg een lage klinische relevantie kent. Nota bene wordt er bij chronische koffieconsumptie (>3 koppen per dag) geen associatie gevonden met een verhoogde kans op hypertensie [504]. Chronische cafeïneconsumptie lijkt dan ook geen verhoogd risico op cardiovasculaire aandoeningen met zich mee te brengen [485].

Cafeïne heeft ook een diuretisch effect, oftewel het verhoogt de urineproductie. Dit diuretisch effect is het gevolg van het natriuretisch (natriumuitscheidende) effect van cafeïne op de nieren. Een meta-analyse toont aan dat dit effect in rust echter vrij klein is bij mannen, al is het effect wat prominenter bij vrouwen [503]. Opmerkelijk genoeg is het diuretische effect van cafeïne nagenoeg niet aanwezig in combinatie met fysieke inspanning. Waarschijnlijk overtreft het antidiuretische effect van fysieke inspanning (zie kader 7.3) het diuretisch effect van cafeïne. Samenvattend is er geen zorg voor uitdroging, noch noodzaak voor het verhogen van vochtinname bij inname van cafeïne in combinatie met fysieke inspanning.

Kader 7.3



Wanneer je sport en begint te zweten, daalt het bloedplasmavolume en stijgt bijgevolg de bloedosmolaliteit. In de hersenen, meer specifiek de hypothalamus, wordt de stijging van de bloedosmolaliteit opgepikt door osmoreceptoren. Om een juiste bloedosmolaliteit te waarborgen, zal het lichaam maatregelen gaan treffen. De hypothalamus geeft een signaal door aan de neurohypofyse en vervolgens geeft deze het stofje antidiuretisch hormoon (ADH, ook wel bekend als vasopressine) af aan de circulatie. ADH werkt vervolgens in op receptoren in de nieren die ervoor zorgen dat zij meer water reabsorberen

(anti-diuretisch effect). Zo beperkt het lichaam het vochtverlies. Ook activeert sporten na enkele minuten het renine-angiotensine-aldosteronsysteem (RAAS). Activering van RAAS zorgt onder meer voor een stijging van het hormoon aldosteron in de circulatie. Aldosteron werkt ook in op receptoren in de nieren, waardoor zij meer natrium reabsorberen (antinatriuretisch effect) en bijgevolg meer water.

Het opwekkende effect van cafeïne heeft als keerzijde dat het de slaap kan beslechten. Het kan de slaaplatentie (de tijd benodigd om in slaap te vallen) verlengen, de totale slaaptijd verkorten en de ervaren slaapkwaliteit verminderen [97]. Om die reden is het aan te raden om geen cafeïne vlak voor het slapen te nemen. Zoals besproken in sectie 7.1.2 loopt de halfwaardetijd zeer uiteen, van circa 2.5 uur tot 10 uur. Bij die mensen bij wie het cafeïnemetabolisme traag verloopt kan cafeïne die 's middags is genomen dus zelfs nog een negatief effect hebben op de slaap. Bij mensen die een lage gebruikelijke cafeïne-inname hebben is het negatieve effect op de slaap prominenter dan bij mensen die een hogere gebruikelijke inname hebben [211]. Mochten er slaapproblemen optreden door cafeïnegebruik, dan kan getracht worden de dosis te verlagen of deze eerder te nemen, zodat het effect grotendeels is uitgewerkt wanneer er geslapen moet worden.

Samenvattend concludeert de EFSA dat een cafeïne-inname tot 400 mg per dag (ongeveer 5.7 mg/kg lgw voor een volwassene van 70 kg) veilig is voor gezonde volwassenen, met uitzondering van zwangere vrouwen [441]. Zwangere vrouwen dienen hun inname te beperken tot 200 mg per dag. Tevens worden enkelvoudige dosissen tot 200 mg (circa 3 mg/kg lgw voor een volwassene van 70 kg) als veilig beschouwd voor gezonde volwassenen. Deze hoeveelheid is ook veilig wanneer deze minder dan twee uur voor een intense fysieke inspanning wordt genomen. Over hogere enkelvoudige dosissen doet de EFSA geen uitspraak. De studies die enkelvoudige dosissen tot 6 mg/kg lgw hanteerden vermelden echter geen serieuze bijwerkingen. Wel bemerken velen een opgejaagd gevoel en een verhoogde hartslag bij hogere dosissen.

7.5 Conclusie

Cafeïne wordt wereldwijd veel geconsumeerd en ook in Nederland is sprake van een hoge dagelijkse consumptie. Cafeïne wordt na inname vrij snel geabsorbeerd en de halfwaardetijd is sterk persoonsafhankelijk. Factoren die hierbij een rol spelen zijn onder andere roken, geslacht, BMI, zwangerschap en fase van de menstruele cyclus in vrouwen, maar ook voedingsfactoren zoals het eten of drinken van alcohol, gegrild vlees en grapefruitsap. Vanuit de circulatie komt het terecht bij de verschillende lichaamsweefsels, waar het kan binden aan adenosinereceptoren. Doordat cafeïne hier wel aan bindt maar deze niet activeert, zet het de fysiologische ligand adenosine buitenspel. Aan dit mechanisme heeft cafeïne zijn werking te danken. In het bijzonder verlaagt het de perceptie van inspanning en pijn tijdens het sporten. Mogelijk is dit de reden waarom bij een gegeven intensiteit meer herhalingen kunnen worden gemaakt na inname van cafeïne en het zo het spieruithoudingsvermogen lijkt te bevorderen. Het effect op 1-RM-krachtinspanningen lijkt echter zeer gering. De effectieve dosis die hiervoor gebruikt dient te worden is 3–6 mg/kg lgw. Voor een volwassene van 70 kg komt dit neer op 210–420 mg. Een inname tot 400 mg per dag, of 5.7 mg/kg lgw voor een volwassene van 70 kg, wordt beschouwd als volstrekt veilig door de EFSA. Ook een enkelvoudige dosis van 200 mg of circa 3 mg/kg lgw voor een volwassene van 70 kg, is veilig bevonden door de EFSA.

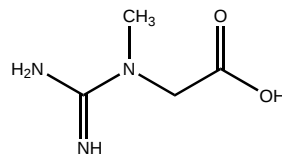
8. Creatine

8.1 Inleiding

Roger C. Harris en zijn medewerkers toonden in 1992 aan dat het herhaaldelijk doseren van grote hoeveelheden creatine (5 g creatinemonohydraat vier- of zesmaal per dag gedurende meer dan 2 dagen) leidde tot een stijging van de creatineconcentratie in de quadriceps femoris van mensen [196]. Een gedeelte van de creatine accumuleerde in de vorm van creatinefosfaat. Gezien de belangrijke rol hiervan in het energiemetabolisme van onder andere spiercellen (zie hoofdstuk 2), bleven deze resultaten niet lang onopgemerkt door de sportwereld. Het was dan ook in het begin van de jaren negentig dat creatinesuppletie zijn opmars maakte en een ontzettend populair voedingssupplement werd. Vandaag de dag is het nog steeds razend populair onder sporters van verschillende disciplines, doch in het bijzonder sporters die de spiermassa wensen te vergroten of krachtwinst zoeken.

De populariteit van creatine is te danken aan meerdere aspecten, zo is er enorm veel klinisch onderzoek verricht dat een prestatiebevorderend effect laat zien bij hoge-intensiteitstrainingen, zoals krachttraining. Ook laten talloze studies een positief effect zien op de vetvrije massa. Daarnaast is creatine ontzettend goedkoop in gebruik en heeft het een zeer goed veiligheidsprofiel.

Ook zonder creatinesuppletie krijgt het menselijk lichaam creatine binnen uit de normale voeding. Creatine is voornamelijk aanwezig in spierweefsel, en creatine is dan



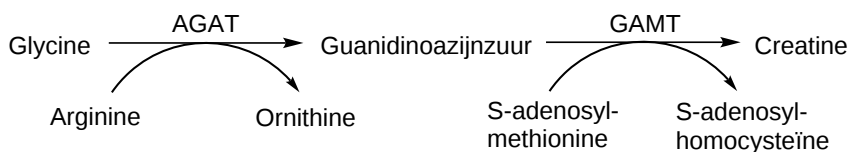
Figuur 8.1: Structuurformule van creatine. Onder fysiologische omstandigheden is de carboxylgroep (-COOH) gedeprotoneerd ($pK_a = 3.8$) en de iminogroep (=NH) geprotoneerd ($pK_a = 12.7$).

ook terug te vinden in het vlees dat men eet.

8.1.1 Biosynthese

Creatine vervalt spontaan, en onomkeerbaar, tot creatinine. Creatinine wordt uitgescheiden door de nieren in de urine. Per dag vervalt naar schatting 1.7% van de totale hoeveelheid creatine in het lichaam tot creatinine [489]. Voor een volwassen man van 70 kg tussen de 18 en 29 jaar komt dit neer op circa 1.7 g per dag (23.6 mg/kg/dag) [426]. Bij ouderen en vrouwen ligt dit iets lager, omdat zij procentueel minder spiermassa hebben. De hoeveelheid creatine in het lichaam is namelijk grotendeels een weerspiegeling van de hoeveelheid spiermassa. Dit komt doordat spiermassa een groot gedeelte van de totale lichaamsmassa beslaat en over een hoge concentratie creatine beschikt. Een persoon met veel spiermassa zal zodoende dus ook een hogere creatine-omzet (Eng.: *creatine turnover*) kennen, er is tenslotte meer creatine in het lichaam aanwezig om te vervallen naar creatinine.

Gezien dit continue verval naar creatinine en de daaropvolgende uitscheiding in de urine, moet het lichaam dit compenseren door zijn creatine-opslag aan te vullen. Dit kan op twee manieren gebeuren, namelijk via voedingsmiddelen die creatine bevatten, zoals vlees en vis, of door biosynthese van creatine (figuur 8.2). In het menselijk lichaam wordt creatine gesynthetiseerd uit de twee aminozuren glycine en arginine. Deze twee aminozuren vormen de bouwstenen voor de directe precursor van creatine: guanidinoazijnzuur. Eerst wordt een guanidinegroep van arginine overgedragen aan glycine, waardoor guanidinoazijnzuur en ornithine worden gevormd. Deze reactie wordt gekatalyseerd door arginine-aminotransaminase (AGAT). Vervolgens wordt er een methylgroep overgedragen van S-adenosylmethionine (SAM) aan guanidinoazijnzuur, waardoor creatine en S-adenosylhomocysteïne worden gevormd. Deze reactie wordt gekatalyseerd door guanidinoacetaatmethyltransferase (GAMT). Methionine wordt geactiveerd tot SAM met behulp van ATP, een reactie gekatalyseerd door methionine-adenosyltransferase. SAM is betrokken als methyl donor bij talrijke processen [280]. De eerste reactie van de creatinebiosynthese, waarbij guanidinoazijnzuur wordt gevormd, wordt beschouwd als de fluxbepalende stap [471]. AGAT vormt dus het fluxbepalende enzym.



Figuur 8.2: Creatine wordt endogeen gesynthetiseerd via een tweestap-mechanisme. Het enzym AGAT katalyseert de eerste reactie, waarbij guanidinoazijnzuur en ornithine worden gevormd uit glycine en arginine. Guanidinoazijnzuur vormt vervolgens het substraat voor de tweede reactie gekatalyseerd door GAMT, waarbij S-adenosylmethionine een methylgroep afstaat en zo creatine wordt gevormd.

Circa 20% van de guanidinoazijnzuursynthese vindt plaats in de nieren [139]. Aansluitend vindt er transport naar de lever plaats, waar het guanidinoazijnzuur wordt geconverteerd naar creatine door de hoge AGAT-activiteit aldaar. Het overige guanidinoazijnzuur wordt waarschijnlijk in de lever en alvleesklier geproduceerd [489].

Creatinesuppletie leidt tot een daling van AGAT-activiteit en AGAT-mRNA. Dit zorgt ervoor dat de biosynthese wordt geremd door creatinesuppletie [489, 139, 250]. Dit is een vorm van feedbackinhibitie. Zodra er genoeg eindproduct (creatine) aanwezig is, wordt de fluxregulerende stap (overdracht van de guanidinegroep aan glycine) van het reactiepad geremd.

8.1.2 Absorptie

Creatine wordt oraal gesuppleerd waarna het via de slokdarm in de maag belandt. De maag kent een lage pH-waarde (zeer zuur). In het verleden waren er zorgen over degradatie van creatine naar creatinine door deze lage pH-waarde in de maag. Deze zorgen blijken echter ongegrond. De halfwaardetijd van creatine naar creatinine bedraagt 55 dagen bij een pH-waarde van 1.4, 7.5 dagen bij een pH-waarde van 3.7, en 40.5 dagen bij een pH-waarde van 6.8 [350]. Gezien creatine slechts een fractie van deze halfwaardetijden in de maag aanwezig zal zijn, zal er geen significante degradatie naar creatinine optreden.

Vanuit de maag belandt creatine in de dunne darm. Creatine is afhankelijk van actief transport voor zijn absorptie. Transporters die creatine door de darmwand weten te transporteren zijn gevonden in de ileum [348] en jejunum [443, 348] van knaagdieren. Bovendien bevinden creatinetransporters zich op zowel de apicale [443] (naar het darmlumen gericht) als basolaterale membraan [339] van enterocyten.

De transporter die ervoor zorgt dat cellen creatine kunnen opnemen, heet de creatine-transporter (CrT). De CrT is een Na^+ en Cl^- -afhankelijke antiporter die het concentratiegradiënt van deze ionen (hoog extracellulair, laag intracellulair) koppelt aan het inwaartse transport van creatine tegen zijn concentratiegradiënt in. Dit is een vorm van secundair actief transport (beschreven in sectie 3.2.2). De K_d -waarde van de menselijke CrT wordt geschat tussen de 15-77 μM en de plasmaconcentraties liggen tussen de 50-100 μM [420]. Uitgaande van het lagere eind van dit K_d -bereik, en het hogere eind van het plasmaconcentratiebereik, is creatinetransport duidelijk verzadigd. Het moet echter worden benadrukt dat creatinesuppletie een duidelijke stijging laat zien in de intracellulaire creatineconcentratie, zoals in 1992 al was aangetoond door Roger C. Harris en zijn medewerkers [196]. Een observatie die in talloze daaropvolgende studies ook werd gemaakt. Dit kan erop duiden dat creatinetransport normaal gesproken toch niet verzadigd is, of dat transporteractiviteit wijzigt bij hogere plasmaconcentraties.

Insuline versterkt de accumulatie van creatine in het spierweefsel, waarschijnlijk door stimulering van het creatinetransport [179, 178, 427, 357]. Het ligt voor de hand dat dit komt doordat insuline de natriumkaliumpomp-activiteit stimuleert, waarschijnlijk doordat insuline zorgt voor translocatie van natriumkaliumpompen naar het sarcolemma [432]. Dit stimuleert vervolgens het secundair transport van natriumafhankelijke transporters, zoals de CrT. Er is echter een vrij hoge insulineconcentratie in het bloed nodig om het transport te stimuleren. In een klinische studie kregen mannen een intraveneus insuline-infuus aangelegd met snelheden van 5, 30, 50 of 105 $\text{mU}/\text{m}^2/\text{m}$ [427]. Er werd 5 g creatine oraal toegediend, alsook werd er 75 minuten na inname hiervan creatine toegediend via een neusmaagsonde, wat leidde tot een totale inname van 12.4 g creatine. De vier verschillende insuline-infuussnelheden leidden tot seruminsulineconcentraties van respectievelijk 12, 56, 109 en 199 mU/l . Alleen deze laatste twee concentraties bleken hoog genoeg om de creatineabsorptie door de spieren te verbeteren. De gebruikte hoeveelheden koolhydraten in overige studies was dan ook zeer hoog (circa 95 g), wat het minder praktisch maakt om toe te passen. Ter vergelijking, een gemengde maaltijd bestaande uit 75 g zetmeel, 37 g

eiwit en 17 g vet gaf slechts een piek in de plasmainsulineconcentratie van 44 mU/l [81]. Afleidend uit voorgaande gegevens is dit niet voldoende om de accumulatie van creatine in het spierweefsel te verbeteren.

Omdat aminozuren ook een insulinerespons kunnen opwekken, werd tevens onderzocht of een deel van de suikers benodigd voor de verhoogde accumulatie vervangen kon worden met wei-eiwithydrolysaat, leucine en fenylalanine [357]. Een combinatie van 57 g dextrose, 14 g wei-eiwithydrolysaat, 7 g leucine en 7 g fenylalanine bleek even effectief als 95 g dextrose in het stimuleren van de creatineretentie.

De toedieningsvorm en -hoeveelheid hebben invloed op de plasmaconcentratiecurve [195]. Toediening van creatine als oplossing laat een snelle piek in de plasmaconcentratiecurve zien 0.5–1 u na inname. Daaropvolgend zet een snelle daling in van de plasmaconcentratie. Bij toediening van een gelijkende hoeveelheid creatine in de vorm van biefstuk vindt de piek in de plasmaconcentratiecurve vertraagd plaats (~1.5 u na inname) en is deze minder hoog. De daaropvolgende daling verloopt ook geleidelijker ten opzichte van creatine in oplossing. Het oppervlak onder de plasmaconcentratiecurve verschilt echter niet.

Dezelfde onderzoekers lieten, vergeleken met creatine in oplossing, een kleiner oppervlak onder de plasmaconcentratiecurve zien wanneer een gelijke hoeveelheid creatine als tablet of suspensie werd ingenomen. Dit is mogelijk indicatief voor een lagere biologische beschikbaarheid bij deze toedieningsvormen, door een incomplete absorptie vanuit het darmstelsel. Creatine toegediend als oplossing wordt waarschijnlijk volledig geabsorbeerd door het darmstelsel. Een studie wist geen creatine of creatinine te vinden in de uitwerpselen na één week suppletie van driemaal 2 g creatine per dag [120]. Met deze gegevens lijkt creatine in oplossing de voorkeur te genieten.

Kader 8.1



Er zijn veel verschillende varianten van creatine op de markt verschenen die een betere effectiviteit beloven dan de gangbare creatinemonohydraat. Eén van deze varianten is creatine-ethylester. Hierbij is een ethylgroep gebonden aan het molecuul bij de carboxylgroep. De ethylester zorgt ervoor dat het molecuul lipofieler wordt (minder polair), waardoor het makkelijker langs celmembranen kan diffunderen en hierdoor niet afhankelijk is van transportereiwitten. En inderdaad, creatine-ethylester heeft een verbeterde permeabiliteit langs darmepitheelcellen [188]. Echter, de stof vervalt ontzettend snel ($t_{1/2} < 1$ min) naar creatinine bij een pH-waarde van 7.4 (zoals die van het bloed). Niet geheel verrassend liet een studie ook zien dat creatine-ethylester minder effectief is dan creatinemonohydraat in het verhogen van de hoeveelheid creatine in het spierweefsel [423].

Tot op heden is er geen enkele creatinevariant verschenen die effectiever is dan creatinemonohydraat. Er valt immers ook weinig te verbeteren aan de monohydraatvariant, aangezien het al zo'n hoge biologische beschikbaarheid heeft en goedkoop te produceren is.

8.1.3 Metabolisme en excretie

De degradatie van creatine naar creatinine is grotendeels een spontaan proces dat niet versneld wordt door tussenkomst van enzymen. Zowel creatine als creatinefosfaat vervallen naar creatinine. Van deze laatste is de omzetsnelheid iets hoger (2.6% per dag vs. 1.1% dag [489]). Creatinine diffundeert vervolgens uit de weefsels en belandt in de circulatie. Daaropvolgend wordt het in de urine uitgescheiden door de nieren. Zoals aangehaald

in sectie 8.1.1 scheidt een volwassen man van 70 kg tussen de 18 en 29 jaar circa 1.7 g creatine uit per dag (23.6 mg/kg/dag) [426].

Er wordt netto geen creatine of creatinine uitgescheiden aan de darmen, daar er geen creatine of creatinine werd gevonden in de uitwerpselen in de week na suppletie met driemaal daags 2 g creatine gedurende 1 week [120].

8.2 Werkingsmechanisme

Creatine heeft zijn werkzaamheid te danken aan de directe invloed die het uitoefent op het fosfaatenergiesysteem (zie sectie 2.2). Het vergroot de hoeveelheid creatine en creatinefosfaat in de spiercellen, waardoor vervolgens de flux door de creatinekinase (CK)-reactie (zie vergelijking 8.1) vergroot.



Dit positieve effect op de cellulaire energetica heeft uiteenlopende effecten tot gevolg. Een meta-analyse concludeerde dat creatine het behaalde aantal herhalingen, gewicht (kg), gegenereerde kracht (N) en vermogen (W) en totale hoeveelheid arbeid verbeterde gedurende korte (≤ 30 s) hoge-intensiteitsoefeningen [63]. Vaak wordt beredeneerd dat door de stijging in vermogen en het aantal behaalde herhalingen, er een verbeterde trainingsadaptatie zal optreden, waardoor de krachtprestaties verder verbeteren. Eveneens zou dit leiden tot meer spierhypertrofie. Een dubbelblind placebogecontroleerd onderzoek laat een stijging zien van de dwarsdoorsnede van spiervezels door creatinesuppletie in combinatie met krachttraining [466]. De proefpersonen waren bekend met krachttraining en hadden een gemiddelde lichaamsmassa van 82.1 (± 11.8) kg en 82.9 (± 14.3) kg (respectievelijk de creatine- en placebogroep). In rust lijkt creatinesuppletie echter geen effect te hebben op de spiereiwitsynthese of -afbraak, en zal dus gecombineerd moeten worden met een krachttrainingsprogramma voor enig effect hierop [285].

8.2.1 Temporele en spatiële energiebuffer

Creatinesuppletie zorgt ervoor dat de concentratie creatinefosfaat ([PCr]) in spiervezels stijgt [196]. Hiermee vergroot het de capaciteit van PCr om als temporele energiebuffer op te treden. Tijdens spiercontractie wordt adenosinetrifosfaat (ATP) gebruikt om de spiervezels samen te laten trekken, zoals beschreven in sectie 1.3. Creatinefosfaat vormt het substraat voor de CK-reactie (vergelijking 8.1) waardoor een daling in ATP direct wordt opgevangen door de energierijke fosfaatgroep van creatinefosfaat over te brengen aan het adenosinedifosfaat (ADP).

Bovendien fungeert creatine als spatiële energiebuffer. De energiebehoefte van spiervezels tijdens contractie ligt vrijwel volledig bij de myofibrillen in het cytosol. Het oxidatieve energiesysteem genereert echter energie op een andere locatie, namelijk in de mitochondria. Direct transport vanuit de mitochondria verloopt relatief traag, waardoor een groot gedeelte van de energie wordt uitgewisseld in de vorm van PCr (creatinefosfaat-shuttlesysteem, zie sectie 2.2).

Door de vorming van ATP uit creatinefosfaat en ADP wordt ook een daling van de pH-waarde opgevangen (zie vergelijking 8.1), immers worden protonen gegenereerd bij de hydrolyse van ATP door de myosine-ATPases, als ook door verbranding van glucose in de anaerobe glycolyse.

8.2.2 Hyperhydratie

Creatine is een osmotisch werkzame stof (voor een uitleg van osmose zie kader 11.1). Aan gezien een snelle lichaamssmassatoename wordt geobserveerd na een laadfase van creatine [312], wordt over het algemeen aangenomen dat dit door toedoen van waterretentie is. Men neemt aan dat een verhoogde creatineconcentratie in spiervezels zorgt voor een verhoogde osmolaliteit, wat resulteert in het aanzuigen van water door de cellen. Met behulp van MR-beeldvorming werd inderdaad een stijging van het intracellulaire vochtcompartiment van spiervezels na een laadfase van creatine gemeten [390]. Ook een multifrequentie bio-elektrische impedantie-analyse liet een stijging van het intracellulaire vochtcompartiment zien, maar niet van het extracellulaire vochtcompartiment, na drie dagen creatinesuppletie [505]. Een studie die dideuteriumoxide- en natriumbromide-verdunningsanalyse (zie kader 8.2) toepaste om het totale lichaamsvocht, het intracellulaire en extracellulaire vocht in kaart te brengen, kwam met onverwachte resultaten [362]. Er werd een stijging gevonden van het totale lichaamsvocht zowel 7 als 28 dagen na de start van creatinesuppletie, de verdeling van het vocht over de compartimenten veranderde echter niet. Tot op heden is er dus nog enige onzekerheid over de verdeling van het vocht over de vochtcompartimenten. Er moet opgemerkt worden dat alleen de studie op basis van MR-beeldvorming keek naar spierweefsel an sich in plaats van het gehele lichaam. De multifrequentie bio-elektrische impedantie-analyse en isotoop-verdunningsanalyse lijken dan ook in strijd met elkaar; zij beschouwen immers wel beide het totale lichaamsvocht. De isotoop-verdunningsanalyse is de meest betrouwbare methode van beide en zou dan ook als leidend moeten worden beschouwd van deze twee. Mogelijk draagt het toegenomen celvolume ten gevolge van creatinesuppletie ook bij aan een verhoogde eiwitsynthese, dan wel verlaagde eiwitafbraak. Het is namelijk gehypothetiseerd dat de cellulaire hydratiestatus deze processen beïnvloedt [200, 273]. Zo zou het opzwellen van de cel een anabool signaal vormen en het slinken van de cel een katabool signaal.

Kader 8.2



Het totale lichaamsvocht kan geschat worden met behulp van isotopen, zoals dideuteriumoxide (ook wel bekend als 'zwaar water') [407]. Hierbij wordt een oplossing met de isotoop toegediend aan een proefpersoon. Vervolgens verspreidt de isotoop zich vrijwel gelijkmatig over het totale lichaamsvocht. Hierdoor verdunt de concentratie van de isotoop. Door de concentratie van de isotoop vervolgens te bepalen vanuit een bloedafname, kan worden berekend hoe groot het totale lichaamsvocht is. Hiervoor kan de volgende formule worden gebruikt:

$$V_2 = \frac{C_1 V_1 - C_u V_u}{C_2} \quad (8.2)$$

V_2 is het watervolume waarin de isotoop volledig gelijkmatig zal zijn opgelost bij equilibrium (het totale lichaamsvocht), C_1 de concentratie van de toe te dienen dideuteriumoxide, V_1 het te injecteren dideuteriumoxidevolume (gestandaardiseerd naar 37°C), C_u de dideuteriumoxideconcentratie uitgescheiden in vocht voordat het equilibrium is bereikt en V_u het uitgescheiden vochtvolume voordat het equilibrium is bereikt.

Na enkele uren (twee tot zes), wanneer equilibrium is bereikt, wordt het verlies in de urine bepaald en een bloedmonster afgenomen. De hoeveelheid dideuteriumoxide in de afgenomen monsters wordt bepaald met een scintillatiemeter. Vervolgens kan het totale lichaamsvocht worden berekend.

Deze meetmethode kan ook worden gebruikt om de vetvrije massa te schatten. Vetvrije massa bestaat voor circa 73.2% uit vocht (en vetmassa bevat geen vocht). Door het gemeten totale lichaamsvocht te delen door 0.732 wordt een benadering van de vetvrije massa verkregen.

8.2.3 Satellietcellen

Een dubbelblind placebogecontroleerd onderzoek uit 2006 toont aan dat creatinesuppletie in combinatie met krachttraining de door training geïnduceerde stijging van het aantal satellietcellen en de concentratie van spiervezelkernen bevordert [337]. De proefpersonen kregen 6 g creatinemonohydraat viermaal per dag gedurende 7 dagen, gevolgd door eenmaal daags 6 g voor de daaropvolgende 15 weken. Er werd driemaal per week krachttraining beoefend gedurende deze totale tijdsspanne van 16 weken. Op vier punten in de tijd werden spierbiopsen afgenomen, namelijk in week 0, week 4, week 8 en week 16. De resultaten van de creatine- en placebogroep staan beschreven in tabel 8.1.

Een stijging van het aantal satellietcellen per spiervezel was significant in week 4 en 8 voor zowel de creatinegroep als de placebogroep. De waarde was echter significant groter in de creatinegroep ten opzichte van de placebogroep. Het dient echter benadrukt te worden dat in week 16 het aantal satellietcellen per spiervezel niet meer significant verschilde ten opzichte van week 0 in de creatinegroep en er geen significant verschil meer aanwezig was tussen beide groepen.

Verder was het relatief aantal satellietcellen significant groter in week 4 en 8 in de creatinegroep ten opzichte van de placebogroep, alsook het aantal spiervezelkernen per spiervezel in week 4. En hoewel het gemiddelde spiervezeloppervlak op geen van de punten in de tijd significant verschilde tussen beide groepen, was er in de creatinegroep op alle punten in de tijd wel een significant verschil ten opzichte van week 0. Door de grote standaarddeviatie en kleine steekproefgrootte is de kans groot op een vals negatief resultaat.

Desalniettemin is het onbekend in hoeverre dit mechanisme bijdraagt aan de ergogene effecten van creatinesuppletie. Bovendien is onzeker in hoeverre satellietcellen bijdragen aan spierhypertrofie, zoals besproken in sectie 1.5. Toekomstig onderzoek zou deze rol, alsook de bijdrage hiervan voor het ergogene effect van creatinesuppletie, kunnen verduidelijken.

8.2.4 Besparing van S-adenosylmethionine (SAM)

Zoals beschreven in sectie 8.1.1 vereist de biosynthese van creatine een methylgroep afkomstig van SAM. Naar schatting wordt zo'n 40% van de SAM gebruikt voor de biosynthese van creatine [69]. Door creatinesuppletie wordt de lichaamseigen biosynthese geremd, waardoor er mogelijk meer SAM beschikbaar komt. SAM verzorgt de methylgroep voor tal van reacties, waaronder voor hermethylering van homocysteïne. Creatinesuppletie leidt tot een lichte daling van de plasmahomocysteïneconcentratie [263]; dit bevestigt de denkwijze dat er inderdaad meer SAM 'bespaard' blijft voor andere methyleringsreacties door creatinesuppletie.

Vooralsnog is het onduidelijk welke rol besparing van SAM heeft bij de ergogene effecten van creatine.

	Week 0	Week 4	Week 8	Week 16
Aantal SC per spiervezel				
Creatinegroep	0.11 ± 0.03	0.23 ± 0.10 ^{**a}	0.21 ± 0.07 ^{**b}	0.14 ± 0.03
Placebogroep	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.03 [*]	0.14 ± 0.03 [*]	0.13 ± 0.03 [*]
Relatief aantal SC (%)				
Creatinegroep	5.3 ± 1.3	9.4 ± 3.0 ^{**a}	9.8 ± 2.7 ^{**b}	6.1 ± 1.3
Placebogroep	4.8 ± 0.6	6.0 ± 0.9 [*]	6.7 ± 1.2 [*]	5.4 ± 1.2
Aantal kernen/spiervezel				
Creatinegroep	1.90 ± 0.23	2.21 ± 0.13 ^{**b}	2.13 ± 0.24 [*]	2.13 ± 0.17 [*]
Placebogroep	1.98 ± 0.18	1.94 ± 0.21	2.06 ± 0.35	2.16 ± 0.30
Gem. spiervezeloppervlak				
Creatinegroep	5268 ± 646	5983 ± 849 [*]	6003 ± 1002 [*]	6148 ± 969 [*]
Placebogroep	5052 ± 450	5752 ± 765 [*]	5567 ± 591	5635 ± 648

Tabel 8.1: Aantal satellietcellen (SC) per spiervezel, relatief aantal SC ($\frac{SC}{SC+spiervezelkernen} \cdot 100\%$), aantal spiervezelkernen per spiervezel, en het gemiddelde spiervezeloppervlak (μm^2) gedurende de zestien weken durante onderzoeksperiode door Olsen e.a. [337]. Waarden weergegeven als gemiddelden $\pm$ SD. ^{*}Significant verschillend ten opzichte van week 0 ($P < 0.05$). ^{**}Significant verschillend ten opzichte van week 0 ($P < 0.01$). ^aSignificant verschillend ten opzichte van placebogroep ($P < 0.01$). ^bSignificant verschillend ten opzichte van placebogroep ($P < 0.05$).

8.2.5 Modulatie van genexpressie

Creatinesuppletie heeft effect op de expressie van verschillende genen. Enkele hiervan, betrokken bij spierhypertrofie, zijn uitgelicht in tabel 8.2.

In een studie waarbij creatine twaalf weken gesuppleerd werd, verhoogde dit de expressie van alle drie myosine zware keten (MHC)-isovormen [480] (de MHC-isovormen worden behandeld in sectie 1.4). De metingen werden drie uur na training verricht. Ook verhoogde het de totale hoeveelheid eiwit van de MHC1 β - en MHC2a-isovorm, maar niet van de MHC2x-isovorm. De totale hoeveelheid eiwit van de MHC2x-isovorm daalde. De verschuiving van MHC2x naar MHC2a is een normale adaptatie die optreedt bij krachttraining [283], creatinesuppletie lijkt deze adaptatie zodoende dus te versterken.

Een andere studie, die eveneens de mRNA-expressie van MHC1 β en MHC2a bepaalde, deed dit op meerdere punten in de tijd [119]. Er werd een laadfase van 5 dagen gehanteerd, waarna de bepalingen plaatsvonden in rust, direct na training, 24 u na training en 72 u na training. Interessant is dat de onderzoekers een stijging van MHC1 β -mRNA vonden in rust, maar niet na de training. Dit suggereert dat creatine mogelijk de expressie van deze isovorm onafhankelijk van training stimuleert. Wel vonden zij een stijging in MHC2a-mRNA direct na training, maar niet in rust, 24 u en 72 u na training. Jammer genoeg werd alleen de mRNA-expressie in kaart gebracht, en niet het eiwit.

8.3 Klinische resultaten

Sinds de publicatie van Harris e.a. in 1992 zijn er ontzettend veel studies uitgevoerd om de effecten van creatine in combinatie met sport te onderzoeken. De grote hoeveelheid studies zijn ruim voldoende om een geheel boek mee te kunnen vullen, laat staan een deel van een hoofdstuk.

In tabel 8.3 wordt een samenvatting verschaft van het effect op spierkracht en -uithoudingsvermogen op basis van twee literatuurstudies door Dempsey e.a. [122] en

Variabele	Tijdsduur	Effect
MHC1 β -mRNA	12 weken 5 dagen	↑ (3 u na training) [480] ↑ (in rust) [119] ↔ (direct, 24 u en 72 u na training) [119]
MHC2a-mRNA	12 weken 5 dagen 5 dagen	↑ (3 u na training) [480] ↑ (direct na training) [119] ↔ (in rust, 24 u en 72 u na training) [119]
MHC2x-mRNA	12 weken	↑ (3 u na training) [480]
MHC1-eiwit	12 weken	↑ (3 u na training) [480]
MHC2a-eiwit	12 weken	↑ (3 u na training) [480]
MHC2x-eiwit	12 weken	↓ (3 u na training) [480]
IGF-1-mRNA	5 dagen	↑ (in rust) [121] ↔ (3 u en 24 u na training) [121]
IGF-2-mRNA	5 dagen	↔ (3 u en 24 u na training en in rust) [121]
GLUT4-mRNA	5 dagen 5 dagen	↑ (in rust) [119] ↔ (direct, 24 u en 72 u na training) [119]
Myostatine-mRNA	5 dagen	↔ (in rust, direct, 24 u en 72 u na training) [119]
MAFbx-mRNA	5 dagen	↔ (in rust, direct, 24 u en 72 u na training) [119]
S6K1-P	5 dagen 5 dagen	↔ (3 u en 24 u na training en in rust) [121] ↔ (in rust, direct, 24 u en 72 u na training) [119]
4E-BP1-P	5 dagen 5 dagen 5 dagen 5 dagen	↑ (24 u na training) [121] ↔ (3 u na training en in rust) [121] ↓ (24 u na training) [119] ↔ (in rust, direct en 72 u na training) [119]
ERK1/2-P	5 dagen	↔ (in rust, direct, 24 u en 72 u na training) [119]
Akt-P (Thr308)	5 dagen 5 dagen	↓ (in rust) [119] ↔ (direct, 24 u en 72 u na training) [119]
Akt-P (Ser473)	5 dagen	↔ (in rust, direct, 24 u en 72 u na training) [119]

Tabel 8.2: Effecten van creatinesuppletie op genexpressie en fosforyleringsstatus van enkele eiwitten.

Rawson en Volek [373]. Rawson en Volek vonden gemiddeld een 8% grotere stijging in de spierkracht (1-, 3- en 10-RM) ten opzichte van placebo wanneer zij naar het gemiddelde van 22 studies keken. Ook vonden zij een stijging in het maximaal aantal herhalingen die 14% groter was ten opzichte van placebo. De auteurs merken echter op dat er een heel grote interindividuele variabiliteit aanwezig is. De resultaten lopen per persoon dus ontzettend uiteen: sommigen kunnen nagenoeg geen effect bemerken, terwijl anderen een krachtwinst kunnen boeken die nog een stuk hoger ligt dan eerder genoemde percentages. Deze variabiliteit is waarschijnlijk het gevolg van de mate waarmee creatinesuppletie de creatineconcentratie in de spieren weet te verhogen. Bij sommige mensen, met name bij wie de creatineconcentratie van nature al vrij hoog ligt, is deze stijging gering. Zoals eerder besproken in sectie 8.1.2 kan de gelijktijdige inname met koolhydraten en eiwit de accumulatie van creatine in de spieren verbeteren. Dit zou een handige strategie kunnen zijn bij zogeheten *non-responders* (mensen bij wie creatinesuppletie geen effect lijkt te hebben op prestaties). Ook rapporteren Rawson en Volek dat het effect van creatinesuppletie sterker bij ongetrainde personen is in vergelijking met getrainde personen [373]. Een meta-analyse van Branch vond echter geen verschil tussen getrainde en ongetrainde personen, op de lichaamscompositie noch prestaties [63]. Als er een verschil zou zijn, is het moeilijk om

dit goed te kwantificeren, onder meer omdat de studies zeer uiteenlopende criteria voor getrainde en niet-getrainde personen hanteren, of simpelweg te weinig informatie hierover bieden. In elk geval lijken zowel getrainde als ongetrainde personen voordeel te halen uit creatinesuppletie.

De meta-analyse van Dempsey e.a. [122] vermeldt een significante stijging in de 1- en 3-RM bankdrukkracht en in de 1-RM kniebuigkracht (zie tabel 8.3). Voor de 1-RM armflexiekracht werd geen significante verbetering gevonden. De data voor de 1-RM armflexiekracht van de meta-analyse is gebaseerd op in totaal drie studies, waarvan twee werden uitgevoerd bij ouderen. De andere studie die was uitgevoerd bij jongemannen met krachttrainingervaring liet wel een significante verbetering zien, namelijk van 5.1 kg vergeleken met placebo [38]. Een andere studie laat eveneens meer hypertrofie van de armflexor zien na creatinesuppletie in combinatie met krachttraining vergeleken met placebo [79].

Uitkomstmaat	Bevinding	Opmerkingen
1- & 3-RM bankdrukkracht	↑ 6.85 kg (95%-BI = 5.24, 8.47 kg; $n = 143$)	
1-RM armflexiekracht	↔ 1.53 kg (95%-BI = -1.07, 4.13 kg; $n = 60$)	Wanneer proefpersonen ouder dan 60 worden geëxcludeerd is het effect wel significant (↑ 5.1 kg).
1-RM kniebuigkracht	↑ 9.76 kg (95%-BI = 3.37, 16.15 kg; $n = 74$)	
1-, 3- & 10-RM spierkracht	↑ 8% ($n = 443$)	
Aantal herhalingen*	↑ 14% ($n = 152$)	

Tabel 8.3: Effecten van creatinesuppletie op uitkomstmaten van kracht. BI = betrouwbaarheidsinterval. *Gedefinieerd als het maximaal aantal herhalingen bij een gegeven percentage van maximale kracht. Gegevens overgenomen uit Dempsey e.a. [122] en Rawson en Volek [373].

Momenteel is er nog enige onzekerheid of creatinesuppletie voor vrouwen even effectief is als voor mannen. In het onderzoek van Harris e.a. [196] werden weliswaar geen verschillen gevonden in de accumulatie van creatine in het spierweefsel door suppletie, maar het aantal proefpersonen was klein (vijf vrouwen en twaalf mannen). Een laadfase van creatine vertoonde een trend ($P = 0.052$) voor een grotere stijging van de vetvrije massa bij mannen dan vrouwen [312]. Ook wanneer deze stijging werd uitgedrukt ten opzichte van de totale vetvrije massa bleef deze trend in stand. Aangenomen dat de vetvrijemassa-winst op de korte termijn het gevolg is van het osmotische effect van creatine suggereert dit dat de accumulatie kleiner is bij vrouwen dan bij mannen.

In lijn met deze resultaten vond een andere studie geen stijging in de magere lichaams-massa na zes weken krachttraining in combinatie met creatinesuppletie, terwijl deze wel werd gevonden bij mannen [93]. Er werden echter geen spierbiopten afgenomen om de stijging van de creatineconcentratie in de spieren te bepalen, dus het valt niet te zeggen of dit te wijten viel aan een mindere accumulatie van creatine bij vrouwen vergeleken met mannen. Wel werd de armspierdikte bepaald in dit onderzoek. Hoewel er een grotere absolute stijging werd gevonden bij de mannen, was deze relatief gezien niet aanwezig. Voor de dijbeenspierdikte waren er noch absoluut, noch relatief verschillen tussen beide geslachten te bemerken. Opmerkelijk genoeg werd er een grotere relatieve stijging van

kracht gevonden met bankdrukken bij de vrouwen vergeleken met mannen. Voor de leg press was de absolute krachtstijging groter voor de mannen, zonder verschil in de relatieve krachtstijging. Ook lijken er geen verschillen te zijn in het effect van creatinesuppletie op anaerobe prestaties tussen mannen en vrouwen [439].

Ander onderzoek toonde aan dat creatinesuppletie in combinatie met krachttraining bij mannen wel de leucineoxidatie en verschijning van leucine in de circulatie (wat beschouwd kan worden als een maat van eiwitafbraak) verminderde, maar dat dit effect niet voorkwam bij vrouwen [343]. Desalniettemin waren er geen verschillen gevonden in de gemengde spiereiwietsynthese (Eng.: *mixed muscle protein synthesis*).

Samengenomen lijkt creatinesuppletie bij vrouwen misschien een minder positief effect te hebben op de lichaamscompositie dan bij mannen, maar lijkt het verder even effectief voor kracht en anaerobe prestaties als bij mannen.

Hoewel veel studies een laadfase hanteren, is deze echter niet per se benodigd om de spieren te verzadigen met creatine. Ook met een lagere dosering van slechts 3 g per dag wordt eenzelfde niveau van verzadiging bereikt [229]. Het duurt in dat geval echter langer, namelijk zo'n vier weken. Een laadfase zorgt dus voor een snellere verzadiging van de spieren. Bovendien zijn er aanwijzingen dat het effect van creatine na zo'n twee tot drie maanden vermindert [123]. Zo zou het verhoogde creatineniveau in de spieren na die periode weer afnemen. Bijgevolg zou het aan te raden kunnen zijn om de spieren zo snel mogelijk te verzadigen.

Tot slot is er enige zorg dat inname van cafeïne de ergogene effecten van creatine teniet zou doen. Deze zorg vloeit voort uit een publicatie uit 1996, afkomstig van onderzoekers van de Katholieke Universiteit Leuven [461]. In deze studie werd het effect van creatine en de combinatie van creatine en cafeïne vergeleken op een fysieke test bestaande uit knie-extensies om de dynamische spierkoppel (Eng.: *dynamic torque*) te bepalen. Ook werd er gekeken naar de creatinefosfaatconcentratie in de spieren. De creatinefosfaatconcentratie steeg even veel na suppletie met alleen creatine als met creatine én cafeïne. Wat echter opmerkelijk was, was dat de dynamische spierkoppel wel significant steeg na creatinesuppletie, maar niet na de combinatie van creatine en cafeïne.

Maar waar kwam dit door? Enkele jaren later kwamen andere onderzoekers, eveneens van de Katholieke Universiteit Leuven, met een mogelijk antwoord [208]. Creatine en cafeïne zouden een tegengesteld effect hebben op de relaxatietijd van de spier (de tijd benodigd om de calciumconcentratie in het cytosol weer terug te laten keren tot het rustniveau). Creatine verkort de relaxatietijd [457] en de combinatie met cafeïne zou dit effect tenietdoen. De verkorte relaxatietijd werd door de onderzoekers verantwoordelijk gehouden voor het ergogene effect van creatine, en bijgevolg zou cafeïne door het teniet doen van dit effect ook het ergogene effect teniet doen. Wat het onderzoek echter ook liet zien was dat dit tegengestelde effect op de relaxatietijd alleen optrad als cafeïne ten hoogste twintig uur voor de test was ingenomen, maar niet wanneer het een uur voor de test werd ingenomen. Ook in het eerdere onderzoek waarbij het effect op de dynamische spierkoppel van creatine door cafeïne teniet was gedaan, was er al minstens twintig uur geen cafeïne meer ingenomen door de proefpersonen nadat zij eerst drie dagen een hoge dosering cafeïne kregen. Gezien symptomen van cafeïneonthouding optreden binnen 12–24 uur [247], lijkt het zeer aannemelijk dat het gevonden negatieve effect te wijten is aan de ontwenningssverschijnselen die optreden door cafeïneonthouding.

8.4 Veiligheid

De wetenschappelijke consensus is dat suppletie van creatinemonohydraat veilig is in gezonde individuen [72, 238, 185]. Wel zijn er enkele beweringen gedaan in de literatuur die de veiligheid van creatinesuppletie in een kwaad daglicht stellen. Zo zijn er zorgen geweest over de nieren, lever, het maagdstelsel, hart en vaatstelsel, en zelfs cytotoxiciteit. Echter, deze zorgen zijn gestoeld op anekdotisch bewijs en theoretische bewijsvoering. Tot op heden is er geen indicatie dat deze zorgen terecht zijn.

Een casus uit 1998 rapporteerde renale dysfunctie in een persoon die creatine suppleerde [364]. Niet veel later (1999) werd een casus gepubliceerd die een geval van acute interstitiële nefritis (nierontsteking) rapporteerde bij gebruik van creatine [264]. Bovendien leidt creatinesuppletie tot een verhoging van het serumcreatininegehalte. Het serumcreatininegehalte wordt gebruikt om een indicatie van de nierfunctie te verkrijgen (zie kader 8.3); een stijging hiervan kan duiden op een verminderde nierfunctie. Beide casussen plagen het veiligheidsprofiel van creatine tot op de dag van vandaag. Het is echter zeer aannemelijk dat creatine niets te maken had met de nefrotoxiciteit geobserveerd in beide casussen. De patiënt uit de eerste casus, uit 1998, leed al enkele jaren aan glomerosclerose. Dit is een aandoening van de nieren waarbij de glomerulus verhardt door bindweefselvorming. Bovendien nam de patiënt ciclosporine, een medicijn waarvan bekend is dat het nefrotoxisch is [324]. De patiënt uit de tweede casus vertoonde een ziektebeeld dat eveneens sterk overeenkomt met dat van NSAID-gebruik. Tot slot heeft toekomstig gecontroleerd onderzoek nooit enige nefrotoxiciteit kunnen aantonen [360, 386, 302, 268, 182, 327, 184, 79, 288]. Ook heeft creatine geen effect op de bloeddruk [312, 467, 475, 18, 351].

Kader 8.3



Creatine wordt nagenoeg niet actief gemetaboliseerd, waardoor het verval van creatine naar creatinine vrij constant is. Bovendien wordt creatinine volledig gefiltreerd door de nieren en zelf niet verder gemetaboliseerd. Dit maakt creatinine een geschikte kandidaat als schatter van de nierfunctie (glomerulaire filtratiesnelheid). Normaal gezien, als creatinine stijgt in het serum, komt dit doordat de klaring vermindert. Dit betekent dat de nieren minder snel creatinine kunnen uitscheiden wat concreet een verminderde nierfunctie betekent. Creatinesuppletie leidt ook tot een verhoging van de serumcreatinineconcentratie. Dit komt echter niet door een verminderde klaring, maar simpelweg doordat de hoeveelheid creatine in het lichaam groter wordt door creatinesuppletie, en daarmee dus ook de hoeveelheid die continu vervalt tot creatinine. Oftewel: het 'aanbod' wordt groter, terwijl de klaring hetzelfde blijft. Hetzelfde zien we ook bij een grotere spiermassa, gezien dan ook de totale hoeveelheid creatine in het lichaam stijgt bij een gelijke klaring. De licht verhoogde serumcreatinineconcentratie geobserveerd bij creatinesuppletie is daarom geen indicatie van een verminderde nierfunctie.

Er is weinig aanleiding om hepatotoxiciteit te verdenken bij creatinesuppletie. Enkele studies die keken naar bloedmarkers die indicatief kunnen zijn voor leverschade, lieten geen afwijkingen zien [251, 386, 302, 268, 92]. Tot op heden is er geen klinisch materiaal aanwezig die hepatotoxiciteit bij creatinesuppletie aantoonst.

De meeste studies laten geen verandering zien in het lipidenprofiel door creatinesuppletie [465, 406, 186, 115]. In één studie werd echter wel een verandering geobserveerd in het lipidenprofiel [137]. De studie was dubbelblind en gerandomiseerd uitgevoerd. Er werd een significante daling in totaal cholesterol (5–6%), triglyceriden (23%) en VLDL-cholesterol (22%) gemeten in de creatinegroep. Dit verschil ten opzichte van voorgaande

studies kan wellicht verklaard worden doordat de participanten bij aanvang een totale cholesterol concentratie van >200 mg/dl hadden, i.e. een staat van hypercholesterolemie. Daarnaast werd er een trend ($P = 0.051$) naar een lager bloedglucose gevonden in de creatinegroep. De auteurs speculeren dat dit indicatief kan zijn voor een verbeterde insulinegevoeligheid, een gegeven dat eveneens een gunstige invloed zou kunnen hebben op het lipidenprofiel. Het is dus mogelijk dat creatinesuppletie kan leiden tot een gunstig effect op het lipidenprofiel in bepaalde groepen mensen, echter, meer onderzoek is gewenst.

Wel kunnen hoge doseringen (> 5 g per dag) leiden tot maag- en darmklachten [341]. Waarschijnlijk is dit het gevolg van het osmotische effect van creatine. Bovendien wordt creatine soms genomen in combinatie met andere stoffen die mogelijk zouden kunnen leiden tot de klachten, waardoor creatine onterecht als schuldige wordt aangewezen. Met lage doseringen (≤ 5 g per dag) zouden de meesten geen problemen mogen ervaren.

Tot slot wordt creatine voor een zeer klein gedeelte gemetaboliseerd tot sarcosine, een reactie gekatalyseerd door creatinase. Verdere metabolisering van sarcosine kan vervolgens zorgen voor productie van methylamine en formaldehyde; twee stoffen die bekend staan als cytotoxisch (schadelijk voor de cel). Een kleinschalige klinische studie laat een verhoogde urine-uitscheiding zien van methylamine en formaldehyde na veertien dagen creatinesuppletie (21 g per dag) [361]. De uitgescheiden hoeveelheid methylamine viel, ondanks de sterke stijging, nog steeds onder de bovengrens die gesteld wordt voor gezonde mensen. Van formaldehyde is een dergelijke grens niet bekend. Alleszins is er nog geen data tot op heden die schadelijkheid aanduidt van deze stijging van methylamine en formaldehyde.

Evenzo is er enige zorg dat creatine mogelijk geassocieerd is met kanker, hetgeen gefaciliteerd zou worden door carcinogene heterocyclische amines (HCAs). Een kleinschalige studie die de productie van enkele HCAs onder de loep nam kon echter geen stijging hiervan vinden door creatinesuppletie [349]. Het dient opgemerkt te worden dat klinisch onderzoek in deze richting bijzonder schaars is, ondanks dat creatinesuppletie over het algemeen bijzonder goed onderzocht is.

8.5 Conclusie

Creatine speelt een fundamentele rol in het energieverbruik van de spieren. Het komt voor in de dagelijkse voeding en ook is het lichaam in staat om zelf creatine te synthetiseren. Creatinesuppletie is in staat om de creatineconcentratie in de spieren te verhogen boven het basale niveau. Het wordt vrijwel volledig uit het maag-darmstelsel opgenomen door transporters in de darmwand. Vervolgens weten de spieren het goed op te nemen en mogelijk verstrekt insuline dit effect. Het combineren van creatine met een insulinogene maaltijd zou daardoor de accumulatie van creatine in het spierweefsel kunnen verbeteren. Creatine wordt nagenoeg niet actief gemetaboliseerd door het lichaam en vervalt spontaan tot creatinine. Creatinine wordt in de urine uitgescheiden door de nieren.

De verhoogde creatineconcentratie in de spiercellen ten gevolge van suppletie heeft een positief effect op de cellulaire energetica. Dit ligt ten grondslag aan de ergogene effecten van creatine, zoals een verbetering van de spierkracht en spieruithoudingsvermogen bij intensieve inspanningen. In tegenstelling tot veel andere voedingssupplementen is de effectiviteit van creatine onomstotelijk bewezen.

Doorgaans wordt een laadfase gehanteerd van enkele dagen met een hoge creatine-inname van 20 g per dag. De dosis wordt hierbij verdeeld over vier kleinere dosissen

van 5 g. Na deze laadfase kan een onderhoudsfase gehanteerd worden van 3–5 g per dag. Het nemen van een hogere dosis in één keer is af te raden wegens het risico op maag- en darmklachten en waarschijnlijk incomplete absorptie bij hoge dosissen.

De langetermijneffectiviteit van chronische creatinesuppletie is niet bewezen. Er zijn zelfs enkele aanwijzingen dat het effect van creatine na zo'n twee tot drie maanden afneemt. Het zou om die reden aan te raden kunnen zijn om iedere twee tot drie maanden een rustfase in te lassen van vier tot zes weken.

Tot slot kent creatine een uitstekend veiligheidsprofiel en heerst er consensus dat creatinesuppletie volstrekt veilig is in gezonde individuen.



9. Eiwitpreparaten

9.1 Inleiding

Eiwitten, ook wel proteïnen genoemd, vormen een belangrijk onderdeel van de dagelijkse voeding. De eiwitten uit de dagelijkse voeding dragen er zorg voor dat de vele lichaamsfuncties gewaarborgd blijven. De bouwstenen van eiwitten zijn aminozuren. In totaal worden er twintig aminozuren gebruikt voor de eiwitsynthese in het menselijk lichaam. Elf van deze aminozuren kan het lichaam zelf *de novo* synthetiseren. De overige negen zijn echter onmisbaar in de voeding, doordat deze niet *de novo* gemaakt kunnen worden. Deze negen aminozuren worden dan ook de essentiële aminozuren genoemd. Het menselijk lichaam heeft deze aminozuren nodig voor vele processen. Zo vervullen sommige aminozuren een rol als neurotransmitter (bijvoorbeeld glutamaat) of vormen de precursor voor de synthese van een neurotransmitter (bijvoorbeeld adrenaline) of een hormoon (bijvoorbeeld thyroxine [T_3]). Daarnaast zijn zij, uiteraard, nodig voor de synthese van nieuwe eiwitten. Bovendien kunnen aminozuren energie leveren.

Met name vlees, vis, eieren en zuivelproducten dragen voor een groot deel bij aan de dagelijkse eiwitinname. Bij vegetariërs en veganisten vormen andere voedingsmiddelen vaak een belangrijke bron van eiwit, zoals noten, paddenstoelen, peulvruchten en graanproducten. De Gezondheidsraad adviseert 0.8 g/kg lgw/d eiwit aan volwassenen [161]. Voor de meeste mensen komt dit neer op een dagelijkse eiwitinname van circa 50 tot 70 g. Deze hoeveelheid is eenvoudig uit de voeding te halen. Voor sporters die de spiermassa wensen te vergroten ligt de benodigde hoeveelheid echter hoger. Er is geschat dat de behoefte van deze groep in sommige situaties kan oplopen tot wel 3.1 g/kg vetvrije massa per dag [205]. Hierdoor kan het uitdagend worden om voldoende eiwit uit de normale voeding binnen te krijgen zonder eiwitpreparaten te benutten. Veel sporters gebruiken dan ook

eiwitpreparaten als aanvulling op hun voeding.

Er bestaan verschillende soorten eiwitpreparaten, waarbij de meeste bestaan uit wei-eiwit of caseïne-eiwit. Beide zijn eiwitfracties afkomstig van melk. Ongeveer een vijfde deel van het melkeiwit bestaat uit wei en vier vijfde deel uit caseïne [414]. Daarnaast zijn er preparaten verkrijgbaar met erwteiwit, ei-eiwit, soja-eiwit, rijsteiwit, rundereiwit, hennepewit, etc. Wei-eiwit en caseïne-eiwit zijn echter het populairst. Tevens is hiervan het meeste onderzoek beschikbaar. Dit hoofdstuk zal zich daarom vooral richten op deze twee vormen van eiwitpreparaten.

Gezien aminozuren de bouwstenen vormen van de eiwitten die wij synthetiseren, en dus ook de spiereiwitten myosine en actine, is het niet verwonderlijk dat eiwitname belangrijk is voor een optimale spiergroei. Enerzijds moeten er voldoende aminoacyl-tRNA's beschikbaar zijn voor de spiereiwsynthese, en anderzijds speelt de aminozuurbeschikbaarheid een sleutelrol in de regulatie van de spiereiwsynthese. Met name dit laatste punt is de reden waarom er zulke grote hoeveelheden eiwit nodig zijn om de spiergroei te optimaliseren. De hoeveelheid opslag van spiereiwit tijdens een periode van spiergroei vormt immers slechts een fractie van de totale hoeveelheid eiwit die het lichaam aangeboden krijgt. Centraal hierin staat onder meer mTOR-signalering, zoals besproken in sectie 4.2. Hoewel men jaren geleden dacht dat deze regulatie primair geregeld werd door het aminozuur leucine, zijn hier ook verscheidene andere aminozuren nauw bij betrokken. Hetzij indirect door de cellulaire leucine-opname te stimuleren, hetzij direct door mTORC1-activiteit te beïnvloeden [167]. Dit benadrukt het belang van de inname van eiwitten met een volledig aminozuurprofiel.

9.1.1 Absorptie

Zodra eiwit na inname in de maag belandt, wordt het blootgesteld aan het zure milieu van de maag. Het maagzuur zorgt ervoor dat de eiwitten hun ruimtelijke structuur snel zullen verliezen. Dit proces wordt denaturatie genoemd. Dit heeft als gevolg dat de eiwitten toegankelijker worden voor enzymen die de peptidebindingen tussen de aminozuren kunnen verbreken. In de maag is deze rol weggelegd voor het enzym pepsine. Pepsine is een endopeptidase, wat inhoudt dat het de peptidebindingen van de niet-terminale aminozuren verbreekt. Ofwel het klieft de eiwitstrengen in twee kleinere peptiden. Het zo ontstane mengsel van polypeptiden en oligopeptiden (korte peptideketens) wordt vervolgens verder bewerkt in de dunne darm door andere peptidasen die afkomstig zijn van de alvleesklier, en membraangebonden peptidasen van de enterocyten. Deze hydrolyseren de peptideketens verder tot vrije aminozuren, di- en tripeptiden, die vervolgens worden opgenomen door de darmmucosa.

De opname van vrije aminozuren door de enterocyten wordt verzorgd door zowel actief transport als gefaciliteerde diffusie. De transporters herkennen hierbij groepen aminozuren in plaats van individuele aminozuren. Hierdoor kan het voorkomen dat overmatige inname van één enkel aminozuur het transport belemmert van andere aminozuren die gebruikmaken van dezelfde transporter(s). Er wordt hiervoor onderscheid gemaakt tussen vijf transportsystemen:

1. het neutrale transportsysteem (met een voorkeur voor ongeladen aminozuren);
2. het kationensysteem (met een voorkeur voor positief geladen aminozuren en cysteïne);
3. het anionensysteem (met een voorkeur voor negatief geladen aminozuren);
4. het iminoglycinesysteem (met een voorkeur voor proline, hydroxyproline en gly-

cine); en

5. het β -aminozuursysteem (met een voorkeur voor taurine en β -aminozuren) [66].

De meeste van deze transporters zijn Na^+ - of Cl^- -afhankelijk.

De absorptie van di- en tripeptiden langs de apicale membraan van enterocyten wordt verzorgd door peptide transporter 1 (PEPT1) [111]. Dit transport is afhankelijk van de protongradiënt die in stand wordt gehouden door een natriumprotonantiporter. Deze natriumprotonantiporter is weer afhankelijk van natriumkaliumpompen die natrium afvoeren langs de basolaterale membraan. Eenmaal aangekomen in de enterocyt worden de di- en tripeptiden verder verwerkt tot vrije aminozuren door peptidasen. Hierna verlaten deze aminozuren, tezamen met de overige geabsorbeerde vrije aminozuren, de basolaterale membraan. Zo komen zij terecht in de poortader, waarna zij na passage langs de lever verder worden getransporteerd in de circulatie.

Een groot gedeelte van aminozuren afkomstig uit de voeding wordt echter al door de darmen en lever gebruikt voor energie en eiwitsynthese [440, 456]. De darmeiwitsynthese stijgt dan ook sterk na een eiwitrijke maaltijd. Tijdens het vasten zorgen de darmen er echter voor dat de rest van het lichaam nog steeds wordt voorzien van aminozuren. Er vindt op dat moment netto eiwitafbraak plaats in de darmcellen. Ook kan de lever een tekort van een bepaald niet-essentieel aminozuur aanvullen vanuit het overschot van een ander aminozuur. Zo kan er transaminering (overdraging van de NH_2 -groep) van glutaminezuur aan pyrodruivenzuur plaatsvinden om een alaninetekort op te vangen. De darmen en de lever spelen dus een centrale rol in de regulatie van het aminozuuraanbod aan de rest van het lichaam. De onderlinge ratio van aminozuren die in de circulatie verschijnt, en de snelheid waarmee dit gebeurt, is hierdoor geen exacte weerspiegeling van de absorptie door de darmcellen.

De snelheid van absorptie door de darmcellen is afhankelijk van de fysisch-chemische eigenschappen van het ingenomen eiwit en de hoeveelheid. Wanneer eiwit deel uitmaakt van een maaltijd is de snelheid van absorptie ook afhankelijk van de verdere samenstelling van de maaltijd. Hoewel het meeste eiwit afkomstig uit de voeding onderdeel is van volwaardige maaltijden, worden eiwitpreparaten vaak in isolement genomen door sporters. Het is daarom zinnig om te kijken naar de kinetische eigenschappen van wei-eiwit en caseïne-eiwit an sich.

Wei-eiwit en caseïne-eiwit worden vaak respectievelijk 'snel' en 'langzaam' eiwit genoemd [57]. Wei-eiwit wordt snel geabsorbeerd na inname door de darmmucosa. De opname van caseïne-eiwit vindt echter veel trager plaats, waarschijnlijk doordat het eiwit klonters vormt in het zure milieu van de maag en de maaglediging van caseïne hierdoor vertraagt verloopt.

Na inname van wei-eiwit vindt een piek in de plasmaleucineconcentratie [57] of totale aminozuurconcentratie [77] plaats na circa één tot anderhalf uur. Ook bij ouderen is dit het geval [346, 347]. Het eiwit wordt snel verteerd en geabsorbeerd waardoor na ongeveer vier uur bijna volledig is opgenomen. Bij inname van caseïne-eiwit vindt een piek in de plasmaleucineconcentratie ongeveer even snel plaats als bij inname van wei-eiwit [57]. De piek is echter veel lager, omdat de absorptie traag verloopt. Dit heeft als gevolg dat caseïne-eiwit voor een langdurigere afgifte van aminozuren aan de circulatie zorgt dan wei-eiwit. De piek in de plasmaleucineconcentratie bij caseïne-eiwit is echter ook lager omdat het leucinegehalte van caseïne-eiwit lager is dan dat van wei-eiwit. In een onderzoek waarbij wei-eiwit of caseïne-eiwit samen met dubbele room (een vet soort room) en maltodextrine werd genomen, vond ook een piek in de totale aminozurenconcentratie plaats na ongeveer

een uur [190]. De gevonden piekstijging in de totale aminozuurconcentratie is goed vergelijkbaar met de resultaten van Calbet & Holst, zoals weergegeven in tabel 9.1 (merk op dat de gerapporteerde piekwaarde door Hall e.a. minus de basisconcentratie van circa ~ 2 mmol/l is). Dit suggereert dat toevoeging van een geringe hoeveelheid makkelijk verteerbare koolhydraten en vet geen of weinig effect heeft op de absorptie van wei-eiwit en caseïne-eiwit.

Vanuit de circulatie dringen de aminozuren door in het interstitium en kunnen zij worden opgenomen door de cellen. Het transport vanuit de circulatie naar het interstitium lijkt de snelheidslimiterende stap te zijn en niet zo zeer de absorptie van aminozuren langs het sarcolemma vanuit het interstitium [313, 174]. Deze passage langs de vaatwand naar het interstitium vindt grotendeels plaats door middel van diffusie. Mogelijk speelt dit ook een rol bij de zogeheten 'anabole resistentie' die wordt geobserveerd bij ouderen (zie kader 9.1).

Kader 9.1



Bij ouderen is het basale eiwitmetabolisme intact, maar is het effect van eiwitname en sporten op de spiereiwietsynthese geremd. Dit wordt ook wel anabole resistentie genoemd [382]. Er is gehypothetiseerd dat het verminderde effect van de spiereiwietsynthese op eiwitname, tenminste ten dele, te wijten zou zijn aan verminderd aminozuurtransport langs de vaatwand. De endotheelfunctie verslechtert namelijk bij ouderdom. Dit proces ligt eveneens ten grondslag aan een verhoogde kans op cardiovasculaire aandoeningen met de leeftijd [411]. Het induceren van hyperemie (verhoogde bloedtoevoer) door toediening van een vaatverwijder is effectief gebleken in het 'opheffen' van deze verminderde effectiviteit van aminozuren op de spiereiwietsynthese in ouderen [128]. Regelmatige lichaamsbeweging en een gezond voedingspatroon kunnen bijdragen aan behoud van een goede endotheelfunctie bij ouderdom.

Zoals eerder geschreven wordt een deel van de aminozuren al door het darmstelsel benut. De vertakte keten aminozuren (BCAAs, Eng.: *branched-chain amino acids* [leucine, isoleucine en valine]) worden echter grotendeels ongemoeid gelaten. Na het eten van een eiwitrijke maaltijd maken de BCAAs meer dan de helft van de aminozuren uit in het bloed dat de ingewanden verlaat [470]. Dit terwijl de BCAAs slechts een vijfde deel uitmaakten van het ingenomen eiwit. De BCAAs worden bij voorkeur opgenomen door het skeletspierweefsel [298]. Verantwoordelijk hiervoor is het neutrale transportsysteem, dat een voorkeur heeft voor ongeladen aminozuren. Immers leucine, isoleucine en valine zijn alle ongeladen. In het bijzonder lijken hierbij systeem L (L-type aminozuurtransporter 1 [LAT1]) en systeem A (natriumgekoppelde neutrale aminozuurtransporter 2 [SNAT2]) betrokken [132].

9.1.2 Metabolisme en excretie

De eiwitten afkomstig uit voeding worden afgebroken tot vrije aminozuren waarna zij door het lichaam gebruikt kunnen worden om nieuwe eiwitten te synthetiseren. Daarnaast kunnen zij dienen als brandstof of als precursor voor een neurotransmitter of hormoon. Bovendien kunnen sommige aminozuren gebruikt worden om andere niet-essentiële aminozuren te vormen. Het metabolisme van aminozuren is om deze redenen vrij complex en omvangrijk.

Wanneer we kijken naar de afbraak van aminozuren staan twee elementen centraal: het koolstofskelet en één of meerdere stikstofgroepen waarover een aminozuur beschikt.

Referentie	Preparaat	Steekproefgrootte	T _{max}	C _{max}
Boirie e.a. (1997) ^a [57]	30 g wei-eiwit	n = 6	80 min	370 µmol/l
Boirie e.a. (1997) ^a [57]	43 g caseïne-eiwit	n = 6	40 min	280 µmol/l
Hall e.a. (2003) ^{b, d} [190]	48 g wei-eiwit, 19 g dubbele room (9 g vet), 20 g maltodextrine	n = 9	75 min	2.0 mmol/l
Hall e.a. (2003) ^{b, d} [190]	48 g caseïne-eiwit, 23 g dubbele room (11 g vet), 24 g maltodextrine	n = 9	45 min	1.44 mmol/l
Calbet & Holst (2004) ^b [77]	60 g wei-eiwit	n = 6	60 min	4.75 mmol/l
Calbet & Holst (2004) ^b [77]	60 g caseïne-eiwit	n = 6	60 min	4.15 mmol/l
Calbet & Holst (2004) ^b [77]	60 g gehydrolyseerd wei-eiwit	n = 6	30 min	4.6 mmol/l
Calbet & Holst (2004) ^b [77]	60 g gehydrolyseerd caseïne-eiwit	n = 6	20 min	4.75 mmol/l
Pennings e.a. (2011) ^c [346]	20 g wei-eiwit	n = 16	60 min	2.05 mmol/l
Pennings e.a. (2011) ^c [346]	20 g caseïne-eiwit	n = 16	30 min	1.35 mmol/l
Pennings e.a. (2011) ^c [346]	20 g gehydrolyseerd caseïne-eiwit	n = 16	45 min	1.8 mmol/l
Pennings e.a. (2012) ^c [347]	10 g wei-eiwit	n = 11	45 min	1.75 mmol/l
Pennings e.a. (2012) ^c [347]	20 g wei-eiwit	n = 11	45 min	2.1 mmol/l
Pennings e.a. (2012) ^c [347]	35 g wei-eiwit	n = 11	60 min	2.45 mmol/l

Tabel 9.1: Farmacokinetische gegevens van verschillende wei- en caseïne-eiwitpreparaten. T_{max} - en C_{max}-waarde uitgaande van: ^a leucineconcentratie, ^b totale aminozuurconcentratie, ^c totale essentiële aminozuurconcentratie. ^d C_{max}-waarde gerapporteerd minus de basisconcentratie. De basisconcentratie is in vastende toestand doorgaans ~2 mmol/l.

Het koolstofskelet kan benut worden om te voorzien in de energiebehoefte van een cel. Het koolstofskelet wordt hiervoor omgezet in een glucose- of ketolichaamprecursor. De aminozuren die afgebroken worden tot glucoseprecursoren (pyruvaat, α -ketoglutaaraat, succinyl-CoA, fumaraat en oxaloacetaat) worden glucogene aminozuren genoemd en de aminozuren die afgebroken worden tot ketolichaamprecursoren (acetyl-CoA en acetoacetaat) worden ketogene aminozuren genoemd. Sommige aminozuren kunnen zowel glucose- als ketolichaamprecursoren vormen. Uiteindelijk worden deze precursoren gebruikt in de mitochondria om zo energie te leveren.

Kader 9.2



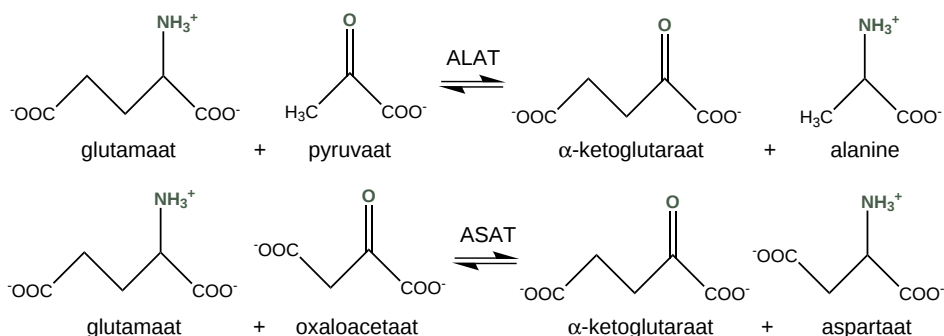
Om inzicht te krijgen in de leverfunctie worden vaak een ALAT- en ASAT-bepaling aangevraagd. Beide enzymen zijn zogeheten transaminasen en zijn verantwoordelijk voor de overdracht van een α -aminogroep aan een α -ketozuur. Hierdoor ontstaan een nieuw aminozuur en een nieuw α -ketozuur. Beide transaminasen komen vrij in het bloed door leverschade en worden daarom gebruikt als biomarker voor leverschade. Dezelfde transaminasen zijn echter ook aanwezig in het skeletspierweefsel en kunnen vrijkomen door inspanning. Een kleinschalige studie liet een grote stijging zien in de serumtransaminasenconcentratie na een gewichtheffsessie in gezonde mannen [353]. Zelfs na zeven dagen was er nog steeds een significante stijging. Bij sporters, zeker wanneer zij trainen met gewichten, moet daarom hiermee rekening gehouden worden tijdens het interpreteren van deze bloedwaarden.

Het lichaam ontdoet zich van de stikstofgroepen afkomstig van aminozuren door deze om te vormen tot ammoniak, waarna deze de ureumcyclus in worden geleid. Dit gebeurt in de lever. Een aminozuur wordt eerst ontdaan van zijn α -aminogroep, waarna deze groep, in de meeste gevallen, wordt omgezet in ammoniak. Centraal hierin staat het aminozuur glutamaat. De aminogroepen van aminozuren worden overgedragen aan een α -ketozuur (α -ketoglutaaraat) waardoor glutamaat ontstaat. Vervolgens kan de aminogroep van glutamaat verwijderd worden, resulterend in ammoniak. Ammoniak is giftig voor de cellen en daarom zijn hoge concentraties hiervan niet gewenst. Het ammoniak wordt daarom in een vijf-staps proces (de ureumcyclus) omgezet tot het onschadelijke ureum, dat makkelijk uitgescheiden kan worden door het lichaam.

Belangrijk voor de overdracht van een aminogroep aan α -ketoglutaaraat voor de vorming van glutamaat zijn de transaminasen alanine-aminotransaminase (ALAT) en aspartaat-aminotransaminase (ASAT). Zie ook figuur 9.1. De serumconcentraties van deze transaminasen worden gebruikt in diagnostiek van leveraandoeningen (zie kader 9.2).

9.2 Werkingsmechanisme

Het is bekend dat krachttraining in combinatie met een adequate eiwitname spierhypertrofie bevordert. Beide vormen de basis voor elke atleet die de spiermassa wenst te vergroten. In 1995 trachtten onderzoekers de vraag te beantwoorden of krachttraining alleen ook in staat was netto eiwit op te slaan in het spierweefsel in de uren na een trainingssessie [44]. Ondanks de aanzienlijke toename van eiwitomzet (Eng.: *protein turnover*) in het spierweefsel vond er geen netto eiwitopslag plaats in de drie uur na een trainingssessie tijdens de gevaste toestand. Dit is niet verwonderlijk; als er wél netto eiwitopslag zou plaatsvinden in het spierweefsel zou dit ten koste zijn gegaan van een ander weefsel. Een cel is immers afhankelijk van een bron van aminozuren om deze in nieuwe eiwitten in te bouwen.



Figuur 9.1: De twee transaminasen ALAT en ASAT zorgen voor de overdracht van een aminogroep aan α -ketoglutaraat voor de vorming van glutamaat. ALAT draagt hierbij de aminogroep van alanine over en ASAT de aminogroep van aspartaat. Ook kan de reactie de andere richting in werken, waarbij alanine en aspartaat gevormd kunnen worden uit glutamaat door respectievelijk ALAT en ASAT.

Dezelfde onderzoekers bekeken later ook wat het effect was van intraveneuze toediening van aminozuren in rust en na krachttraining [45]. De toediening van aminozuren zorgde wel voor netto eiwitopslag in het spierweefsel na de trainingssessie, en dit effect was sterker ten opzichte van de toediening van aminozuren in rust. Veel vervolgonderzoek uitgevoerd met eiwitpreparaten toont eveneens een grotere acute stijging in de eiwitsynthese na een krachttrainingssessie vergeleken met placebo [378].

Maar welk mechanisme ligt hieraan ten grondslag? Eiwit bestaat uit aminozuren en de aminozuren waaruit zij bestaan vormen de bouwstenen voor nieuwe eiwitten die het lichaam kan synthetiseren. Zodoende bieden zij substraat voor de eiwitsynthese en resulterend de groei van een spier. Van groot belang is ook dat zij de anabole signalering stimuleren. Dit verloopt met name via het mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). In reactie op een verhoogde aminozuurconcentratie wordt mTORC1 geactiveerd (zie ook sectie 4.2 voor een uitgebreide bespreking over mTORC1-regulatie). mTORC1 fosforyleert zijn twee primaire substraten eukaryotische initiatiefactor 4E-bindingseiwit (4E-BP1) en ribosomaal S6-kinase 1 (S6K1). Beide zijn nauw betrokken bij de eiwittranslatie. Fosforylering van deze moleculen leidt tot een verhoogde eiwitsynthese. De activatie van mTORC1 door aminozuren is uitgebreid aan bod gekomen in sectie 4.2.3.

9.2.1 Stimulering mTORC1-signalering

Zoals beschreven in sectie 4.2.3 zijn aminozuren belangrijke regulatoren van het mTORC1-reactiepad. Meerdere studies hebben gekeken naar het effect van krachttraining in combinatie met wei-eiwit- [148, 228, 147, 252, 249] en caseïne-eiwitinnamen [379] op mTORC1-signalering.

Een onderzoek onder jonge ongetrainde mannen (18-25 jaar oud) bekeek het effect van wei-eiwitisolaat (26 g) ingenomen direct na 3 sets van 12 herhalingen knie-extensies [148]. 2, 4 en 24 uur na de knie-extensies werden spierbiopten afgenomen om de fosforyleringsstatus te bepalen van verscheidene moleculen betrokken bij het mTORC1-reactiepad. Akt-fosforylering (Ser473) bleef ongewijzigd. Wel werd er een significante stijging van

mTOR- (Ser2448), 4E-BP1- (Thr37/46) en S6K1-fosforylering (Thr389) gevonden twee uur na de training vergeleken met de placebogroep.

Later kwamen dezelfde auteurs met een vervolgonderzoek dat niet alleen bestond uit een groep jonge ongetrainde mannen, maar ook een groep ongetrainde oudere mannen (60-75 jaar oud) [147]. Ditmaal werd er een spierbiopsie afgenomen twee uur na het uitvoeren van drie sets van acht herhalingen knie-extensies. Vervolgens voltooide de proefpersonen een twaalf weken durend volwaardig krachttrainingsprogramma. Telkens werd er na elke sessie een wei-eiwit isolaat drank genomen (of placebo). Na deze twaalf weken werden wederom de knie-extensies uitgevoerd en een spierbiopsie afgenomen. Deze gegevens kunnen de vraag helpen beantwoorden wat de impact van chronische krachttraining is op gevoeligheid van het mTORC1-reactiepad. Veel studies die hebben gekeken naar de acute stijging van de spiereiwitssynthese in reactie op training laten namelijk een verkorte en verminderde respons zien bij getrainde personen [378]. Voor aanvang van het twaalf weken durende programma werden grotendeels dezelfde resultaten gevonden als in de eerder uitgevoerde studie. Akt-fosforylering (Ser473) bleef bij zowel de jongeren als de ouderen onveranderd en mTOR-fosforylering (Ser2448) steeg in beide wei-eiwitgroepen ten opzichte van placebo. De stijging in 4E-BP1- en S6K1-fosforylering was alleen significant bij de ouderen. Na twaalf weken trainen bleef Akt-fosforylering nog steeds onveranderd. De stijging in mTOR-fosforylering die eerst significant was bij zowel ouderen als jongeren, was nu echter alleen significant bij jongeren. De stijging bij jongeren was tevens vrijwel gelijk aan de stijging die twaalf weken eerder werd gevonden. Ook de sterke stijging in S6K1-fosforylering die eerst was geobserveerd bij ouderen, was nu sterk verminderd en niet meer significant. Dit suggereert dat bij ouderen de anabole respons op training en eiwitname verminderd is in de getrainde toestand, terwijl dit bij jongeren niet het geval lijkt.

Een studie afkomstig van een andere onderzoeksgroep keek eveneens naar het effect op mTORC1-signalering van eiwitname (15 g wei-eiwit isolaat) na de training bij jonge mannen in zowel ongetrainde als getrainde toestand na 21 weken trainen [228]. S6K1-fosforylering (Thr389) was 1 uur na de training sterk verhoogd in de eiwitgroep in ongetrainde staat, maar niet meer na 48 uur. Ook werd er na 21 weken training geen stijging meer gevonden. Opmerkelijk genoeg werd er bij het andere substraat van mTOR (4E-BP1) een bijna significante ($P = 0.06$) daling gevonden van de fosforyleringsstatus in de placebogroep 1 uur na de training, die niet plaatsvond in de eiwitgroep. Dit suggereert dat wei-eiwit deze door training geïnduceerde daling weet te remmen. Wanneer er gekeken wordt naar mTOR-fosforylering (Ser2448) an sich, wordt er een significante stijging gezien 1 uur en 48 uur na de training. Bovendien vindt deze stijging ook plaats in de getrainde toestand, i.e. na 21 weken training. In de placebogroep werden geen significante stijgingen gevonden.

Ander onderzoek in ongetrainde toestand liet vergelijkbare resultaten zien, maar er werd ook een stijging in Akt-fosforylering (Ser473) gevonden 1 uur na training en inname van 10 of 20 g wei-eiwithydrolysaat [249]. Een stijging in Akt-fosforylering (Ser473 en Thr308) werd ook gevonden door Reitelseder e.a. bij toediening van ~20 g wei-eiwitisolaat of caseïne-eiwit na training [379]. Het is onzeker waarom in deze onderzoeken wel een stijging van Akt-fosforylering werd geobserveerd. Een mogelijke verklaring is het kleine aantal deelnemers van de experimenten. Doordat deze experimenten alle met vrij weinig deelnemers zijn uitgevoerd kan het zijn dat dit effect gemist is in de andere studies. Bovendien toonden Reitelseder e.a. aan dat het effect op Akt- en S6K1-fosforylering

tussen wei-eiwitisolaat en caseïne-eiwit vergelijkbaar is, al vertoonde de ratio 4E-BP1-fosforylering (Thr37/46) uitgezet tegen de totale hoeveelheid 4E-BP1 een sterkere stijging in de caseïne-eiwitgroep vergeleken met de wei-eiwitgroep. Dit leek met name te komen door de stijging van totaal 4E-BP1 in de wei-eiwitgroep.

9.3 Klinische resultaten

Het effect van eiwitsuppletie, of een hoogeiwitdieet, op de spiermassa en spierkracht is klein, maar aanwezig. Vanwege het geringe effect vinden veel studies door de kleine steekproefgrootte geen voordeel van eiwitsuppletie ten opzichte van placebo. Om toch de vraag te beantwoorden in hoeverre eiwitsuppletie of een hoogeiwitdieet (> 1.2 g/kg lgw/d) effect heeft, is er een meta-analyse uitgevoerd. Deze meta-analyse vond op basis van 22 studies met 680 proefpersonen een significante stijging in de vetvrije massa (VVM), dwarsdoorsnede van de spiervezels en 1-herhalingsmaximum (1-RM) leg press [88]. De resultaten van deze meta-analyse staan opgesomd in tabel 9.2. De VVM nam gemiddeld met 0.69 kg toe in de 22 studies. Deze toename was vergelijkbaar voor zowel jongvolwassenen als ouderen. Ook was deze toename vergelijkbaar voor getrainde en ongetrainde jongvolwassenen. De VVM-toename in de jongvolwassenen, die gemiddeld circa 1 kg bedroeg na 12 weken, werd gevonden ondanks dat de groepen al een eiwitinname hadden die hoger was dan 1.2 g/kg lgw/d. Hier bovenop werd gemiddeld 50 g eiwit gesuppleerd in de eiwitgroep. Interessant was dat eiwitsuppletie met name bij de getrainde jongvolwassenen voor een relatief groot verschil zorgde in VVM-winst. De VVM-winst was in deze groep meer dan viermaal zo groot vergeleken met de placebogroep. Dit benadrukt het belang van een adequate eiwitinname bij getrainde personen om optimale spierhypertrofie te bewerkstelligen.

Uitkomstmaat	Bevinding	Opmerkingen
VVM	↑ 0.69 kg (95%-BI = 0.47, 0.91 kg)	
VM	↔ -0.11 kg (95%-BI = -0.50, 0.29 kg)	
CSA type 1-spiervezel	↑ 212 μm^2 (95%-BI = 109, 315 μm^2)	Alleen bij jongvolwassenen.
CSA type 2-spiervezel	↑ 291 μm^2 (95%-BI = 71.7, 510 μm^2)	Alleen bij jongvolwassenen.
1-RM leg press	↑ 13.5 kg (95%-BI = 6.4, 20.7 kg)	

Tabel 9.2: Effect van eiwitsuppletie in combinatie met ≥ 6 weken krachttraining ten opzichte van placebo. Gegevens overgenomen uit Cermak e.a. [88]. Afkortingen: BI, betrouwbaarheidsinterval; VVM, vetvrije massa; VM, vetmassa; CSA, dwarsdoorsnedeoppervlak; 1-RM, 1-herhalingsmaximum.

Een vraag die moeilijk is te beantwoorden, is welke hoeveelheid eiwit optimaal is voor spiergroei. Enkele belangrijke factoren die hierop invloed hebben, zijn de energie-inname, leeftijd, eiwitbron, VVM en vetmassa [74, 205, 322, 354]. Hierbij kan gesteld worden dat een lagere energie-inname, een hogere leeftijd, een minderwaardigere eiwitbron, een

hogere VVM en een lagere vetmassa, de eiwitbehoefte vergroten voor een optimaal effect op de spiermassa. Onder meer door deze factoren is het moeilijk om conclusies te trekken uit de verschillende onderzoeken. Daarnaast kun je stellen dat voor eiwitinname de wet van afnemende meeropbrengst (Eng.: *law of diminishing returns*) geldt. Des te hoger de eiwitinname, des te kleiner zal het extra verschil in resultaat worden. Dit maakt het moeilijker om een statistisch significant effect te verkrijgen bij hogere eiwitinnames. Toch zijn er in de literatuur aanbevelingen gedaan die optimaal zouden zijn, al zijn deze tot op zekere hoogte nog speculatief door de beperkingen van het beschikbare onderzoek hierover.

Stuart Phillips en Luc van Loon stellen een optimale eiwitinname van 1.3–1.8 g/kg lgw/d voor [355]. Ook stellen zij dat tijdens een energiebeperkend dieet de eiwitinname zou kunnen oplopen tot 1.8–2.0 g/kg lgw/d. Er wordt hierbij uitgegaan van hoge kwaliteit eiwitten, bijvoorbeeld dierlijke eiwitten afkomstig van vlees, vis en zuivelproducten. Een onderzoek onder Nederlandse atleten vond dat de gemiddelde eiwitinname gemiddeld op 1.5 g/kg lgw/d lag bij krachtatleten [163].

Eric Helms e.a. onderzochten de literatuur voor een optimale eiwitinname tijdens een caloriebeperkend dieet in afgetrainde atleten [205]. Hierbij kwamen zij uit op een aanbeveling van 2.3–3.1 g/kg VVM/d, waarbij een lager lichaamsvetpercentage en een groter calorietekort leiden tot de hoogste eiwitbehoefte. Gezien het aannemelijk is dat de eiwitbehoefte toeneemt met de VVM, maar niet de vetmassa, is gekozen om de eiwitbehoefte uit te drukken in VVM in plaats van het lichaamsgewicht. Omgerekend naar het totale lichaamsgewicht komt dit neer op 2.0–2.7 g/kg lgw/d voor een atleet met een vetpercentage van 12%.

Ook speelt de eiwitkwaliteit een belangrijke rol in het optimaliseren van spiergroei. Hierbij zijn vooral de absorptiesnelheid en de aanwezige hoeveelheid essentiële aminozuren, in het bijzonder leucine, van belang [438, 354]. Leucine speelt een prominente rol als stimulator van het mTORC1-reactiepad en bijgevolg stimulering van de eiwitsynthese. In een studie waarbij ongetrainde proefpersonen negen maanden een krachttrainingsprogramma volgden en daarbij wei-eiwit of soja-eiwit gesuppleerd kregen, won de groep die wei-eiwit gesuppleerd kreeg meer magere lichaamsmassa (LBM, Eng.: *lean body mass*) dan de groep die soja-eiwit gesuppleerd kreeg [468]. Soja-eiwit bevat onder meer een stuk minder leucine dan wei-eiwit en waarschijnlijk is dit de reden waarom wei-eiwit leidde tot een grotere LBM-stijging.

Naast de hoeveelheid leucine die wordt geleverd is ook de absorptiesnelheid van belang. In een studie werd gekeken naar het effect op de gemengde spiereiwitsynthese (Eng.: *mixed muscle protein synthesis*) van wei-eiwithydrolisaat (snel geabsorbeerd), soja-eiwitisolaat (snel geabsorbeerd) en micellaire caseïne-eiwit (traag geabsorbeerd) [438]. Van elk werd een hoeveelheid toegediend die 10 g essentiële aminozuren leverde. Hierdoor was de hoeveelheid leucine iets hoger in het wei-eiwit dan in het soja-eiwit en micellaire caseïne-eiwit, en was de hoeveelheid leucine in het soja-eiwit gelijk aan dat in het micellaire caseïne-eiwit. Zoals verwacht was er een iets hogere stijging in de gemengde spiereiwitsynthese na een training in de groep die wei-eiwit kreeg vergeleken met de andere twee groepen. Bovendien werd er een grotere stijging in de gemengde spiereiwitsynthese gevonden in de groep die soja-eiwit kreeg vergeleken met de groep die caseïne-eiwit kreeg. Het oppervlak onder de plasmaleucineconcentratiecurve was kleiner na inname van caseïne, wat doet vermoeden dat de absorptiesnelheid inderdaad ten grondslag ligt aan het verschil. Een vergelijkbaar beeld wordt gezien wanneer wei-eiwit

wordt vergeleken met rijsteiwit of erwteiwit. Het nemen van een grotere dosis van deze kwalitatief minderwaardige eiwitten, om zo toch een voldoende stijging van met name leucine in de circulatie (de gehypothetiseerde 'leucinedrempel') te krijgen, leidt echter tot vergelijkbare resultaten [354].

Lange tijd werd aangenomen dat eiwitinname direct na een training een belangrijke rol speelde in het optimaliseren van spierhypertrofie. Er zou een beperkte tijd na een training bestaan waarin eiwitinname optimaal zou zijn, ook wel het anabole venster (Eng.: *anabolic window*) genoemd. Eiwitinname direct voor een training wordt ook nog geschaard onder gebruikmaken van dit anabole venster. Een meta-analyse vond geen effect op spierhypertrofie door gebruik te maken van het anabole venster nadat er was gecorrigeerd voor de totale eiwitinname [408]. Als er een effect zou zijn, zou deze waarschijnlijk heel klein zijn. Een nadeel van de geanalyseerde studies van deze meta-analyse is dat er slechts twee studies beschikbaar waren met getrainde personen en een controlegroep die gemacht was op totale eiwitinname. In een van deze twee studies kreeg een groep 40 g wei-eiwitisolaat, 43 g glucose en 7 g creatine, zowel onmiddellijk voor als na de training. Een andere groep kreeg hetzelfde zowel in de ochtend als de avond [107]. De groep die hun supplement rondom de training innamen vertoonden een significante stijging in de VVM en dwarsdoorsnede van type 2-spiervezels na tien weken krachttraining vergeleken met de groep die hun supplement 's ochtends en 's avonds kreeg.

De andere studie, eveneens met getrainde proefpersonen, was vergelijkbaar van opzet. Een groep kreeg 42 g eiwit en 2 g koolhydraten onmiddellijk voor en na de training, en de andere groep kreeg dit vroeg in de ochtend en laat in de avond [216]. Er werden geen verschillen gevonden tussen beide groepen na tien weken krachttraining. Samenvattend zou kunnen worden gesteld dat, als er een *anabolic window* zou bestaan, deze waarschijnlijk een stuk ruimer is dan de periode direct voor en vlak na (< 1 uur) een training en mogelijk is deze vooral van belang voor getrainde personen.

Aangezien er geen nadelen aan lijken te kleven, en veel mensen het als een handig moment ervaren in de praktijk, is het uiteraard een handige strategie om eiwit te suppleren na een training. De optimale dosis die hiervoor gebruikt kan worden om de spiereiwitsynthese te maximaliseren na een training lijkt rond de 40 g wei-eiwit te liggen, al biedt het slechts een geringe verbetering vergeleken met de helft van deze hoeveelheid [292]. Voor ouderen lijken hogere dosissen echter relatief belangrijker dan voor jongeren [316]. Ten slotte is er waarschijnlijk een grotere hoeveelheid benodigd van eiwitten die minder leucine bevatten. Dit kan nadelig zijn, daar een grotere inname ook een grotere energie-inname impliceert en dat is niet altijd gewenst.

9.4 Veiligheid

Eiwitten vormen een essentieel onderdeel van de voeding. Een normale eiwitinname is nodig om gezond te blijven. Een tekort kan namelijk leiden tot verschillende ziektebeelden die een dodelijk afloop kunnen hebben. Hoewel in ontwikkelingslanden een eiwittekort nog wel voorkomt, komt dit nagenoeg niet voor in landen zoals Nederland. De vraag die rest, met name voor atleten, is of een hoge eiwitinname veilig is. Een echte definitie voor een hoge eiwitinname ontbreekt en er zijn geen duidelijke aanwijzingen dat een hoge eiwitinname schadelijk is voor gezonde mensen. De Nederlandse Gezondheidsraad hanteert echter een veilige bovengrens van inname van 25% van de dagelijkse energie-inname voor volwassenen. Voor een atleet met een dagelijkse energie-inname van 3000

kcal vertaalt zich dit naar 188 g eiwit per dag. In de Verenigde Staten wordt door het Institute of Medicine (IOM) een bandbreedte gehanteerd van 10–35% van de dagelijkse energie-inname uit eiwit voor gezonde personen.

De zorgen die heersen rond een hoge eiwitinname zijn tweeledig. Enerzijds zijn er zorgen over de directe schadelijkheid van grote hoeveelheden eiwitten, en anderzijds zijn er zorgen over de schadelijkheid van grote hoeveelheden eiwitrijke producten zoals vlees en zuivel. Een bespreking van dit laatste punt valt buiten het bestek van dit boek en deze sectie beperkt zich dan ook tot de mogelijke schadelijkheid van een hoge eiwitinname *per se*.

Een hoge eiwitinname zou slecht zijn voor de nieren. Eiwitten verhogen namelijk onder meer de glomerulaire filtratiesnelheid (GFR, Eng.: *glomerular filtration rate*) en dit zou op den duur een negatieve impact hebben op de nierfunctie [296]. Hoewel dit bij mensen met al bestaande nierziekte het geval kan zijn, is er geen indicatie dat dit ook geldt voor gezonde personen. De verhoogde GFR lijkt een volstrekt normale fysiologische adaptatie te zijn op de verhoogde eiwitinname. Veel sporters hebben een gebruikelijke eiwitinname die vaak zeer hoog is, met name krachtsporters. Toch is er geen indicatie dat er een hogere prevalentie van nierziekte aanwezig is onder sporters. Een onderzoek uit 2000 vond geen indicatie van een verminderde nierfunctie bij een kleine groep atleten met een hoge eiwitinname tot 2.8 g/kg lgw/d [359]. In een onderzoek van Antonio e.a. werd een hoge eiwitinname variërend van 2.6 g/kg lgw/d tot 3.3 g/kg lgw/d gecombineerd met zware krachttraining gedurende 16 weken [15]. Er werd hierbij geen effect gevonden op de nierfunctie. In later onderzoek van Antonio e.a. werd eveneens geen effect gevonden op de nierfunctie na één jaar lang een hoogeiwitdieet (~2.5–3.3 g/kg lgw/d) gecombineerd met krachttraining [16].

Zoals eerder geschreven in dit hoofdstuk bevatten alle aminozuren ten minste één stikstofgroep. Het lichaam ontdoet zich van deze stikstofgroepen door deze om te vormen naar ammoniak. Ammoniak wordt vervolgens de ureumcyclus in geleid waarna het ureum vormt. Het ureum wordt vervolgens door de nieren in de urine geconcentreerd. Ook wordt een klein gedeelte van de gegenereerde ammoniak in de urine geconcentreerd door de nieren. Dit verhoogt de vochtbehoefte van het lichaam, en daarmee zou er ook een groter risico op uitdroging zijn. Voor de uitscheiding van 1 g ureumstikstof in de urine is circa 40–60 ml water benodigd [296]. 1 g dierlijk eiwit bevat circa 0.16 g stikstof. Als iemand zijn eiwitinname zou verhogen met 50 g dierlijk eiwit zou dit de vochtbehoefte met slechts 320–480 ml verhogen. Dergelijke hoeveelheden zijn relatief klein vergeleken met de vochtverliezen die optreden tijdens intensief sporten. Hoewel uitdroging wel voorkomt onder sporters, is dit vrijwel zonder uitzondering te wijten aan het grote vochtverlies via de huid als zweet tijdens het sporten, met name wanneer er wordt gesport in een hoge omgevingstemperatuur en met hoge intensiteit.

Ook is er enige zorg over het effect van een hoge eiwitinname op het skelet. Zo leidt een hogere eiwitinname zonder twijfel tot een hogere excretie van calcium in de urine [257]. Als deze calcium afkomstig zou zijn van het skelet, dan heeft dit een negatief effect op de botmineraaldichtheid. De redenatie hierbij is dat de verzurende werking van eiwitten wordt gebufferd door het lichaam door calciumcarbonaat te onttrekken aan het skelet [36]. De extra calcium die wordt uitgescheiden lijkt echter afkomstig te zijn van een verhoogde calciumabsorptie door het darmstelsel, waardoor het netto geen negatief effect lijkt te hebben op het skelet [257]. In het algemeen laten cross-sectionele studies en gerandomiseerde prospectieve studies dan ook geen negatief effect van eiwitsuppletie zien

op de botmineraaldichtheid en mogelijk zelfs een klein positief effect [112].

9.5 Conclusie

Eiwit vormt een belangrijk onderdeel van de dagelijkse voeding. De aanbevolen dagelijkse hoeveelheid is 0.8 g/kg lgw/d voor niet-sporters. De hoeveelheid die optimaal is voor krachtatleten is nog redelijk speculatief, maar zou kunnen oplopen tot wel 3.1 g/kg VVM/d bij atleten met een laag vetpercentage tijdens een energiebeperkend dieet. Eiwitpreparaten zijn bij uitstek een handig voedingssupplement voor sporters om te voorzien in deze verhoogde eiwitbehoefte. Met name de melkeiwitfracties wei-eiwit en caseïne-eiwit zijn hiervoor goed onderzocht. Het tijdstip van eiwitinname is van relatief weinig belang, zolang deze redelijkerwijs over de dag verspreid wordt. Een optimale dosis zou rond de 40 g wei-eiwit liggen om de spiereiwitsynthese te maximaliseren na een training. Van eiwitten met een lagere kwaliteit, in het bijzonder die met een lager leucinegehalte, is waarschijnlijk een hogere dosis nodig om hetzelfde effect te bewerkstelligen. De extra verbetering die deze dosis biedt is echter gering vergeleken met de helft van deze hoeveelheid, wat bij een beperkt budget een rol kan spelen.

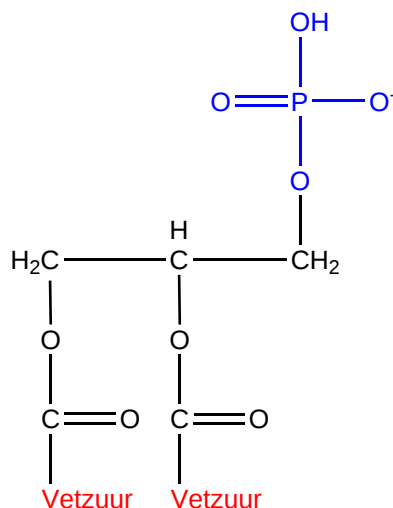
De effectiviteit van een hoogeiwitdieet of eiwitsuppletie voor het verhogen van de VVM of verbeteren van de krachtwinst in combinatie met een krachttrainingsprogramma, is goed gedocumenteerd in de literatuur. De waarde hiervan lijkt relatief belangrijker te worden bij meer getrainde atleten. Naast de effectiviteit is ook de veiligheid inmiddels redelijk goed beschreven in de literatuur. Hoewel er zorgen zijn geuit over een hoge eiwitinname en de nierfunctie en botmineraaldichtheid, worden deze zorgen niet ondersteund door de literatuur.

10. Fosfatidezuur

10.1 Inleiding

Fosfatidezuur is een fosfolipide bestaande uit glycerol, twee vetzuren en een fosfaatgroep. Hierbij zijn de eerste twee C-atomen van de glycerol veresterd met een vetzuur, en het derde C-atoom met de fosfaatgroep. Het wordt daarom ook een glycerofosfolipide genoemd. Het eerste C-atoom is doorgaans veresterd met een verzadigd vetzuur van zestien of achttien koolstofatomen lang en het tweede C-atoom met een onverzadigd vetzuur van zestien, achttien of twintig koolstofatomen lang. De vetzuren van soja-afgeleid fosfatidezuur (veel gebruikt voor suppletie) bestaan echter alleen uit ketens van zestien of achttien koolstofatomen lang [367]. Fosfatidezuur komt in lage concentraties voor in celmembranen (zie verder kader 10.1). De molaire concentratie is kleiner dan 5% van dat van fosfatidylcholine, de meestvoorkomende glycerofosfolipide in celmembranen [71].

Hoewel fosfatidezuur nog relatief onbekend is als voedingssupplement onder sporters, heeft de fosfolipide al wel de aandacht



Figuur 10.1: Structuurformule van fosfatidezuur. Aan het eerste en tweede C-atoom van het glycerol zijn twee vetzuren gebonden en aan het derde C-atoom een fosfaatgroep (in blauw).

getrokken van onderzoekers [60]. Fosfatidezuur is namelijk nauw betrokken bij activatie van mTORC1 (zie ook sectie 4.2.4). In 2009 werd een model voorgesteld waarbij de vorming van fosfatidezuur de activatie van mTORC1 medieert na eccentriche spiercontracties [338]. Het heeft vervolgens niet lang geduurd voordat het de aandacht trok van onderzoekers in de hoek van sportsupplementen: in 2012 werd de eerste klinische studie gepubliceerd die het effect van fosfatidezuursuppletie onderzocht op kracht, spierdikte en magere lichaamsmassa (Eng.: *lean body mass*) [217].

Fosfatidezuur is ook te vinden in de voeding, maar slechts in zeer geringe concentraties (zie tabel 10.1). De beste bron van fosfatidezuur uit voeding lijkt rauwe kool te zijn, met een concentratie van een halve milligram per gram. Maar in principe is de hoeveelheid uit voeding niet toereikend om een dosis te bereiken die vergelijkbaar is met de hoeveelheid die gebruikt wordt in klinische studies (enkele honderden milligrammen).

Product	Fosfatidezuur (mg/g)
Kool	0.49
Kool (gekookt)	0.03
Tomaat	0.23
Komkommer	0.18
Rijst	0.02
Rijst (gekookt)	0.02

Tabel 10.1: Fosfatidezuurinhoud van verschillende middelen. Data overgenomen uit [437]. Oorspronkelijke data gerapporteerd in μmol per g en omgerekend naar mg per g uitgaande van een molaire massa van 674.9 g/mol ($\text{C}_{37}\text{H}_{71}\text{O}_8\text{P}$).

Kader 10.1



De membranen van cellen bestaan uit een dubbele laag van lipiden en eiwitten. Fosfolipiden zijn de meestvoorkomende lipiden in de membranen. Kenmerkend aan fosfolipiden is dat zij een polaire (hydrofiele) kop hebben (de fosfaatgroep) en twee apolaire (hydrofobe) staarten (meestal vetzuren). Bij glycerofosfolipiden zijn de vetzuren en de fosfaatgroep gebonden aan een glycerolmolecuul.

De koppen van fosfolipiden staan naar het water toe gericht, terwijl de staarten naar elkaar toe staan. De fosfolipidensamenstelling van een membraan is belangrijk voor de functie ervan. Er wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen vier verschillende soorten glycerofosfolipiden: fosfatidylserine, fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en sfingomyeline. De verschillen zijn vooral afhankelijk van wat voor chemische groep gebonden is aan de fosfaatgroep (de polaire kop). Fosfatidezuur vormt hierbij de 'simpelste' glycerofosfolipide: er is geen chemische groep gebonden aan de fosfaatgroep, maar slechts een waterstofatoom (de -OH-groep). Fosfatidezuur vormt door zijn structuur dan ook een belangrijke voorloper voor de overige glycerofosfolipiden en staat hierdoor centraal in de glycerofosfolipidesynthese.

10.1.1 Biosynthese

Fosfatidezuur staat centraal in de synthese van membraanfosfolipiden en triacylglycerol [153] en kan gesynthetiseerd worden via drie verschillende metabole paden. Eén van deze paden zorgt voor *de novo*-synthese van fosfatidezuur. Dit mechanisme vertrekt vanuit

twee intermediaire producten van de glycolyse (zie sectie 2.3). Tijdens de glycolyse wordt fructose-1,6-bifosfaat gesplitst in dihydroxyacetonfosfaat en glyceraldehyde-3-fosfaat. Het ontstane dihydroxyacetonfosfaat kan vervolgens worden omgezet in glycerol-3-fosfaat door het enzym glycerol-3-fosfaatdehydrogenase. Vervolgens kunnen twee vetzuren gebonden worden aan het ontstane glycerol-3-fosfaat om zo fosfatidezuur te vormen. De eerste acetyleringsreactie wordt hierbij gekatalyseerd door glycerol-3-fosfaatacyltransferase. Het gevormde lysofosfatidezuur wordt vervolgens nogmaals geacetyleerd tot fosfatidezuur door het enzym lysofosfatidezuuracyltransferase. De vetzuren die hiervoor gebruikt worden kunnen zowel afkomstig zijn uit de voeding als uit *de novo* vetzuursynthese. Dit pad lijkt echter de voorkeur te hebben voor vorming van fosfatidezuur met twee verzadigde vetzuren [501], een vorm die niet in staat lijkt om mTORC1-activiteit te bevorderen [491].

In het tweede metabole pad wordt diacylglycerol gefosforyleerd tot fosfatidezuur door een diacylglycerolkinase of PRK-like ER-kinase (PERK) [54], een kinase die zich bevindt in de membraan van het endoplasmatisch reticulum. Opmerkelijk is dat de kinase-activiteit van PERK afhankelijk is van fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K). PI3K wordt geactiveerd door activatie van de insuline- of insuline-achtige groeifactor-1-receptor, zoals beschreven in sectie 4.2.1. Het diacylglycerol kan afkomstig zijn van opgeslagen vet in de vorm triacylglycerol. Hierbij wordt één acyl-CoA-groep gedeacyleerd door een lipase. Ook kan het afkomstig zijn van fosfatidylinositol, waarbij fosfolipase C het molecuul vlak voor de fosfaatgroep klieft.

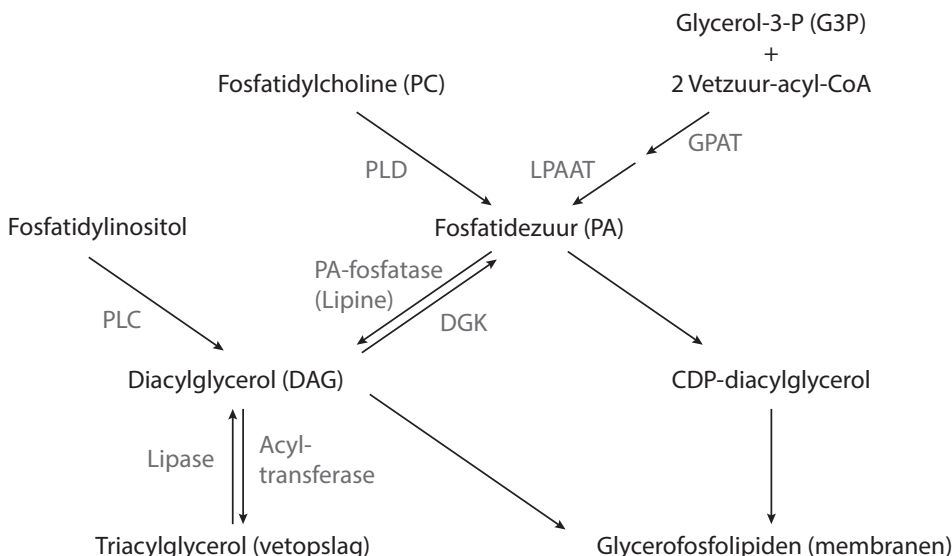
In het derde metabole pad dat fosfatidezuur vormt, wordt uitgegaan van fosfatidylcholine als substraat. Het enzym fosfolipase D hydrolyseert hierbij fosfatidylcholine waardoor het zijn cholinegroep verliest.

De biosynthese van fosfatidezuur die belangrijk is voor mTORC1-signalering door mechanische activiteit lijkt met name verzorgd te worden door de diacylglycerolkinases, in het bijzonder de ζ -isovorm [495].

10.1.2 Absorptie

Fosfatidezuur wordt oraal gesuppleerd in de vorm van capsules of soft gels. In de dunne darm wordt het gemetaboliseerd tot lysofosfolipiden of glycerol-3-fosfaat. Hiervoor zijn fosfolipasen afkomstig uit het alvleeskliaarsap verantwoordelijk. Deze fosfolipasen hydrolyseren de esterbindingen op het eerste (*sn*-1) of tweede C-atoom (*sn*-2) van fosfatidezuur. De fosfolipasen, in het bijzonder fosfolipase A2, klieven met name het vetzuur op het tweede C-atoom [454]. Vervolgens worden deze producten opgenomen door de darmmucosa. Dit zullen met name lysofosfolipiden zijn waarbij een vetzuur op het tweede C-atoom ontbreekt. In de enterocyten kunnen de lysofosfolipiden opnieuw worden veresterd met een vetzuur dat weer fosfatidezuur geeft. Met welk vetzuur de lysofosfolipide wordt veresterd is met name afhankelijk van de overige vetzuren die de enterocyten betreden. Zodoende is het dus afhankelijk van het aanbod van vet uit de voeding.

Het opnieuw gevormde fosfatidezuur, en eventueel andere fosfolipide producten, worden verpakt in chylomicronen waarvan zij de buitenste laag zullen uitmaken. De gevormde chylomicronen worden vervolgens door middel van exocytose uitgescheiden door de enterocyten, waarna het in het lymfesysteem terechtkomt. Vanuit het lymfesysteem komt het vervolgens in de circulatie terecht. Het komt hierdoor trager in de circulatie terecht dan andere voedingsmiddelen en -supplementen die via de poortader de lever bereiken en van daaruit in de circulatie terechtkomen. In een kleinschalig onderzoek ($n = 1$) vond men dan ook een piek in de plasmafosfatidezuurconcentratie ($T_{\max}$) na drie uur, en was



Figuur 10.2: Fosfatidezuur (PA) kan gesynthetiseerd worden uit glycerol-3-fosfaat (G3P), fosfatidylcholine (PC) en diacylglycerol (DAG). G3P wordt tweemaal geactyleerd om PA te vormen. Eerst vindt er actylering plaats door GPAT, gevolgd door LPAAT. PC wordt gehydrolyseerd door PLD om PA te leveren en DAG wordt gefosforyleerd door DGK om PA te leveren. DAG is afkomstig van triacylglycerolen en fosfatidylinositol. PA-fosfatase is verantwoordelijk voor de defosforylering van PA tot DAG. Verscheidene CDP-diacylglycerolsynthases produceren CDP-diacylglycerol uit PA. Figuur overgenomen uit Bond [59].

deze concentratie zeven uur na inname nog steeds verhoogd [367]. Dit stemt overeen met wat men zou verwachten bij stoffen die via het lymfesysteem worden opgenomen. De maximaal gemeten concentratie ($C_{\max}$) bedroeg 3.51 nmol/ml bij een basisconcentratie van 2.66 nmol/ml (+32%). Dit bij een dosis van 1.5 gram soja-afgeleid fosfatidezuur. Ook werd er een sterke stijging in de plasmalysofosfatidezuurconcentratie gevonden.

Op het moment van schrijven is er echter geen data bekend over de incorporatie van fosfatidezuur uit de voeding in de membranen van spiercellen. Nota bene zijn er aanwijzingen dat fosfatidezuursuppletie, in ieder geval ten dele, leidt tot mTORC1-activatie door extracellulaire conversie naar lysofosfatidezuur [486]. Dit zou betekenen dat incorporatie van fosfatidezuur in de celmembraan (of opname door de cel) niet per se nodig is. Het gevormde lysofosfatidezuur bindt namelijk aan *endothelial differentiation gene 2* (EDG-2, een lysofosfatidezuurreceptor) en dit stimuleert vervolgens mTORC1-signalering door activatie van het ERK-reactiepad.

10.1.3 Metabolisme en excretie

Fosfatidezuur staat centraal in de synthese van glycerofosfolipiden. Het vormt namelijk de gemeenschappelijke voorloper van glycerofosfolipiden. Dit belangrijke metabole pad dat fosfatidezuur kan inslaan, begint met activering door koppeling aan cytidinedifosfaat (CDP), waardoor CDP-diacylglycerol ontstaat. De activering met CDP is vergelijkbaar

met die van glucose door uridinedifosfaat (UDP), zoals gezien in de glycogeensynthese. Vervolgens kan de OH-groep reageren met een alcohol, waardoor drie verschillende glycerofosfolipiden kunnen ontstaan: fosfatidylcholine, fosfatidylethanolamine en fosfatidylinositol. Ook kan het aminozuur serine reageren met de OH-groep wat fosfatidylserine geeft.

Tevens kan fosfatidezuur gedefosforyleerd worden door een fosfatidezuurfosfatase [84]. Hierdoor blijft een diacylglycerolmolecuul over. Dit molecuul kan vervolgens nogmaals veresterd worden met een vetzuur door acyltransferase. Hierdoor ontstaat een triacylglycerol die kan worden opgeslagen in onder andere het vetweefsel. Ook kan diacylglycerol omgevormd worden tot glycerofosfolipiden.

In principe kunnen het glycerolmolecuul en de daaraan gebonden vetzuren van fosfatidezuur dienen als substraten voor energieproductie. De hoeveelheden zijn echter dermate gering dat zij geen significante rol spelen in het energiemetabolisme.

10.2 Werkingsmechanisme

In sectie 4.2.4 is reeds besproken dat mechanische belasting leidt tot de vorming van fosfatidezuur. Fosfatidezuur kan vervolgens mTORC1-activiteit stimuleren door directe interactie met het complex. Fosfatidezuur dat uit de voeding afkomstig is kan eveneens mTORC1-activiteit stimuleren, maar lijkt dit ook via een ander mechanisme te doen dan het fosfatidezuur dat wordt gevormd door mechanische belasting [413]. Immers wordt het fosfatidezuur in reactie op mechanische belasting intracellulair geproduceerd, terwijl het fosfatidezuur uit de voeding zich ook buiten de cellen bevindt.

10.2.1 Activatie van mTORC1

In 2011 voerden Yoon e.a. een *in vitro*-onderzoek uit waaruit zou blijken dat fosfatidezuur in staat is om direct mTORC1 te activeren [493]. Allereerst werd vastgesteld dat toevoeging van fosfatidezuurvesikels aan het celmedium leidde tot mTORC1-activatie. Vervolgens werd er gekeken naar het effect van fosfatidezuur op de endogene mTORC1-remmer FKBP38. FKBP38 bindt, net als fosfatidezuur, aan het FRB-domein. Mogelijk zou fosfatidezuur dus competitief kunnen binden aan dit domein, waardoor FKBP38 dit niet meer zou kunnen doen. En inderdaad, fosfatidezuur bleek met FKBP38 te concurreren voor binding aan dit domein, wat de remmende werking van FKBP38 op mTORC1 opheft. Tot slot keken de onderzoekers nog of fosfatidezuur in staat was mTORC1-activiteit te stimuleren in de afwezigheid van FKBP38. Als dit het geval was, zou het dus niet alleen de remmende werking van FKBP38 opheffen, maar zou het ook zelf mTORC1 kunnen activeren. De resultaten van de onderzoekers suggereren inderdaad dat dit het geval is en dat fosfatidezuur tevens als allosterische activator van mTORC1 fungeert.

Later onderzoek, eveneens door Yoon e.a., toonde aan dat fosfatidezuur ervoor zorgt dat de mTORC1-remmer DEPTOR dissocieert van het complex [491]. Ook vonden zij dat alleen fosfatidezuur met ten minste één onverzadigde vetzuurketen hiervoor zorgde, terwijl de varianten met twee verzadigde vetzuren dit niet deden. Dit is in lijn met de resultaten van een ander *in vitro*-onderzoek waarbij het effect van soja-afgeleid fosfatidezuur op mTORC1-activatie werd vergeleken met dat van ei-afgeleid fosfatidezuur [246]. De soja-afgeleide fosfatidezuur zorgde voor een sterkere mTORC1-activatie en bevatte een grotere hoeveelheid onverzadigde vetzuren dan ei-afgeleid fosfatidezuur.

Verder is gesuggereerd dat exogeen fosfatidezuur mTORC1 mogelijk niet activeert door directe interactie. In plaats daarvan zou het zijn werking uitoefenen door extracellulaire conversie naar lysofosfatidezuur. Lysofosfatidezuur wordt gevormd door een fosfolipase, waarbij het tweede C-atoom wordt ontdaan van de acylgroep. Lysofosfatidezuur zou vervolgens aan endothelial differentiation gene 2 (EDG-2)-receptoren binden op de celmembraan [486]. EDG-2 is een receptor die behoort tot de familie van G-proteïne-gekoppelde receptoren. Activatie van de receptor zou vervolgens het MEK-ERK-reactiepad activeren, dat door middel van remming van het TSC-complex [290] en raptor [85] mTORC1-signalering kan stimuleren. Bovendien stimuleert EDG-2-activatie de activiteit van fosfolipase D, waardoor er meer intracellulair fosfatidezuur wordt gegenereerd uit fosfatidylcholine.

Later onderzoek toetste de betrokkenheid van het MEK-ERK-reactiepad door gebruik te maken van de MEK-ERK-remmer U0126 in een *ex-vivo*-model [494]. In dit model remde U0126 de stijging in S6K1- en 4E-BP1-fosforylering in reactie op mechanische stimulering, maar blokkeerde het deze stijging niet volledig. In C2C12-myoblasten waaraan fosfatidezuur werd toegevoegd, werden vergelijkbare resultaten gevonden. U0126 blokkeerde hierbij niet de stijging in S6K1-fosforylering, noch in 4E-BP1-fosforylering, maar remde deze wel enigszins. Concluderend is het MEK-ERK-reactiepad dus niet noodzakelijk, maar lijkt het wel gedeeltelijk verantwoordelijk voor de geobserveerde mTORC1-activatie.

10.2.2 Remming ubiquitinligases

Een belangrijke mediator van spieratrofie is het ubiquitinesysteem. Dit systeem bestaat uit een samenspel van moleculen die eiwitten markeren met de marker ubiquitine en een groot eiwitcomplex dat vervolgens deze gemarkeerde eiwitten afbreekt, het proteasoom. Twee zogeheten E3-ligases, die direct verantwoordelijk zijn voor het binden van ubiquitine aan eiwitten, lijken voornamelijk betrokken bij deze regulatie in spiercellen. Dit zijn *muscle atrophy F-box* (MAFbx, ook wel bekend als atrogine-1) en *muscle ring finger 1* (MuRF1). In veel experimentele modellen waarbij spieratrofie plaatsvindt, zoals cachexie of toediening van dexamethason, treft men een verhoogde expressie van deze twee ubiquitinligases. Om die reden worden ze dan ook vaak uitgelezen in experimenteel onderzoek als surrogaatmarker voor spieraafbraak. De *forkhead box class O* (FoxO)-familie van transcriptiefactoren spelen een belangrijke rol in de regulatie van expressie hiervan.

Overexpressie van fosfolipase D1, dat fosfatidezuur genereert uit fosfatidylcholine, leidt tot een verlaagde mRNA-expressie van FoxO, MAFbx en MuRF1 in volledig gedifferentieerde L6-myotubes [236]. Incubatie van myotubes met 100 μ M fosfatidezuur remt eveneens een door dexamethason geïnduceerde stijging in MuRF1-, MAFbx- en FoxO3-mRNA. Bovendien liet hetzelfde onderzoek zien dat exogeen fosfatidezuur in staat was om atrofie ten gevolge van dexamethason, alsook ten gevolge van TNF α (een ontstekingsfactor), tegen te gaan. Een mogelijk mechanisme dat hieraan ten grondslag zou kunnen liggen verloopt via mTORC2. De rol van mTORC2 in de regulatie van spiergroei is wat minder prominent, en verschilt structureel gezien van mTORC1 door associatie met het eiwit rictor in plaats van raptor. Door de directe interactie van fosfatidezuur met mTOR kan het mogelijk ook de activiteit van mTORC2 beïnvloeden. mTORC2 fosforyleert, en activeert daarmee, Akt op een serineresidu [401]. Zodra Akt is geactiveerd fosforyleert het verscheidene substraten, waaronder FoxO-eiwitten [444], waardoor zij geremd worden [502]. MuRF1 en MAFbx zijn vervolgens twee belangrijke downstream effectoren van FoxO-signalering. Mocht deze weg via mTORC2-Akt ten grondslag liggen aan het

spieratrofieremmede effect van fosfatidezuur, dan rest de vraag in hoeverre dit relevant is onder fysiologische omstandigheden waarbij groeifactoren, die het PI3K-Akt-reactiepad activeren, ruim aanwezig zijn. Mogelijk is dit effect niet additief.

10.3 Klinische resultaten

In 2012 werd de eerste klinische studie uitgevoerd die keek naar het effect van fosfatidezuur op kracht, spierdikte en magere lichaamsmassa [217]. In totaal deden zestien mannen met ervaring met krachttraining mee aan het onderzoek. Zeven van deze mannen kregen fosfatidezuur toegediend, waarbij de dosering 750 mg per dag bedroeg. De overige negen mannen kregen een placebo. Bij aanvang werd de lichaamscompositie bepaald met een dual-energy X-ray absorptiometrie (DXA)-scan. Als uitgangspunt voor kracht werden de 1-RM bepaald van de squat en het bankdrukken. Met gebruik van ultrasonografie werd de spierdikte en -architectuur (pennatiehoek) van de vastus lateralis bepaald. Na een acht weken durend krachttrainingprogramma, waarbij viermaal per week werd getraind, werden de metingen herhaald. De resultaten van deze interventie op deze zeven uitkomstmaten staan vermeld in tabel 10.2.

Geen van de zeven uitkomstmaten bereikte statistische significantie, maar wel werd er een trend ($P = 0.065$) gezien voor een stijging in de magere lichaamsmassa. Toepassing van magnitude-gebaseerde inferentie (MBI, Eng.: *magnitude-based inference*) suggereert een 'zeer waarschijnlijk' positief effect op de magere lichaamsmassa en een 'waarschijnlijk' positief effect op de 1-RM squatmeting. Voor de overige vijf uitkomstmaten is de data te onduidelijk om iets uit af te leiden (zie ook kader 10.2). De beperkte groepsgrootte en de uitkomsten van de MBI maken het aannemelijk dat de kleine groepen een significant effect, op in ieder geval de magere lichaamsmassa, verdoezelde. Opmerkelijk was wel dat de placebogroep nagenoeg geen verandering in de magere lichaamsmassa ondervond (+0.1 kg), wat kan betekenen dat de trainingsprikkel niet adequaat was voor spierhypertrofie.

Variabele	Δ	P-waarde	Klinische interpretatie
1-RM bankdrukken (kg)	2.38	0.43	Onduidelijk
1-RM squatten (kg)	4.31	0.19	Waarschijnlijk
Spierdikte (cm)	0.007	0.96	Onduidelijk
Pennatiehoek (°)	0.79	0.69	Onduidelijk
Lichaamsmassa (kg)	1.4	0.35	Onduidelijk
Lichaamsvet (kg)	0.1	0.99	Onduidelijk
Magere lichaamsmassa (kg)	1.6	0.065	Zeer waarschijnlijk

Tabel 10.2: Gemiddelde verschillen (Δ , fosfatidezuur vs. placebo) en P-waarden voor groep $\times$ tijd-interacties. Voor de analyse is een tweeweg factoriële variantieanalyse (ANOVA) toegepast met Tukey post-hoc-tests. De α -waarde is gezet op 0.05. Klinische interpretatie gebaseerd op magnitude-gebaseerde inferentie (zie ook kader 10.2). Resultaten uit [217].

Kader 10.2



Magnitude-gebaseerde inferentie (MBI, Eng.: *magnitude-based inference*) is een statistische methode die de laatste jaren in toenemende mate gebruikt wordt in de sportwetenschappen. De methode wordt vooral toegepast om

uitspraken te doen over kleine effecten in kleine groepen, die geen statistische significantie weten te bereiken door een gebrek aan statistisch onderscheidingsvermogen. De methode is namelijk een stuk minder conservatief dan traditionele methoden. Zodoende zou het goed kunnen inspelen op de grote kans op een type II-fout ('fout-negatief') die optreedt bij kleine effecten in kleine groepen. De kwalitatieve P-waarden die MBI geeft worden vertaald in beschrijvende categorieën zoals 'meest onwaarschijnlijk', 'zeer onwaarschijnlijk', 'onwaarschijnlijk', 'mogelijk', 'waarschijnlijk', 'zeer waarschijnlijk' en 'meest waarschijnlijk'. Wanneer een betrouwbaarheidsinterval (BI, vaak het 95%-BI) zowel de grenswaarde voor een positief als een negatief effect overschrijdt wordt deze gecategoriseerd als 'onduidelijk'.

De statistische methode is echter niet zonder bezwaren en gebruik ervan wordt ontmoedigd [476]. Voorzichtigheid is dan ook geboden bij het interpreteren van de resultaten van MBI. Het moet erkend worden dat kleinschalige studies simpelweg een beperkte statistische bewijskracht kennen.

In navolging op deze eerste klinische studie werd een vergelijkbare vervolgstudie uitgevoerd door Joy e.a. [246]. Ook hier werd een 8 weken durend krachttrainingprogramma gevolgd door mannen met ervaring met krachttraining en werd eveneens 750 mg fosfatidezuur per dag uitgezet tegenover een placebo. Een belangrijk verschil was dat het aantal deelnemers groter was (in totaal 28), het tijdstip van inname van het fosfatidezuur gereguleerd was en er een directe bepaling van spierhypertrofie werd uitgevoerd (de dwarsdoorsnedeoppervlak [CSA] van een spier). Het fosfatidezuur werd op trainingsdagen dertig minuten voor de training genomen (450 mg) en direct daarna (300 mg), en op rustdagen bij het ontbijt (450 mg) en het avondeten (300 mg). De magere lichaamsmassa, bepaald middels een DXA-scan, toonde een significante groep $\times$ tijd-interactie waarbij deze meer steeg in de fosfatidezuurgroep ten opzichte van de placebogroep. In tegenstelling tot de eerdere studie, nam nu ook de magere lichaamsmassa in de placebogroep toe (+1.2 kg). Dit suggereert dat de trainingsprikkel in deze studie adequaat was. Een trend werd gevonden voor de vetmassa die meer daalde in de fosfatidezuurgroep. Ook werd een significant grotere stijging van de CSA, vastgesteld middels ultrageluid van de rectus femoris, gevonden in de fosfatidezuurgroep. Als krachtmaat werd in deze studie eveneens uitgegaan van de 1-RM bankdrukken voor het bovenlichaam, voor het onderlichaam werd echter de 1-RM leg press gehanteerd. Hoewel de 1-RM leg press significant meer steeg in de fosfatidezuurgroep, was dat niet het geval voor het bankdrukken. De resultaten van deze studie liggen daarmee in lijn met de eerder uitgevoerde pilotstudie.

Aan een klinische studie uitgevoerd door Escalante e.a. deden achttien mannen met ervaring met krachttraining mee [143]. Ook hier werd gekozen voor een acht weken durend krachttrainingprogramma en werd een DXA-scan toegepast om de lichaamscompositie in kaart te brengen. Eveneens werd de DXA-scan ingezet om hypertrofie van de dijbeenspiermassa inzichtelijk te maken. De gebruikte dosering en tijdstip van inname waren identiek aan die van de studie door Joy e.a., alleen was er aan het supplement van de fosfatidezuurgroep ook vitamine D, leucine en het leucinemetaboliet β -hydroxy- β -methylbutaan- α -zuur (HMB) toegevoegd. Ook hier werd er een significante stijging van de 1-RM bankdrukken, 1-RM leg press en de magere lichaamsmassa gevonden, en een trend naar een daling van de vetmassa in de fosfatidezuurgroep ten opzichte van de placebogroep. Er werd geen significant verschil gevonden in hypertrofie van de dijbeenspiermassa tussen beide groepen. Het moet opgemerkt worden dat de toevoeging van vitamine D, leucine en HMB aan het fosfatidezuur de resultaten beïnvloed zou kunnen hebben, ook al stemmen de resultaten overeen met eerder onderzoek. Het valt daarom niet te zeggen in hoeverre fosfatidezuur

bijdroeg aan de resultaten.

Een recente klinische studie keek naar de effecten van lagere doseringen fosfatidezuur (250 mg en 375 mg dagelijks) in combinatie met krachttraining [14]. In totaal deden 28 proefpersonen mee, waarvan 10 een placebo kregen, 9 personen 250 mg fosfatidezuur, en de resterende 9 personen 375 mg fosfatidezuur per dag. Ook hier hadden alle proefpersonen ervaring met krachttraining en werd een acht weken durend krachttrainingsprogramma gevolgd. Het fosfatidezuur werd één uur voor de training ingenomen op trainingsdagen en 's ochtends op rustdagen. Een DXA-scan werd toegepast voor het vaststellen van de vetmassa en magere lichaamsmassa. Er werd gebruikgemaakt van ultrasonografie om de CSA van de rectus femoris te bepalen. Kracht van het onderlichaam werd vastgesteld door een 1-RM leg press, terwijl de kracht van het bovenlichaam in dit onderzoek niet werd meegenomen als uitkomstmaat. Een ANOVA liet voor geen van de uitkomstmaten een significante groep $\times$ tijd-interactie zien. Toepassing van MBI liet wel een waarschijnlijk positief effect zien op de vetvrije massa en CSA van de rectus femoris, en een zeer waarschijnlijk positief effect op de 1-RM leg press in de fosfatidezuurgroep die 250 mg per dag kreeg ten opzichte van de placebogroep. Ook in de groep die 375 mg per dag kreeg werd een waarschijnlijk positief effect gevonden op de CSA van de rectus femoris, 1-RM leg press, en een mogelijk positief effect op de magere lichaamsmassa ten opzichte van de placebogroep. De gerapporteerde MBI-data lijken echter niet te kloppen. De magere lichaamsmassa nam namelijk gemiddeld minder toe in zowel de fosfatidezuurgroep die 250 mg per dag kreeg (+0.5 kg) als de groep die 375 mg kreeg (+1.3 kg), dan in de placebogroep (+1.6 kg). Ook de vetmassa nam gemiddeld het meeste af in de placebogroep. De overige cijfers in de tabel met MBI-waarden stemmen ook niet overeen met de data gerapporteerd elders in het onderzoek.

Gezien de dubbelzinnige resultaten in de literatuur onderzochten ook Gonzalez et al. het effect van fosfatidezuursuppletie (750 mg per dag) in getrainde mannen [173]. Ook in deze studie volgden de proefpersonen ($n = 8$) een krachttrainingsprogramma waarbij driemaal per week werd getraind. Voor en na de acht weken werd er gekeken naar het effect op spierdikte van de rectus femoris, vastus lateralis, biceps brachii en triceps brachii (gemeten met ultrasonografie), en krachtwinst (1-RM squatten, deadliften en bankdrukken). Helaas werd in deze studie niet de lichaamscompositie bepaald. Hoewel alle proefpersonen vooruitgingen met al deze metingen, werden er geen significante verschillen tussen de placebogroep en fosfatidezuurgroep gevonden.

Een overzicht van de resultaten van de zojuist besproken studies is gepresenteerd in tabel 10.3.

Samenvattend suggereren de studies misschien een positief effect op de magere lichaamsmassa en spierkracht door fosfatidezuursuppletie in combinatie met krachttraining. De recente studie door Andre e.a. wordt geplaagd door verkeerd gerapporteerde data en mogelijk speelt ook de lagere dosering een rol in de gevonden resultaten. Hierdoor zouden significante effecten uit kunnen blijven. Zowel Escalante e.a. en Joy e.a. vonden een positief effect op de magere lichaamsmassa door fosfatidezuursuppletie, hoewel in het onderzoek van Escalante e.a. ook vitamine D, leucine en HMB werd gesuppleerd. Deze extra supplementen zouden de resultaten kunnen hebben beïnvloed, waardoor het niet te zeggen valt in hoeverre fosfatidezuur verantwoordelijk was voor de gevonden resultaten. De resultaten van Hoffman e.a. tonen alleen een positief effect op de magere lichaamsmassa wanneer wordt uitgeweken naar een MBI-analyse. Tot slot laten de meeste studies een positief effect op de krachtontwikkeling zien, hoewel deze alleen significantie weet te

Studie	1-RM BP (kg)	1-RM SQ/LP (kg)	LBM (kg)	FM (kg)
Gonzalez e.a. (2017)	+0.5	+0.6	-	-
Andre e.a. (2016) ^a	-	+20.5	-0.3	+0.4
Andre e.a. (2016) ^b	-	+42.4	-1.1	+0.3
Escalante e.a. (2016) ^c	+8.5*	+29.2*	+1.1*	-1.0
Joy e.a. (2014)	+10.3	+19.5*	+1.2*	-0.8
Hoffman e.a. (2012)	+2.4	+4.2	+1.6	+0.1

Tabel 10.3: Resultaten geven het gemiddelde verschil van verandering weer tussen de fosfatidezuur-groep en placebogroep na acht weken krachttraining. De gebruikte dosering fosfatidezuur bedroeg 750 mg per dag, tenzij anders vermeld. ^aGebruikte dosering fosfatidezuur bedroeg 375 mg per dag. ^bGebruikte dosering fosfatidezuur bedroeg 250 mg per dag. ^cNaast 750 mg fosfatidezuur kregen de proefpersonen ook vitamine D, leucine en HMB. *Significant verschillend ten opzichte van placebogroep ($P < 0.05$). Afkortingen: BP, bankdrukken; SQ, squat; LP, leg press; LBM, magere lichaamsmassa; FM, vetmassa.

bereiken in de studie door Escalante e.a., waarbij wederom de toevoeging van de overige supplementen dit resultaat zou kunnen hebben beïnvloed. De onlangs gepubliceerde studie van Gonzalez vond geen enkel effect op kracht, noch op spierdikte.

Vervolgonderzoek met meer proefpersonen is nodig om meer zekerheid te verschaffen. Als er een effect is op de magere lichaamsmassa of kracht, dan is deze waarschijnlijk klein. Vooralsnog is er geen onderzoek verricht naar het effect van fosfatidezuursuppletie in een ongetrainde populatie. Zodoende blijft het onbepaald wat het effect van fosfatidezuur is in ongetrainde personen. Ook is het onduidelijk of het werkingsmechanisme, stimulering van mTORC1 door interactie met mTOR en activatie van het MEK-ERK-reactiepad, *in vivo* bij mensen een rol speelt. Gezien het remmende effect van fosfatidezuur op volledig gedifferentieerde L6-myotubes op ubiquitinligases (zoals besproken in sectie 10.2.2) is het interessant om het effect hiervan te onderzoeken in populaties waarbij spieratrofie op de voorgrond staat.

10.4 Veiligheid

Er is opmerkelijk weinig bekend over de veiligheid van fosfatidezuur. Tot op heden is er slechts één publicatie in de wetenschappelijke literatuur terug te vinden die hier direct onderzoek naar heeft verricht [133]. In deze posterpresentatie, gepresenteerd op de tiende jaarlijkse conferentie van de International Society of Sports Nutrition in 2013, werd de veiligheid van fosfatidezuur onderzocht in 28 gezonde jonge mannen. Het onderzoek was dubbelblind opgezet waarbij één groep dagelijks 750 mg soja-afgeleid fosfatidezuur kreeg, en de andere groep een placebo. De cardiovasculaire, nier- en leverfunctie werden in kaart gebracht door middel van een compleet metabool beeld (CMP, Eng.: *comprehensive metabolic panel*) en compleet bloedbeeld (CBC, Eng.: *complete blood test*). Ook werd een urinemonster afgenomen om de specifieke zwaartekracht (een nierfunctietest) en de pH hiervan te bepalen. Na acht weken suppletie werd er geen enkel significant verschil gevonden tussen de fosfatidezuurgroep en de placebogroep.

In géén van de klinische studies besproken in sectie 10.3 wordt melding gedaan van bijwerkingen. Echter, deze studies keken niet specifiek naar veiligheid en er werden dus

geen tests gedaan die bijwerkingen zou opmerken die de gebruiker niet zou kunnen voelen (denk bijvoorbeeld aan een verhoging van het LDL-cholesterol).

Met deze beperkte data lijkt fosfatidezuursuppletie, bij een dosering van 750 mg per dag op de korte termijn veilig in gezonde jonge mannen. Gegeven dat in totaal 75 proefpersonen fosfatidezuur gesuppleerd kregen in de beschouwde studies, en geen bijwerkingen vertoonden, is het maximale risico op bijwerkingen circa 4% [192]. Verder onderzoek is noodzakelijk om meer zekerheid te krijgen over de veiligheid van het supplement, ook voor andere populaties en langetermijngebruik.

10.5 Conclusie

Fosfatidezuur is mogelijk een interessant supplement voor wie de spiermassa wil vergroten of meer krachtwinst wil boeken. Veel moleculair onderzoek impliceert een nauwe betrokkenheid van fosfatidezuur bij de regulatie van het mTORC1-eiwit en daarmee ook de eiwitsynthese. Doordat het slechts in zeer geringe hoeveelheden in de voeding voorkomt, is suppletie nodig om aan een dosering te komen die mogelijk ergogeen werkt. De gangbare dosering hierbij is 750 mg per dag, afkomstig van soja-afgeleid fosfatidezuur. Doordat er geen vergelijkend onderzoek verricht is naar het optimale tijdstip van inname, is het raadzaam om trouw te blijven aan de tijdstippen die het vaakst in het klinisch onderzoek werden gebruikt. Op trainingsdagen wordt fosfatidezuur dertig tot zestig minuten voor de training ingenomen, en direct na de training. De dosering wordt hierbij gesplitst in 450 mg voor de training en 300 mg na de training, om zo op een totale inname van 750 mg uit te komen. Op rustdagen wordt 450 mg ingenomen bij het ontbijt en 300 mg bij het avondeten. Doordat fosfatidezuur na inname eerst wordt bewerkt, waarna het in de enterocyten weer opnieuw wordt veresterd tot fosfatidezuur (zoals besproken in sectie 10.1.2), kan het zijn dat de samenstelling van de maaltijd waarmee het wordt ingenomen invloed heeft op de effectiviteit. Vooral nog is hier echter geen onderzoek naar uitgevoerd. Op basis van het gegeven dat met name het fosfatidezuur veresterd met onverzadigde vetzuren effectief is, is het wellicht nuttig om gelijktijdige inname met verzadigde vetzuren te mijden.

11. Trimethylglycine

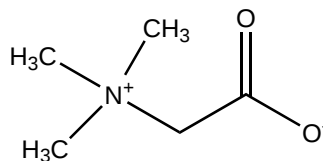
11.1 Inleiding

Trimethylglycine (TMG) is een methyl derivaat van het aminozuur glycine. TMG werd voor het eerst gevonden in het sap van de suikerbiet (*Beta vulgaris*) waar het zijn alternatieve benaming betaine aan heeft te danken. Ook komt TMG voor in dieren, planten en micro-organismen. Met name schaaldieren – ongewervelde zeediertjes in het bijzonder –, tarwekiemen of -zemelen en spinazie zijn rijk aan TMG [105].

Het supplement won aan populariteit nadat een studie uit 2013 aantoonde dat het de lichaamscompositie, armgrootte en bankdrukwerkcapaciteit significant verbeterde in mannen die al ervaring hadden met krachttraining [95].

De werking van het supplement wordt toegeschreven aan twee werkingsmechanismen. Zo kan TMG fungeren als osmolyt in de cel. Osmolyten zijn nauw betrokken bij de regulatie van de osmotische druk in een cel, en bijgevolg de vochthuishouding. Dit effect is het gevolg van osmose, waarbij water diffundeert van buiten de cel naar binnen de cel (waar de concentratie van de osmolyt hoger is). Osmose wordt nader toegelicht in kader 11.1.

TMG accumuleert in bijna alle weefsels om het celvolume te reguleren en wordt beschouwd als een van de belangrijkste organische osmolyten [272]. TMG waarborgt



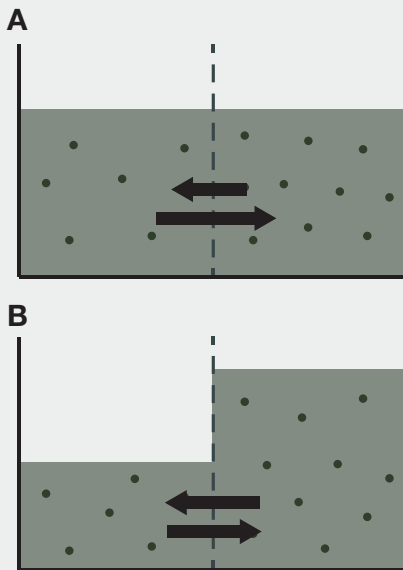
Figuur 11.1: Structuurformule van trimethylglycine. Het molecuul is een zwitterion, aangezien het beschikt over zowel een negatieve lading (de carboxylgroep) als een positieve lading (het quaternair ammoniumkation).

dus de vochthuishouding van de cellen. Daarnaast fungeert TMG als methyl donor: het voedt een biochemisch proces genaamd transmethylering. Hierbij wordt een methylgroep van TMG doorgegeven aan een ander molecuul. Methyleringsreacties zijn belangrijk voor talloze cellulaire reacties en daarom is het belangrijk dat er voldoende methylgroepen aanwezig zijn om deze reacties te voeden. In het bijzonder fungeert TMG als methyl donor voor de hermethylering van homocysteïne, wat zorgt voor de vorming van methionine. TMG-suppletie is dan ook effectief in het verlagen van de serumhomocysteïneconcentratie [308]. Een hoge serumhomocysteïneconcentratie wordt gezien als een onafhankelijke risicofactor voor cardiovasculaire aandoeningen. Het directe effect van TMG-suppletie op het risico van cardiovasculaire aandoeningen is momenteel echter onbekend [369]. Ook laat een recente meta-analyse een associatie zien tussen TMG-inname en kankerincidentie [430]. Een hogere inname zou hier een beschermend effect op hebben.

Kader 11.1



Osmose is een verschijnsel dat centraal staat in de werking van osmolyten, zoals TMG. Het is in principe een vorm van passief transport, zoals beschreven in sectie 3.2.1. Het zijn echter geen in water opgeloste moleculen die langs de membraan diffunderen, maar de watermoleculen zelf. Wanneer er een semipermeabele membraan aanwezig is, die wel water doorlaat, maar niet (een selectie van) de daarin opgeloste deeltjes, dan kan er osmose optreden als er een concentratieverschil is tussen weerszijden van de membraan van deze deeltjes. Dit gegeven is gevisualiseerd in onderstaande afbeelding.



Door de thermische beweging komen er continu deeltjes, zowel de niet-doorlaatbare deeltjes als de waterdeeltjes, in aanraking met de membraan. Wanneer er aan één van de twee zijdes meer niet-doorlaatbare deeltjes aanwezig zijn dan aan de andere zijde, dan komen er minder waterdeeltjes in aanraking met de membraan ten opzichte van de andere zijde. Dit leidt ertoe dat er netto dus meer waterdeeltjes van de ene kant naar de andere kant stromen. Water gaat dus van een verdunde oplossing (lage concentratie opgeloste stof) naar een geconcentreerde oplossing (hoge concentratie opgeloste stof).

In de afbeelding is er bij A een hogere concentratie opgeloste stof aan de rechterzijde dan aan de linkerzijde. Netto zal er dus een watermoleculenstroom zijn van links naar rechts. Echter, doordat er dan meer water bijkomt aan de andere zijde van de membraan, ontstaat er ook een osmotisch drukverschil doordat er meer vloeistof 'drukt' op de membraan (niet afgebeeld). Doordat er water van een lage concentratie-oplossing naar een hogere concentratie-oplossing stroomt zal het concentratieverschil steeds kleiner worden en door het toegenomen vloeistofvolume aan de andere zijde zal ook de osmotische druk aan die zijde toenemen. Uiteindelijk zal er een evenwicht ontstaan waarbij er netto geen waterdeeltjesstroom meer plaatsvindt langs de membraan, zoals weergegeven bij B in de afbeelding. De osmotische druk kan berekend worden aan de hand van de Van 't Hoff-vergelijking, maar zal hier verder niet behandeld worden.

Door actief de concentratie van een osmolyt in een cel te reguleren, kan een cel slim gebruikmaken van osmose. Water 'volgt' immers de hoogste concentratie van het osmolyt, wat bij accumulatie in een cel zorgt voor het 'aanzuigen' van water door een cel en vice versa.

Product	Hoeveelheid TMG (in mg/100 g)
Tarwezemelen	1506
Spinazie, gekookt	725
Spinazie, rauw	675
Bieten, ingeblikt	334
Garnalen, ingeblikt	246
Witbrood	105
Zoete aardappels	35
Bier	10
Geroosterde kip	6
Rijst	<1

Tabel 11.1: Hoeveelheden TMG aanwezig in enkele voedingsmiddelen. Data overgenomen uit [498].

11.1.1 Biosynthese

TMG wordt aangemaakt in het menselijk lichaam door de lever en nieren. Hiervoor is choline benodigd, dat verkregen kan worden uit de voeding of gevormd kan worden uit het aminozuur serine. In de voeding vindt men choline in vrije vorm slechts in kleine hoeveelheden. De grootste bijdrage van choline uit de voeding wordt dan ook geleverd door de fosfolipide fosfatidylcholine (lecithine), waarbij choline het hoofd van de fosfolipide vormt. Door twee opeenvolgende oxidatiereacties kan TMG gevormd worden uit choline. Eerst wordt choline geoxideerd door het enzym choline dehydrogenase, waardoor betaïne aldehyde ontstaat. Hierna wordt betaïne aldehyde geoxideerd tot TMG door het enzym betaïne aldehyde dehydrogenase. Beide reacties vinden plaats in de mitochondria en waarschijnlijk vormt het cholinetransport door de cholinetransporter in de mitochondria de fluxregulerende stap [336].

11.1.2 Absorptie

TMG wordt oraal gesuppleerd, vaak in de vorm van capsules, maar soms ook als poeder opgelost in water. Daarnaast komt het voor in verschillende voedingsbronnen, met name vis en schaaldieren – ongewervelde zeediertjes in het bijzonder –, tarwekiemen of -zemelen en spinazie [105]. De dagelijkse TMG-inname wordt geschat op 100-300 mg [278]. Na inname wordt TMG snel geabsorbeerd met een piekconcentratie in het bloed ongeveer één à twee uur na inname [410, 25]. TMG uit voeding wordt iets trager geabsorbeerd, maar de biologische beschikbaarheid van TMG in supplementvorm en uit voeding is gelijk [25]. Het transport wordt verzorgd door Na^+ - en Cl^- -afhankelijk secundair transport (beschreven in sectie 3.2.2), alsook Na^+ -onafhankelijk passief transport (beschreven in sectie 3.2.1) [105, 254]. Waarschijnlijk zijn met name het betaine γ -aminoboterzuurtransport- en aminozuurtransportsysteem A verantwoordelijk voor het transport, al is er op het moment van schrijven weinig bekend of het transport langs het sarcolemma.

Nier- en levercellen accumuleren TMG in reactie op hyperosmotische inkrimping van een cel, en laten TMG vrij bij hypo-osmotische celzwellings [258]. Hierbij staat duidelijk de rol van TMG als organisch osmolyt centraal. Het nauw geregelde transport van TMG langs de celmembraan geeft de cel een middel om in te spelen op veranderingen van het celvolume. Dit is vooral belangrijk voor de nieren, die door hun filtrerende functie van het bloed te maken hebben met een grote osmotische druk. Het moet echter worden opgemerkt dat de rol van TMG als osmolyt voor de lever, bij gezonde personen, van veel minder belang is dan voor de nieren. De lever kent weinig variabiliteit in de osmotische druk, waardoor het niet aannemelijk is dat TMG *in vivo* actief wordt gereguleerd in de lever om osmotische drukveranderingen op te vangen. In de lever lijkt dan ook vooral de rol van TMG als methyl donor belangrijk, geheel in lijn met de metabole functie van de lever.

De TMG-plasmaconcentratie vertoont sterke interindividuele variabiliteit en genderverschillen. In vrouwen is de concentratie circa 20–60 $\mu\text{mol/l}$ en in mannen 25–75 $\mu\text{mol/l}$ [278]. In een kleinschalige studie met 8 mannen werd een maximale stijging van 52 $\mu\text{mol/l}$ in gemeten na inname van 500 mg TMG [25]. Bij inname van 517 mg TMG uit voeding werd een maximale stijging van 39 $\mu\text{mol/l}$ gemeten. De TMG-serumconcentratie vertoont ook een dosisafhankelijk effect die lineair loopt bij dosissen van 1, 3 en 6 g [409].

11.1.3 Metabolisme en excretie

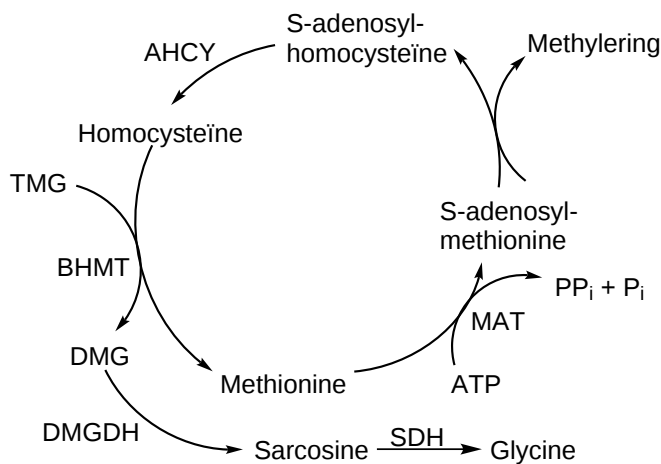
TMG kent een hoge biologische beschikbaarheid. Slechts een klein gedeelte wordt uiteindelijk door de nieren geklaard en in de urine teruggevonden [410]. Het suppleren van TMG leidt tot een kortdurende lichte stijging van TMG in de urine, maar na twee weken suppleren verdwijnt deze stijging [278].

TMG kan ook verloren gaan door zweten. In een kleinschalige studie werden TMG-concentraties in zweet gevonden die circa zeven maal hoger waren dan in het plasma ($232 \pm 84 \mu\text{mol/l}$ vs $34 \pm 11 \mu\text{mol/l}$) [106]. Met een molaire massa van 117 g/mol komt dit neer op een verlies van 27 mg TMG per liter zweet. Onder normale omstandigheden zal dit verlies een klein deel vormen van de totale TMG-inname. Echter, bij sporters, en zeker onder warme omstandigheden, kunnen er grote hoeveelheden TMG verloren gaan via het zweet. Zo zijn er zweetverliezen van acht tot tien liter per dag gerapporteerd in professionele en universitaire American football-spelers [168]. Bij de meeste recreatieve vormen van sport wordt aanzienlijk minder vocht verloren door zweten.

Het overgrote deel van TMG wordt echter gemetaboliseerd. TMG wordt omgezet naar dimethylglycine (DMG) door het enzym betaine homocysteïnemethyltransferase (BHMT).

Hierbij wordt een methylgroep van TMG overgedragen aan homocysteïne dat zo methionine vormt. Het enzym is te vinden in de lever en nieren [431]. De twee producten van de door BHMT-gekatalyzeerde reactie (methionine [12] en DMG [151]) remmen de activiteit van het enzym; dit is een vorm van feedbackinhibitie. DMG remt de BHMT-activiteit het sterkst van de twee.

DMG wordt vervolgens verder gemetaboliseerd in de mitochondria door dimethylglycinedehydrogenase (DMGDH). Hierbij ontstaat sarcosine, dat vervolgens wordt omgezet tot glycine door sarcosinedehydrogenase (SDH). Bij beide reacties fungeert tetrahydrofolaat als koolstofacceptor, waardoor deze 5,10-methyleentetrahydrofolaat vormt. Deze laatste draagt een formaldehydegroep die gebruikt kan worden voor de pyrimidinesynthese (cytosine, thymine en uracil, bouwblokken van DNA en RNA).



Figuur 11.2: De methioninecyclus. Een methylgroep van TMG wordt overgedragen aan homocysteïne, waardoor methionine en DMG worden gevormd. Deze reactie wordt gekatalyzeerd door het enzym BHMT. DMG kan verder worden gemetaboliseerd tot sarcosine, gekatalyzeerd door DMGDH. Aansluitend kan vanuit het sarcosine glycine gevormd worden door SDH. Het gevormde methionine kan geactiveerd worden tot SAM. Deze reactie wordt gekatalyzeerd door MAT en hierbij wordt een ATP-molecuul benut. De drie fosfaatgroepen worden hierbij van het ATP-molecuul afgesplitst. Het gevormde SAM kan vervolgens gebruikt worden als methyl donor voor tal van cellulaire reacties. Wanneer SAM een methylgroep afdraagt wordt S-adenosylhomocysteïne gevormd, dit molecuul wordt verder gesplitst in homocysteïne en adenosine (niet weergegeven) door het enzym AHCY. Afkortingen: TMG, trimethylglycine; DMG, dimethylglycine; BHMT, betaïnehomocysteïnemethyltransferase; DMGDH, dimethylglycinedehydrogenase; SDH, sarcosinedehydrogenase; MAT, methionine-adenosyltransferase; ATP, adenosinetrifosfaat; PP_i, pyrofosfaatgroep; P_i, fosfaatgroep; AHCY, S-adenosylhomocysteïnehydrolase.

11.2 Werkingsmechanisme

Er wordt aangenomen dat het positieve effect van TMG op de lichaamscompositie onder meer het gevolg is van de rol hiervan als osmolyt en methyl donor. Zo zou enerzijds

de accumulatie van TMG in de spiercellen leiden tot het zwellen van de cellen door de daaruit volgende osmose. Deze zwelling van de spiercel zou een anabool signaal vormen dat de eiwitsynthese stimuleert. Anderzijds zou TMG als methyl donor een positieve invloed hebben op biochemische processen die uiteindelijk de spiergroei zouden stimuleren. Bovendien zouden enkele chemische eigenschappen waarover TMG beschikt, door toedoen van de trimethylstikstofgroep, een rol spelen.

Het moet echter worden benadrukt dat de kwantitatieve bijdrage van elk van deze mechanismen niet bekend is, en dat het vooralsnog grotendeels onduidelijk is welke mechanismen daadwerkelijk een rol spelen *in vivo*.

11.2.1 Bevordering glycolyse

De glycolyse (zie sectie 2.3), het biochemische proces waarbij glucose wordt gesplitst in twee moleculen pyruvaat en zo ATP genereert, speelt een belangrijke rol bij zowel relatief korte intense inspanningen als bij duursport. Voor de glycolyse is de elektronen-drager NAD^+ vereist als oxidant (elektronenacceptor), waarbij het gereduceerd wordt tot NADH. Naast de beschikbaarheid van de andere substraten voor de glycolyse, namelijk glucose, ADP en P_i , bepaalt dus ook de ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ de mate waarin dit proces kan plaatsvinden (zie ook reactie 2.3).

Het is gehypothetiseerd dat moleculen die beschikken over een elektrofile methylgroep (EMG) het nucleofiele waterstofion (H^-) van NADH aantrekken, waardoor weer NAD^+ ontstaat [162]. Gezien TMG over een EMG beschikt, zou deze dus ook het nucleofiele waterstofion van NADH kunnen aantrekken. Hierbij ontstaan NADH, DMG en methaan [94].

Het pyruvaat dat gevormd is door de glycolyse kan vervolgens verder geoxideerd worden in de mitochondria, of gereduceerd worden tot lactaat of getransamineerd tot alanine in het cytosol (zie ook sectie 2.3.1).

In een klinische studie werd het effect van TMG-suppletie op hardloopprestaties gemeten in getrainde afstandlopers [20]. De proefpersonen werden gedehydrateerd (-2.7% van totale lichaamsgewicht), waarna ze 1 liter vocht (6% koolhydraten) kregen om te rehydrateren (tot -1.4% van totale lichaamsgewicht). De proefpersonen kregen deze drank met of zonder 5 g TMG voordat zij 75 minuten op de loopband moesten rennen (65% VO_2max) gevolgd door een sprint tot uitputting (84% VO_2max). Zowel tijdens het rennen, als direct na het sprinten, werd de plasmalactaatconcentratie bepaald. Tijdens het rennen op de loopband was er geen verschil tussen beide groepen in de plasmalactaatconcentratie. Direct na de sprint was de plasmalactaatconcentratie echter significant hoger in de groep die TMG toegediend kreeg. Dit kan duiden op een verhoogde glycolyse, maar ook op een verhoogde klaring uit de spiercel, dan wel een verlaagde klaring door organen zoals de lever.

Een ander onderzoek, waarbij twaalf mannen werden onderworpen aan een hoge intensiteit trainingsprogramma, met onder andere oefeningen als bankdrukken, squatsprongen en kniebuigen, werd geen verhoogde plasmalactaatconcentratie gevonden bij de proefpersonen die TMG toegediend kregen [276]. Dit verschil met de andere studie zou kunnen komen door de verschillen in intensiteit en duratie van het trainingsprogramma, alsook de hydratiestatus van de proefpersonen tussen beide studies. In het geval van dit laatste zou dit betekenen dat (met name) de rol als osmolyt van TMG centraal staat bij het effect op de plasmalactaatconcentratie na inspanning en mogelijk de glycolyse.

Weer een andere studie liet echter een iets kleinere stijging in de plasmalactaatcon-

concentratie zien door TMG-suppletie ten opzichte van placebo [446]. In dit onderzoek werd de plasmalactaatconcentratie voor en na het uitvoeren van tien sets bankdrukken op een machine tot falen bepaald. Ook werd er een iets grotere absolute daling van de zuurstofsaturatie in de spier gemeten in de TMG-groep. Samengenomen suggereert dit juist dat er een verschuiving van energielevering plaatsvindt naar de oxidatieve weg. Het is onduidelijk waardoor deze verschillen tussen de studies komen.

11.2.2 Creatinesynthese

Creatine wordt in het menselijk lichaam gesynthetiseerd uit de twee aminozuren glycine en arginine (zie sectie 8.1.1). Deze synthese gebeurt in twee stappen, waarbij bij de laatste stap een methylgroep wordt overgedragen van S-adenosylmethionine (SAM) aan guanidinoazijnzuur en zo creatine en S-adenosylhomocysteïne worden gevormd. SAM vormt zodoende de methyl donor in deze reactie en methionine wordt geactiveerd tot SAM met behulp van ATP. Doordat TMG als methyl donor fungeert voor de remethylering van homocysteïne tot methionine, dat zodoende weer SAM kan vormen, is gehypothetiseerd dat het mogelijk de creatinesynthese stimuleert. Ook liet onderzoek bij vleeskuikens een stijging van het creatinegehalte in de lever zien bij een dieet met toegevoegd TMG [500]. Klinisch onderzoek vond echter geen stijging in het spiercreatinefosfaatgehalte na tien dagen TMG-suppletie (2 g per dag) [118].

11.2.3 Eiwitstabilisator

Eiwitten bestaan uit een reeks aminozuren die met elkaar verbonden zijn door peptidebindingen. Deze eiwitten vouwen zich op tot een bepaalde ruimtelijke structuur (conformatie) om een specifieke biologische functie te kunnen uitoefenen. Zo nemen enzymen een conformatie aan die ervoor zorgt dat een bepaalde chemische reactie enorm veel sneller verloopt (katalyse). Zo'n conformatie is het resultaat van de som van een heleboel zwakke interacties tussen de aminozuren onderling en de omgeving, zoals het cytosol in de cel dat voornamelijk uit water bestaat. Er zijn echter factoren die de conformatie van een eiwit kunnen veranderen, waardoor het eiwit zijn biologische functie verliest. Dit proces heet denaturatie, waarbij het eiwit zich ontvouwt tot een gedenameerde vorm. Denaturatie van een eiwit kan optreden door een temperatuurstijging (Eng.: *heat-shock*), maar ook door chemische denaturanten zoals natriumdodecylsulfaat (SDS), dat wordt toegepast om eiwitten voor te behandelen voor elektroforese (zie kader 1.4) en ureum, een product van het aminozuurmetabolisme. Chemische denaturanten concurreren doorgaans met water voor het vormen van waterstofbruggen met polaire groepen op de eiwitten waardoor zij denatureren.

TMG beschermt het enzym citraatsynthase tegen denaturatie door een temperatuurstijging *in vitro* [78]. Eveneens bevordert het de renaturatie (het 'terugvouwen' naar de juiste conformatie na denaturatie) van citraatsynthase na ureumdenaturatie. Deze eiwitstabiliserende functie van TMG zou mogelijk de flux van de citroenzuurcyclus (zie sectie 2.4.1) kunnen handhaven onder omstandigheden waarbij een temperatuurstijging kan plaatsvinden of waarbij de spiercellen aan een verhoogde ureumconcentratie worden blootgesteld, zoals bij intense fysieke inspanning. Hierdoor zou het de sportprestaties onder deze omstandigheden kunnen bevorderen. Klinisch onderzoek om deze hypothese te ondersteunen ontbreekt echter, al is er wel een verhoogde VO_2 -consumptie gemeten tijdens een sprint tot uitputting na 75 minuten hardlopen op een loopband bij de proefpersonen van de eerder genoemde studie in sectie 11.2.1 [20]. Tevens belemmert ureum de ATPase-activiteit van

de myosinehoofden, een effect dat eveneens wordt tegengegaan door TMG [340].

11.2.4 Modulatie van genexpressie

Uit onderzoek blijkt dat TMG invloed kan uitoefenen op de expressie van enkele genen die betrokken zijn bij spiergroei. In een kleinschalige klinische studie kregen 12 proefpersonen 2.5 g TMG of een placebo toegediend [17]. De studie was opgezet als cross-over design, met een rustperiode (Eng.: *washout period*) van twee weken. De suppletieperiode duurde eveneens twee weken. Zowel voor als na de suppletieperiode werd een spierbipt afgenomen, bovendien werd na de suppletieperiode een extra spierbipt afgenomen nadat de proefpersonen getraind hadden. Totaal Akt, Akt-P (Ser473), S6K1 totaal, S6K1-P (Thr389) en AMPK-P (Thr172) werden bepaald.

Totaal Akt steeg significant in de TMG-groep ten opzichte van de placebogroep in rust. Er werd geen verschil gevonden in Akt-P en S6K1 in rust, maar wel vond men dat een daling van Akt-P en S6K1-P die plaatsvond na training in de placebogroep niet plaatsvond in de TMG-groep. Er werd geen verschil in AMPK-P gevonden tussen de placebogroep en TMG-groep.

Naast de blik op modulatie van genexpressie werd er ook bloed afgenomen om het effect van TMG-suppletie op onder meer circulerend groeihormoon (GH), insuline-achtige groeifactor-1 (IGF-1), insuline en cortisol te bepalen. TMG bleek geen effect te hebben op insuline, maar leidde tot een significante stijging van IGF-1, een trend tot stijging van GH ($P = 0.067$) en een significante daling van cortisol. Een *in vitro*-studie in C2C12-myoblasten (myoblasten van muizen) vond ook een stijging van insuline-achtige groeifactor-1-receptor (IGF-1R)-eiwit na incubatie met TMG [412]. Eveneens werden een stijging van Akt gevonden en van zware keten myosine (MHC, Eng.: *myosin heavy chain*), het eiwit dat het dikke filament van de sarcomeren vormt (zie sectie 1.2). De stijging van IGF-1 in de circulatie na TMG-suppletie, alsook de stijging van IGF-1R gevonden in C2C12-myoblasten na incubatie met TMG, maken het IGF-1-reactiepad een kandidaat voor het effect op de fosforyleringsstatus van Akt (zie sectie 4.2.1).

11.3 Klinische resultaten

Enkele klinische studies hebben gekeken naar het effect van TMG-suppletie op onder meer variabelen als kracht, vermogen, trainingsvolume en de lichaamscompositie. Het merendeel van deze studies kent echter een korte suppletieperiode variërend van tien tot vijftien dagen [216, 276, 215, 446, 118]. De suppletieperiode in de recent gepubliceerde studie door Cholewa e.a. was in totaal zes weken [95].

Aan een dubbelblind placebogecontroleerd onderzoek uitgevoerd door Hoffman e.a. deden 24 jongemannen mee [216]. De jongemannen waren recreationeel actief met minimaal 3 maanden ervaring met krachtraining. De TMG-groep kreeg 2.5 g per dag, en de suppletieperiode bedroeg 15 dagen. Naast de nulmeting werden er metingen verricht op dag 7 en 8 (T2), en dag 14 en 15 (T3) van de suppletieperiode. De onderzoekers waren in het bijzonder geïnteresseerd in het effect van TMG-suppletie op spiervermogen (Eng.: *muscle power*) en -uithoudingsvermogen. Voor het meten van het spiervermogen van het bovenlichaam werd de bankdrukgooi (Eng.: *bench press throw*) toegepast en voor het onderlichaam de verticale sprong. Op geen van de meetmomenten werd een significant verschil gevonden tussen de groepen voor het spiervermogen van zowel het onder- of bovenlichaam. Het uithoudingsvermogen werd bepaald door het aantal herhalingen

bankdrukken en squatten (beide met 75% 1-RM [1-herhalingsmaximum]) tot uitputting. Er werden geen verschillen gevonden tussen de groepen voor het bankdrukken, wel was het aantal herhalingen squatten significant hoger in de TMG-groep ten opzichte van de placebogroep op T2. Wanneer er werd gekeken naar het totaal aantal herhalingen was er ook een trend ($P = 0.06$) detecteerbaar in het voordeel van de TMG-groep op T3. Tot slot werd er geen effect op spierpijn (Eng.: *muscle soreness*) gevonden. Samenvattend suggeren deze studieresultaten een positief effect op het spieruithoudingsvermogen van het onderlichaam. Een latere kleinschalige studie van dezelfde onderzoeksgroep testte het effect op de isokinetische kracht van het bovenlichaam [215]. Hierbij werd geen effect gevonden.

Zeer vergelijkbaar met deze eerste studie van Hoffman e.a. was het onderzoek van Lee e.a. [276]. Ook in dit onderzoek kregen mannen met enige krachttrainingervaring twee weken TMG (2.5 g dagelijks) gesuppleerd of een placebo. De isometrische bankdrukkracht en bankdrukgooiervermogen waren na de interventie significant hoger in de TMG-groep ten opzichte van de placebogroep. De isometrische squatkracht was na de interventie hoger in de TMG-groep dan ervoor. In de placebogroep werd dit effect niet gezien. Ook verbeterde de TMG-groep de verticale sprong in twee van de vier sets. Enkele andere uitkomstmaten, zoals de squatsprong en aantal squat- en bankdrukherhalingen tot uitputting, toonden geen verschillen. Dit lijkt in strijd met de resultaten van Hoffman e.a. Zij toonden wel een verbetering van het spieruithoudingsvermogen van het onderlichaam. Een verschil tussen beide studies is dat bij Hoffman e.a. de proefpersonen squatten met een intensiteit van 75% 1-RM. In het onderzoek van Lee e.a. werd gesquat met een hogere intensiteit, namelijk 85% 1-RM. Bovendien was het aantal proefpersonen in dit onderzoek een stuk kleiner (in totaal slechts twaalf). Dat maakt een type II-fout niet ondenkbaar.

Aan een onderzoek van Trepanowski e.a. deden 13 mannen mee met krachttrainingervaring [446]. De studie was dubbelblind en cross-over van opzet, met een rustperiode (Eng.: *wash-out period*) van 21 dagen. De proefpersonen kregen hierbij eveneens dagelijks 2.5 g TMG gesuppleerd gedurende 2 weken. Net als bij eerder onderzoek werd het spiervermogen van het onder- (verticale sprong) en bovenlichaam (bankdrukgooi) bepaald. Ook werd de maximaal isometrische kracht van het onder- (leg press) en bovenlichaam (bankdrukken) getest. Het spieruithoudingsvermogen werd bepaald door het uitvoeren van tien sets liggend bankdrukken op een machine. Na deze tien sets werd ook de zuurstofsaturatie van de schouder spier gemeten. Men dacht namelijk dat TMG mogelijk de bloedtoevoer naar de spieren verbeterde. Dit zou je dan terug kunnen zien in een verbeterde zuurstofsaturatie van de spier na inspanning. Met een herhaalde metingenvariantieanalyse werd geen enkel significant resultaat gevonden. Wel werd er een significante verbetering gevonden in het totaal aantal herhalingen bankdrukken na TMG-suppletie ten opzichte van vóór suppletie (gepaarde t-toets). Dit resultaat werd niet gevonden in de placebogroep. Dit suggereert een verbeterd spieruithoudingsvermogen. De zuurstofsaturatie was voor aanvang van de spieruithoudingstest iets hoger na TMG-suppletie. Dit leidde ook tot een groter verschil in de zuurstofsaturatie tussen voor en na de spieruithoudingstest (Δ zuurstofsaturatie). De kleine steekproefgrootte kan wederom een rol gespeeld hebben bij het gebrek aan statistisch significante resultaten van de variatieanalyse.

De meest interessante klinische studie tot op heden is uitgevoerd door Cholewa e.a. [95]. Deze studie verschilde op twee belangrijke punten van de eerdere studies. Zo was de suppletieduur ditmaal zes weken, in plaats van twee. Daarnaast waren de deelnemers mannen met ruime krachttrainingervaring (gemiddeld bijna vijf jaar). Zo moesten ze min-

stens 1-maal hun lichaamsgewicht kunnen bankdrukken en 1.25-maal hun lichaamsgewicht kunnen squatten. Tijdens de zes weken durende suppletieperiode werd een niet-lineair geperiodiseerd krachttrainingsprogramma gehanteerd. Dit programma was opgesplitst in drie microcycli van twee weken. Na iedere microcyclus werden metingen verricht. Na zowel de eerste als de derde microcyclus werd een significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden voor het bankdruktrainingsvolume. Deze steeg meer in de TMG-groep. Opmerkelijk genoeg werd er ook een significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden voor de tweede microcyclus, alleen ditmaal steeg het volume meer in de placebogroep. Het is onduidelijk waardoor dit komt. Ook voor het squattrainingsvolume waren de resultaten niet eenduidig. De placebogroep deed het beter na de eerste microcyclus, en de TMG-groep deed het weer beter na de derde microcyclus. Er werd tevens een trend gevonden voor een betere verticale sprong in de TMG-groep vergeleken met de placebogroep. Er werden geen significante groep $\times$ tijd-interacties gevonden voor kracht van het bovenlichaam (1-RM bankdrukken) en onderlichaam (1-RM squatten). De wisselende resultaten tussen de verschillende microcycli maakt het moeilijk om hieruit conclusies te trekken. Het zou kunnen dat TMG het werkvolume en spiercapaciteit verbeterde. In elk geval leek het geen effect te hebben op maximale krachtinspanningen.

Naast de inspanningsvariabelen werd ook de lichaamscompositie bepaald. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een huidcaliper. Het lichaamsvetpercentage en de vetmassa namen significant af in de TMG-groep post-interventie ten opzichte van pre-interventie (respectievelijk -3.2% en -2.9 kg), maar dit werd niet gezien in de placebogroep (respectievelijk +0.2% en +0.3 kg). Ook nam de magere lichaamsmassa (LBM, Eng.: *lean body mass*) significant toe in de TMG-groep post-interventie versus pre-interventie (+2.4 kg), maar niet in de placebogroep (+0.3 kg). De dwarsdoorsnede van het dijbeen en de bovenarm werden ook bepaald. Voor beide waren er geen verschillen tussen de groepen. Wel werd er een significante stijging van de dwarsdoorsnede van de bovenarm gevonden in de TMG-groep post-interventie versus pre-interventie. Deze resultaten doen vermoeden dat TMG-suppletie de potentie heeft om de lichaamscompositie te verbeteren. Dit zou in elk geval in lijn liggen met enkele dierstudies, waaruit is gebleken dat TMG-suppletie inderdaad de vetmassa doet afnemen en de spiermassa doet toenemen [299, 226, 225].

11.4 Veiligheid

TMG komt in kleine hoeveelheden (enkele honderden milligrammen) voor in de voeding. Deze hoeveelheden worden niet alleen als veilig, maar zelfs als gezond en wenselijk beschouwd. Dit berust op enkele studies die een associatie vinden tussen TMG-inname en aspecten van de gezondheid. Zo suggereren epidemiologische studies dat choline- en TMG-inname het risico op kanker verkleinen [430]. Een andere studie laat een negatieve correlatie zien tussen de choline- en TMG-inname, en indicatoren van obesitas waaronder het totale vetpercentage [157]. Weliswaar is er geen correlatie gevonden tussen de choline- en TMG-inname en de incidentie van cardiovasculaire ziekten [369, 325], maar wel is er een negatieve correlatie gevonden met risicofactoren van cardiovasculaire ziekten [369]. Ook zijn de choline- en TMG-inname geassocieerd met een lagere insulineresistentie in een cohort van gezonde volwassenen [158]. Hierbij was het effect sterker aanwezig bij vrouwen dan bij mannen.

Therapeutisch wordt TMG-suppletie al enkele decennia gebruikt voor de behandeling van homocystinurie. Bij homocystinurie is het methioninemetabolisme aangetast. Voor

de behandeling van homocystinurie wordt een dosering gebruikt van 3 g tweemaal per dag (voor volwassenen). Deze dosering ligt hoger dan gebruikt wordt door atleten en wordt goed verdragen. Een bijwerking die hierbij relatief vaak voorkomt zijn maag- en darmklachten. Het splitsen van een dosis over meerdere innamemomenten zou hier misschien bij kunnen helpen.

Opmerkelijk genoeg zijn er enkele casussen bekend in de literatuur waarbij TMG-suppletie bij homocystinuriepatiënten zou hebben geleid tot hersenoedeem [490, 125]. Een werkingsmechanisme voor deze mogelijk zeer zelden voorkomende bijwerking is niet bekend. Men vermoedt echter dat het hersenoedeem in deze zeldzame gevallen gerelateerd was aan het verstoorde methioninemetabolisme bij deze patiënten.

Er zijn ook enkele klinische studies uitgevoerd om het effect van TMG-suppletie bij enkele leveraandoeningen te bepalen. In een gerandomiseerd placebogecontroleerd onderzoek werd 20 g TMG per dag ingenomen door patiënten met niet-alcoholische leververvetting (NAFLD, Eng.: *non-alcoholic fatty liver disease*) [2]. De studie liep één jaar en enkele patiënten bleken last te krijgen van maag- en darmklachten. Er werden geen verdere bijwerkingen opgemerkt bij deze (zeer) hoge dosering. Ook in een andere (kleinschalige) studie werden geen bijwerkingen gevonden na een jaar suppletie van 20 g TMG per dag bij patiënten met niet-alcoholische steatohepatitis [1].

In de eerder behandelde klinische studies (sectie 11.3), met een dosering van 2.5 g per dag, werden geen bijwerkingen vermeld. Een dosering van 2.5 g per dag wordt dan ook zonder meer als veilig beschouwd in de literatuur.

11.5 Conclusie

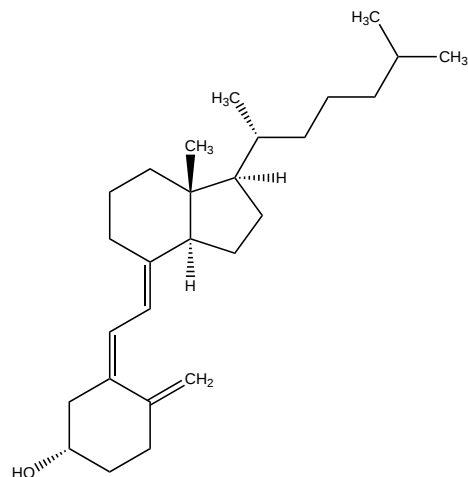
Klinische studies suggereren dat TMG-suppletie misschien de lichaamscompositie en de prestaties bij krachtintensieve oefeningen kan verbeteren. Het precieze mechanisme hiervoor is onduidelijk. Mogelijk heeft TMG invloed op de glycolyse, de expressie van enkele genen betrokken bij spiergroei, en de stabiliteit van eiwitten die betrokken zijn bij het energiemetabolisme. Bekend is in ieder geval dat TMG fungeert als methyl donor voor de hermethylering van homocysteïne. Daarnaast wordt het gerekend onder een van de belangrijkste organische osmolyten.

De dosering die gebruikt wordt voor het ergogene effect is 2.5 g per dag. Deze dosering wordt als veilig beschouwd en wordt goed getolereerd. Het is mogelijk dat sommige mensen maag- of darmklachten ervaren door TMG-suppletie; het splitsen van een dosis over de dag zou hierbij wellicht uitkomst kunnen bieden. Hoewel TMG ook voorkomt in de voeding is het niet realistisch om een dergelijke hoeveelheid uit de voeding te halen. De hoeveelheid TMG in de voeding is namelijk vrij beperkt en de normale dagelijkse inname wordt geschat op 100–300 mg.

12. Vitamine D

12.1 Inleiding

In de jaren dertig van de vorige eeuw waren de voordelen van blootstelling aan UV-straling voor sporters goed bekend onder Duitse onderzoekers [80]. Ook Russische onderzoekers rapporteerden in 1938 al dat UV-bestraling de snelheid op de honderd meter verbeterde bij een klein groepje studenten [175]. Er werd een snelheidsverbetering van 1.7% gezien in de controlegroep en een verbetering van 7.4% in de UV-groep. Het zou tot 1952 duren voordat er werd geconcludeerd dat deze effecten door vitamine D zouden komen. De Duitse professor Hans Eric Ronge vermeldde: *'...the production of vitamin D (or of a related steroid) explains the success of UV-radiation with regards to physical performance...'* [388]. Tevens gaat een (ernstige) vitamine D-deficiëntie gepaard met proximale myopathie (spierzwakte van de proximale spieren) en myalgie (spierpijn).



Figuur 12.1: Structuurformule van vitamine D₃ (cholecalciferol).

Vitamine D kan worden aangemaakt door het menselijk lichaam onder invloed van UV-straling en komt ook voor in de voeding. Van nature komt het niet in veel voedingsmiddelen voor. Uitzonderingen hierop zijn vette vissoorten, zoals zalm, makreel en haring [218]. Desalniettemin zijn de hoeveelheden in de reguliere dagelijkse voeding vrij beperkt. Een deficiëntie van de vitamine kwam vroeger dan ook geregeld voor in de wat meer noordelijk gelegen landen. Dit is dan ook de oorzaak van de zogeheten Engelse ziekte, ook wel bekend als rachitis, die skeletafwijkingen veroorzaakt bij kinderen doordat er onvoldoende botvorming plaatsvindt. Vitamine D is namelijk nauw betrokken bij de calciumhomeostase. De benaming van Engelse ziekte is te herleiden naar het negentiende-eeuwse Engeland. In deze periode werden kinderen vaak binnenshuis aan het werk gezet, waardoor zij nagenoeg niet werden blootgesteld aan zonlicht, in het toch al vrij regenachtige land. Als tegenmaatregel werd vitamine D toegevoegd aan veelgebruikte voedingsmiddelen, met name zuivelproducten zoals melk en margarine. Tegenwoordig wordt vitamine D nog steeds toegevoegd aan de voeding, in Nederland met name aan margarine en bak- en braadproducten.

12.1.1 Biosynthese

Vitamine D wordt nog weleens geen 'echte' vitamine genoemd, de mens kan het zelf immers aanmaken. De aanmaak van vitamine D vindt plaats in de huid door blootstelling aan UVB-straling. Hierbij wordt 7-dehydrocholesterol (7-DHC) gefotolyseerd tot previtamine D3. Bij dit proces breekt de B-ring van de steroïdkern open. De 7-DHC bevindt zich vooral in de epidermis, circa twee derde van het totale 7-DHC is daar te vinden, de resterende een derde is te vinden in de dermis [220].

Het gevormde previtamine D3 is vervolgens onderhevig aan thermo-isomerisatie, waarbij een *cis*-dubbele binding wordt omgezet in een *trans*-dubbele binding. Het product hiervan wordt vitamine D3 (cholecalciferol) genoemd.

Het gevormde vitamine D3 verlaat vervolgens de plasmamembranen van de huidcellen en bereikt de bloedbaan, waar het gebonden wordt door het vitamine D-bindingseiwit (DBP, Eng.: *vitamine D binding protein*). Vitamine D3 zelf is echter niet biologisch actief en dient nog geactiveerd te worden tot zijn biologisch actieve vorm. Via de bloedbaan bereikt het de lever, waar het vervolgens een hydroxylatiereactie ondergaat op positie C-25. Dit geeft 25(OH)D3 en wordt gekatalyseerd door verscheidene enzymen die toebehoren tot het cytochroom P450-enzymstelsel. Het enzym CYP2R1 speelt hierbij waarschijnlijk de belangrijkste rol [91]. 25(OH)D3 wordt vervolgens ook door DBP in de circulatie vervoerd om uiteindelijk bioactivatie te ondergaan in de nieren, waar het 1 α -gehydroxyleerd wordt tot het bioactieve hormoon 1,25(OH)₂D3. Het enzym verantwoordelijk voor deze hydroxylering is CYP27B1 (ook wel 1 α -hydroxylase genoemd) [43].

De mate waarmee de fotosynthese van previtamine D3 plaatsvindt is afhankelijk van verschillende factoren, zoals leeftijd, huidpigment, en de mate waarmee de huid wordt blootgesteld aan UVB-straling. Ouderen beschikken over een aanzienlijk lagere hoeveelheid 7-DHC in de huid [291], waardoor zij minder vitamine D3 synthetiseren na blootstelling aan zonlicht [221]. De meerderheid (50–80%) van de Nederlandse bejaarde bevolking is dan ook vitamine D-deficiënt bevonden [477]. Een vergelijkbaar beeld werd gevonden onder Nederlandse atleten [27]. Hiervan werd 34% deficiënt (< 50 nmol/l 25(OH)D) en 36% insufficiënt (50–75 nmol/l 25(OH)D) bevonden aan het einde van de winter. Ook vormt de huidskleur een belangrijke factor voor de mate waarin de fotosynthese van previtamine D3 plaatsvindt. De huidskleur wordt grotendeels bepaald

door de concentratie van het huidpigment melanine. Bij een hogere concentratie melanine is de huid donkerder dan bij een lagere. Doordat melanine in staat is UVB-straling te absorberen, wordt er minder 7-DHC gefotolyseerd tot previtamine D3 door deze straling. Negroïde personen maken hierdoor veel minder previtamine D3 aan [100]. Mogelijk zou dit ten dele het hoge percentage vitamine D-deficiënte allochtonen in Nederland kunnen verklaren [477]. Uiteraard is ook de mate waarmee de huid wordt blootgesteld aan UVB belangrijk. Dit wordt beïnvloed door het dragen van bedekkende kleding en hoe vaak en hoelang men buiten in de zon komt. Ook vermindert het gebruik van zonnebrand de vitamine D-synthese. Hoewel de toediening van zonnebrand de vitamine D-synthese bijna volledig kan remmen [297], valt dit in de praktijk mee. Des te dunner de laag zonnebrand die wordt opgebracht, des te meer vitamine D zal er gesynthetiseerd worden door blootstelling aan UVB-straling [149]. In de praktijk smeren mensen vaak een dunnere laag dan wordt aanbevolen, en ook herhalen ze het smeren niet vaak genoeg. Bovendien worden sommige plekken vrijwel niet ingesmeerd. Tot slot is het van oktober tot en met maart nagenoeg niet mogelijk om onder de Nederlandse zon previtamine D3 te synthetiseren [474]. Deze periode wordt ook wel 'vitamine D-winter' genoemd.

Vitamine D-status	Serum-25(OH)D-concentratie
Deficiënt	< 50 nmol/l
Insufficiënt	52.5-72.5 nmol/l
Adequaat	≥75 nmol/l

Tabel 12.1: Interpretatie van vitamine D-status. Gebaseerd op richtlijnen van de Endocrine Society [219]

De verdere bioactivatie van vitamine D3 tot 1,25(OH)₂D wordt vrijwel niet gereguleerd op het niveau van de eerste hydroxylatiereactie op positie C-25. Het serumniveau van 25(OH)D is dan ook een goede afspiegeling van de vitamine D-inname. De daaropvolgende α -georiënteerde hydroxylatiereactie op positie C-1 wordt echter wel gereguleerd. Hiervoor verantwoordelijk zijn de drie hormonen parathormoon (PTH), fibroblast groeifactor 23 (FGF23) en 1,25(OH)₂D zelf. PTH is een hormoon dat wordt afgegeven door de bijnieren en stimuleert onder andere de laatste hydroxyleringsstap benodigd voor de productie van 1,25(OH)₂D. De PTH-secretie wordt geregeld door het calciumgehalte in de circulatie. Een laag calciumgehalte stimuleert de secretie, terwijl een hoog calciumgehalte deze remt. FGF23 behoort tot de fosfatinen, een groep hormonen betrokken bij de fosfaathomeostase. In de nier remt FGF23 de activatie van 25(OH)D tot 1,25(OH)₂D en vormt zodoende dus een negatieve regulator.

12.1.2 Absorptie

Vitamine D vindt men in twee vormen in de voeding: vitamine D2 (ergocalciferol) en vitamine D3 (cholecalciferol). Vitamine D2 komt bijna niet voor in de voeding, met uitzondering van sommige paddenstoelsoorten, voedingssupplementen of voeding waaraan het is toegevoegd. Vitamine D3 daarentegen komt voor in meerdere producten van dierlijke oorsprong. Desalniettemin zijn de hoeveelheden vitamine D3 in deze producten vaak vrij gering. Het komt nog het meest voor in vette vissoorten, zoals zalm, makreel en haring [218]. De hoeveelheid die men daarin aantreft is circa 400-500 IE¹ per 100 g. Met de

¹ 1 internationale eenheid vitamine D is gelijk aan 0.025 microgram

huidige aanbeveling van eenmaal (vette) vis per week door het Voedingscentrum krijgt men dus vrij weinig vitamine D binnen vanuit de voeding. Daarbij komt nog dat de meeste Nederlanders deze aanbeveling niet weten te halen. En hoewel vitamine D ook mag worden toegevoegd aan bak- en braadproducten (300 IE/100 g), is dit in veel gevallen niet toereikend. Door de relatief lage visconsumptie vormen vet en vlees dan ook de grootste bron van vitamine D voor veel Nederlanders [459].

Wanneer vitamine D wordt ingenomen is dit doorgaans tezamen met vetten. Bij de vertering van vetten worden er gemengde micellen gevormd. Dit zijn heel kleine aggregaten van verschillende lipide moleculen, zoals fosfolipiden, vetzuren en cholesterol. Ook vitamine D wordt geïncorporeerd in deze micellen [372]. Daarnaast wordt er een fractie geïncorporeerd in lipide vesikels en mogelijk bindt het ook met enkele eiwitten. De opname vindt vervolgens plaats in de dunne darm, met name de ileum en jejunum [374]. De hoeveelheid die geabsorbeerd wordt is vastgesteld op circa 55% tot 99%, met een gemiddelde van 78% [374]. Deze opname vindt zowel passief plaats als transportergemedieerd [375]. De transporters die hierbij betrokken zijn, zijn cholesteroltransporters.

Het nemen van vitamine D tezamen met een vette maaltijd bevordert ook de opname [114]. Eenmaal in de enterocyten aangekomen wordt een groot gedeelte van de vitamine D verpakt in chylomicronen, en zo samen met de overige ingenomen lipiden via het lymfesysteem vervoerd voordat het in de circulatie terechtkomt [61]. De kleine hoeveelheid 25(OH)D in de voeding wordt echter niet verpakt in chylomicronen en arriveert in de lever via de poortader. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de hogere polariteit en daarmee oplosbaarheid in water van 25(OH)D. Doordat vitamine D via het lymfesysteem wordt vervoerd naar de circulatie, duurt het vrij lang voordat de serumpiekconcentratie wordt bereikt. Deze wordt in de regel ongeveer tien tot twaalf uur na inname geobserveerd [374].

Van de twee varianten vitamine D – vitamine D2 en vitamine D3 – is vitamine D3 het effectiefst in het verhogen van de serum-25(OH)D-concentratie [449]. De absorptie van beide lijkt echter vergelijkbaar te zijn, waardoor dit effect waarschijnlijk veroorzaakt wordt door verschillen in metabolisme of klaring tussen beide varianten [61].

12.1.3 Metabolisme en excretie

Voordat vitamine D biologische activiteit vertoont, ondergaat het bioactivatie. Deze bioactivatie komt tot stand door twee opeenvolgende hydroxyleringsreacties in de lever. Eerst vindt er hydroxylering plaats op positie C-25, waardoor 25(OH)D ontstaat. Verschillende enzymen van het cytochroom P450-enzymstelsel zijn hierbij betrokken, waaronder CYP27A1, CYP2J3, CYP2R1 en CYP3A4 [365]. Hiervan speelt CYP2R1 fysiologisch gezien waarschijnlijk de belangrijkste rol [91, 365, 7].

25(OH)D, gebonden aan DBP, belandt vervolgens bij de verschillende weefsels via de circulatie, waar het de laatste stap tot bioactivatie ondergaat: 1α -hydroxylering. Deze reactie wordt gekatalyseerd door het CYP27B1-enzym en hierdoor ontstaat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. De meeste $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ wordt gesynthetiseerd in de nieren en staat onder regulatie van PTH, FGF23 en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zelf. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ vormt de belangrijkste negatieve regulator van CYP27B1-activiteit. De activiteit wordt beïnvloed doordat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de expressie van het enzym down-reguleert. Dit effect wordt gemedieerd door binding van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aan de vitamine D-receptor (VDR) en daaropvolgende directe en indirecte interactie met vitamine D-resonselementen [453].

Ook ziet het er naar uit dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de expressie van FGF23 stimuleert [496]. FGF23 down-reguleert op zijn beurt weer CYP27B1-expressie, waardoor dit eveneens een

mechanisme is waarop $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zijn eigen synthese weet te beïnvloeden. FGF23 speelt een centrale rol in de fosfaathomeostase. De synthese en secretie van deze fosfatine wordt gestimuleerd door een verhoogd fosfaatiniveau, al is het mechanisme hiervoor onzeker.

Tot slot vormt PTH juist een stimulerende factor voor CYP27B1-activiteit. PTH wordt met name beïnvloed door de calciumconcentratie. Een lage calciumconcentratie stimuleert productie van het hormoon, terwijl een hoge deze remt. PTH stimuleert CYP27B1-expressie door in te werken op de promoterregio van het CYP27B1-gen [64]. Een lage fosfaat- of calciumconcentratie stimuleert dus CYP27B1-expressie via respectievelijk FGF23 en PTH.

CYP27B1 komt ook extrarenaal (buiten de nier) tot expressie in vele weefsels [206]. De regulatie van CYP27B1 in deze weefsels verschilt van die in de nier. Bovendien is CYP27B1-mRNA en -eiwit gevonden in C2C12-myoblasten en -myotubes [424]. Ook is CYP27B1-mRNA gevonden in het spierweefsel van mensen [6]. Ander onderzoek toonde eveneens CYP27B1-mRNA aan in C2C12-myoblasten en -myotubes, maar kon desondanks geen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -synthese aantonen [455]. De extrarenale synthese van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ draagt echter niet bij aan de serumconcentratie hiervan, met uitzondering in het geval van enkele ziektebeelden en zwangerschap [377].

Afbraak van $25(\text{OH})\text{D}$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ begint met hydroxylering op positie C-24 of C-23. De 24-hydroxylering is de eerste stap van een reeks van reacties die vitamine D omzetten in meer hydrofiele producten. Deze opeenvolgende reeks van reacties worden gekatalyseerd door het enzym CYP24A1. Het eindproduct van deze reactie, beginnend met 24-hydroxylering van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ is calcitriolschuur [376]. Dit eindproduct is goed oplosbaar in water, wordt vervolgens geklaard door de nieren en belandt zo in de urine.

Naast het metabole afbraakpad beginnend met 24-hydroxylering, kan CYP24A1 ook een reactiepad beginnend met 23-hydroxylering katalyseren [394]. Dezelfde factoren die CYP27B1 reguleren – namelijk $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, PTH en FGF23 –, reguleren ook CYP24A1. De regulatie door deze factoren is echter precies tegengesteld aan die van CYP27B1. Daar waar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ CYP27B1-activiteit remt, stimuleert het juist CYP24A1-expressie [244]. En daar waar PTH een stimulerende factor vormt voor CYP27B1-activiteit, remt het de expressie van CYP24A1.

Tot slot stimuleert FGF23 ook expressie van CYP24A1, terwijl het CYP27B1-expressie down-reguleert. Deze tegengestelde regulatie van CYP24A1 ten opzichte van CYP27B1 is logisch. Daar waar CYP27B1 de productie van actief vitamine D verhoogt, zorgt CYP24A1 juist voor de afbraak hiervan en daarmee voor een balans in de hoeveelheid $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Ook kan er glucuronidering plaatsvinden van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [198]. Dit metaboliet kan worden uitgescheiden in het gal, waarna er in de dunne darm weer reabsorptie kan plaatsvinden (enterohepatische cyclus).

De halfwaardetijd van $25(\text{OH})\text{D}$ in serum bedraagt ongeveer vijftien dagen. De halfwaardetijd van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ is aanzienlijk korter met tien tot twintig uur [243]. Mede dankzij de lange halfwaardetijd is de serumconcentratie van $25(\text{OH})\text{D}$ dan ook een belangrijke indicator van de vitamine D-status [499].

12.2 Werkingsmechanisme

Vitamine D is vrij uniek als voedingssupplement qua werkingsmechanisme. Dit komt doordat vitamine D als prohormoon fungeert en daardoor uiteindelijk zijn effecten uitoefent

via een hormoonreceptor. In het geval van vitamine D is dat de vitamine D-receptor (VDR). De VDR is een intracellulair gelegen receptor en behoort tot de superfamilie van kernreceptoren. Het behoort hiermee tot dezelfde groep receptoren als steroïdreceptoren, zoals de androgeen- en oestrogeenreceptor. De VDR bindt met een hoge selectiviteit en affiniteit aan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, waarna het als transcriptiefactor de expressie van doelgenen gaat beïnvloeden. Dit doet het door een dimeer (een paar van twee) te vormen met de retinoïnezuurreceptor RXR. Deze VDR/RXR-heterodimeer herkent specifieke stukjes op het DNA genaamd vitamine D-resonselementen (VDREs). Vervolgens werkt dit complex, gebonden aan een VDRE, samen met andere eiwitten om de transcriptie van vitamine D-doelgenen te stimuleren of juist te onderdrukken.

Welke genen door vitamine D in een cel worden gereguleerd, en in welke mate, is sterk afhankelijk van de verdere cellulaire context. Deze effecten die gemedieerd worden door het 'bijstellen' van genexpressie door binding van vitamine D aan de VDR, worden genomische effecten genoemd. Naast deze genomische effecten oefent vitamine D ook zogeheten niet-genomische effecten uit. Belangrijke punten waarin deze effecten verschillen van genomische effecten zijn niet alleen dat zij niet (direct) de genexpressie beïnvloeden, maar ook dat zij via geheel ander mechanismen verlopen en daarbij snel van aard zijn. Deze niet-genomische effecten vinden hun oorsprong in de celmembraan in plaats van de celkern. Het effect wordt hierbij waarschijnlijk nog steeds gemedieerd door binding aan de VDR, die in kleine invaginaties (caveolea) van de membraan lijkt te liggen [201].

12.2.1 Klassiek effect op bothomeostase

De klassieke rol van vitamine D is calcium- en fosfaathomeostase, wat het essentieel maakt voor de bothomeostase. Bot bestaat namelijk voornamelijk uit calcium en fosfaat in de vorm van hydroxylapatietkristallen. Wanneer de serumcalciumconcentratie daalt, stijgt de afgifte van PTH. PTH stimuleert vervolgens de activatie van $25(\text{OH})\text{D}$ in de nieren door 1α -hydroxylering. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ werkt vervolgens in op de nieren, het botweefsel en de darmen om de serumcalciumconcentratie te stabiliseren. In de nieren zorgt het ervoor dat er een grotere reabsorptie van Ca^{2+} plaatsvindt. Hierdoor wordt het verlies van calcium in de urine beperkt, en kan het helpen om de serumcalciumconcentratie te herstellen. Een soortgelijk effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zien we op de darmen, waar het de absorptie van calcium en fosfaat verhoogt.

Bij een serumconcentratie van 86.5 nmol/l $25(\text{OH})\text{D}^2$ ligt de opname van oraal ingenomen calcium zo'n 65% hoger dan bij een serumconcentratie van 50 nmol/l [204]. Deze stimulatie werkt zowel via genomische als niet-genomische effecten.

Ten slotte stimuleert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in samenwerking met een verhoogd PTH-niveau de afgifte van calcium (en fosfaat) uit botweefsel, om zo de serumcalciumconcentratie te herstellen. Bij een voldoende calciuminname zal het PTH-niveau echter niet verhoogd zijn, waardoor vitamine D leidt tot gezonde en sterke botten.

De calciuminname en vitamine D-status zijn zodoende belangrijk voor de bothomeostase en voorkomt een lage botdichtheid. Bijgevolg is vitamine D, samen met calcium, belangrijk voor het voorkomen van botfracturen, waaronder stressfracturen. Stressfracturen komen relatief vaak voor onder atleten, met name onder langeafstandlopers, bij wie vaak de heup is aangedaan. Eveneens komen stressfracturen vaak voor bij militaire rekruten.

²1 nanomol per liter $25(\text{OH})\text{D}$ is gelijk aan 0.40 nanogram per milliliter

Het vaakst komen ze voor bij de vrouwen. In een dubbelblind placebo-gecontroleerd onderzoek werden 5201 vrouwelijke marinerekruuten ingedeeld in twee groepen. Eén groep kreeg dagelijks vitamine D (800 IE) en calcium (2000 mg) en de andere groep een placebo. In de suppletiegroep was de incidentie van stressfracturen 20% lager vergeleken met de placebogroep [274].

12.2.2 Niet-genomische effecten

Niet-genomische effecten vinden snel plaats (in enkele seconden of minuten) en vinden vaak hun oorsprong in de celmembraan. Dit in tegenstelling tot genomische effecten, die vaak uren of soms zelfs dagen tot weken nodig hebben om volledig tot uiting te komen. Genomische effecten vinden hun oorsprong in de celkern, waar het DNA gelegen is en gentranscriptie plaatsvindt. Enkele niet-genomische effecten van vitamine D zijn inmiddels geïdentificeerd in spierweefsel. Desalniettemin is het nog volstrekt onduidelijk welke mechanismen *in vivo* daadwerkelijk een rol spelen en in welke mate. Bovendien is het meeste onderzoek verricht op gevogelte en knaagdieren.

Een niet-genomisch effect dat in lijn ligt met de rol van vitamine D in de calcium-homeostase is de regulatie van intracellulair Ca^{2+} in myoblasten en spiercellen [58]. Verschillende onderzoeken laten een snelle toename van een Ca^{2+} -influx zien na blootstelling aan vitamine D. Deze influx wordt in ieder geval ten dele veroorzaakt door het effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ op fosfolipase C (PLC)- en adenylylcyclase-activiteit. PLC klieft fosfolipiden in de celmembraan, waardoor diacylglycerol (DAG) en inositol-1,4,5-trifosfaat (IP_3) worden gegenereerd. IP_3 diffundeert vervolgens van de celmembraan weg en bindt aan de IP_3 -receptor op de membraan van het sarcoplasmatisch reticulum. Activering van deze receptor leidt tot een snelle Ca^{2+} -efflux vanuit het sarcoplasmatisch reticulum in het cytosol. Activatie van adenylylcyclase leidt tot de vorming van de *second messenger* cyclisch AMP (cAMP) uit ATP. cAMP-moleculen binden vervolgens aan eiwitkinase A (PKA), waardoor deze geactiveerd wordt. De activiteit van L-type- Ca^{2+} -kanalen wordt gereguleerd door onder meer PKA [242]. Het gevormde DAG activeert tevens eiwitkinase C (PKC). Deze kinase versterkt de influx van extracellulair Ca^{2+} [82].

12.2.3 Stimulering Akt/mTOR-reactiepad

Onderzoek dat kijkt naar het effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ op anabole reactiepaden in spiercellen is schaars. Eén studie onderzocht het gecombineerde effect van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ met insuline en leucine in C2C12-spiercellen [396]. De C2C12-myoblasten werden na differentiatie geïncubeerd met 1 of 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gedurende 72 uur. Vervolgens werden de cellen vier uur lang ontdaan van serum en leucine. Hierna werden de cellen dertig minuten lang behandeld met insuline (100 nM) en leucine (5 nM). Vervolgens werd gelabeld valine toegevoegd (om de fractionele eiwitsynthesesnelheid te kunnen bepalen) en vijftig minuten later werden de verschillende metingen verricht. De incubatie met 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ samen met leucine en insuline zorgde voor een grotere stijging van de eiwitsynthese dan leucine en insuline afzonderlijk. Verschillende moleculen betrokken bij het Akt/mTOR-reactiepad werden onder de loep genomen. Er werd gekeken naar IR-P, Akt-P, mTOR-P, GSK3 β -P, S6K1-P, 4EBP1-P, rpS6-P en eEF2-P. Er was een significante stijging wanneer insuline en leucine werden gecombineerd met $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ in IR-P, Akt-P, GSK3 β -P, S6K1-P, rpS6-P, maar niet in mTOR-P, 4EBP1-P, eEF2-P. Ook werd er gekeken naar de mRNA-en eiwitexpressie van IR en VDR. Deze stegen allebei door incubatie met $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Samengenomen toont deze studie aan dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ insuline-signalering verbetert in

C2C12-spiercellen door een verhoogde expressie van de IR en fosforyleringstoestand van IR en Akt.

Een andere studie uitgevoerd in humane spiercellen, liet zien dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de expressie van eiwitfosfatase 2 (PP2A) remde [202]. PP2A is een fosfatase die Akt defosforyleert op Thr308 [270]. Deze resultaten suggereren dat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ mogelijk de defosforylering van Akt remt via PP2A-inhibitie. Desalniettemin lijkt vitamine D-suppletie glycemische controle in patiënten met diabetes type 2 niet te verbeteren [194, 269].

12.2.4 Remming ubiquitinligases

Het ubiquitinesysteem is verantwoordelijk voor de afbraak van eiwitten. Hierbij worden eiwitten gemerkt met het molecuul ubiquitine, waarna het proteasoom deze gemerkte eiwitten afbreekt. Twee belangrijke ubiquitinligases die eiwitten markeren met ubiquitine zijn muscle atrophy F-box (MAFbx, ook wel bekend als atrogine-1) en muscle ring finger 1 (MuRF1).

In een recente studie werd gekeken wat het effect van vitamine D was op expressie van deze twee ubiquitinligases [202]. De onderzoekers incubeerden humane spiercellen met 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gedurende 72 uur. De incubatie leidde tot een daling van MAFbx- en MuRF1-mRNA. Ook werd IGF-1-expressie gemeten, maar hier vond men geen verandering in. In hetzelfde onderzoek werd het effect van de cytokines tumornecrosefactor-alfa ($\text{TNF}\alpha$) en interleukine-6 (IL-6) op expressie van de ubiquitinligases bekeken. Beide cytokines verhoogden MAFbx- en MuRF1-expressie en dit werd geremd door toevoeging van $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

12.3 Klinische resultaten

Veel klinische studies naar de effecten van vitamine D op de spierfunctie zijn uitgevoerd bij ouderen of speciale populaties. Een studie uit 1979 liet een stijging van het aantal type 2-spiervezels ten opzichte van type 1-spiervezels zien in oudere patiënten met osteoporose door suppletie van een vitamine D-analoog in combinatie met calcium [422]. Ook vergrootte de dwarsdoorsnede van type 2A-spiervezels. Een placebogecontroleerd onderzoek toonde later aan dat vitamine D-suppletie het percentage type II-spiervezels en de diameter ervan liet stijgen in oudere vitamine D-deficiënte vrouwen [402]. In een andere studie werd eveneens vitamine D gesuppleerd door oudere vrouwen [87]. Vergeleken met de placebogroep nam ook hier de spiervezelgrootte toe in de vitamine D-groep, echter was deze stijging niet statistisch significant.

De resultaten van deze studies kunnen echter niet zomaar geëxtrapoleerd worden naar atleten. Een beperkt aantal studies heeft de effecten van vitamine D-suppletie bij atleten onderzocht. Een kleinschalig dubbelblind placebogecontroleerd onderzoek door Close e.a. keek naar het effect bij tien professionele voetballers [101]. Vijf van hen kregen vitamine D3 gesuppleerd (5000 IE per dag) en vijf anderen kregen een placebo gedurende acht weken. Bij aanvang van de studie was de serum- $25(\text{OH})\text{D}$ -concentratie gemiddeld ongeveer 30 nmol/l in de suppletiegroep en 50 nmol/l in de placebogroep. Na 8 weken was deze significant gestegen naar ongeveer 100 nmol/l in de suppletiegroep. De placebogroep ondervond een niet-significante stijging naar circa 70 nmol/l. Om de kracht te bepalen werden de 1-RM bankdrukken en 1-RM squatten bepaald. Er werd geen significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden voor deze uitkomstmaten. Wel werd er een trend gevonden ($P = 0.065$ en $P = 0.094$ voor respectievelijk de 1-RM bankdrukken en 1-RM squatten).

Gezien de kleine groepsgroottes zou het kunnen zijn dat de effectgrootte te klein was om op te pikken (type II-fout). Wel werd er een significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden voor de 10-meter-sprint en verticale spronghoogte in het voordeel van de suppletiegroep. Er was geen trainingsschema ingericht specifiek op kracht; dit kan de reden zijn dat er geen adequate trainingsprikkel aanwezig was om de 1-RM-tests te verbeteren. Tevens is er geopperd dat een serumconcentratie van 125 nmol/l optimaal zou zijn voor sportprestaties [80]. De serumconcentratie in de suppletiegroep bereikte deze concentratie niet.

Later onderzoek, tevens door Close e.a., was opgezet om een dosis-respons-relatie te onderzoeken [102]. Voetbal- en rugbyspelers aangesloten bij universiteitclubs deden mee aan deze studie. 10 van hen werden onderverdeeld in een groep die 20,000 IE vitamine D3 per week kreeg, 6 van hen 40,000 IE, en 9 een placebo gedurende 12 weken. De serum-25(OH)D-waarde was ongeveer 50 nmol/l in elke groep. Deze steeg naar circa 80 nmol/l in de 20,000 IE-groep en ongeveer 90 nmol/l in de 40,000 IE-groep. In de placebogroep werd een kleine daling waargenomen naar circa 40 nmol/l. Ook hier werden 1-RM bankdrukken, 1-RM squatten, verticale spronghoogte en 20-meter-sprint bepaald. Er werd voor geen enkele van deze variabelen een significant effect gevonden tussen de groepen. Net als in de voorgaande studie zou het kunnen zijn dat de bereikte serum-25(OH)D-concentratie in de suppletiegroepen niet hoog genoeg was voor optimale sportprestaties. Bovendien waren de groepsgroottes vrij klein, en werd er geen trainingsschema tijdens de suppletieperiode gehanteerd die gericht was op krachttontwikkeling.

In een gecontroleerde studie uitgevoerd door Wyon e.a. konden elite-klassiekballetdansers ervoor kiezen om vitamine D3 gesuppleerd te krijgen ($n = 17$) of te dienen als controlegroep ($n = 7$) [488]. De suppletieperiode duurde vier maanden, waarna veranderingen in kracht, verticale spronghoogte en blessurefrequentie werden vergeleken tussen beide groepen. Als krachtmeting moesten de deelnemers vijf seconden lang een maximale isometrische beenextensiecontractie leveren. Er werd voor deze drie variabelen een significante groep $\times$ tijd-interactie gevonden. Het gevonden verschil in de blessurefrequentie was vrij fors. Er hadden zich slechts vijf blessures voorgedaan in de suppletiegroep en zeven in de controlegroep, terwijl de suppletiegroep relatief gezien veel meer deelnemers bevatte. De serum-25(OH)D-waardes werden niet gemeten in dit onderzoek, waardoor het onduidelijk is in hoeverre deze waardes verschilden tussen de twee groepen en welke concentratie werd bereikt door suppletie. Doordat het onderzoek tevens niet dubbelblind was uitgevoerd en niet over een placebogroep beschikte, is de bewijskracht matig. Net als met de twee eerder besproken studies werd er geen trainingsschema gehanteerd met als doel krachttontwikkeling.

Twee andere studies keken naar het effect van vitamine D2 in plaats van vitamine D3 [415]. Shanely e.a. gaven 33 vitamine-D-insufficiënte (<75 nmol/l) middelbare school atleten 600 IE vitamine D2 per dag ($n = 17$) of een placebo ($n = 16$). In de suppletiegroep vond een significante, maar zeer kleine stijging plaats in de serumconcentratie ten opzichte van de placebogroep na zes weken. Er werd geen significant verschil gevonden tussen beide groepen op het gebied van kracht (bepaald met een rug-been-dynamometer), verticale spronghoogte en lichaamsvetpercentage. De afwezigheid van een adequate trainingsprikkel, de korte suppletieduur, lage dosering en minimale verschil in de serum-25(OH)D-concentratie tussen beide groepen zouden een mogelijk effect van vitamine D-suppletie hierbij kunnen maskeren.

Ander onderzoek waarbij eveneens vitamine D2 werd gebruikt, diende 3800 IE per dag ($n = 13$) of een placebo ($n = 15$) toe aan NASCAR-pitcrew-atleten [329]. Ook hier duurde

de interventie zes weken en werd gebruikgemaakt van een rug-been-dynamometer en de verticale spronghoogte als uitkomstmaten. Verder werd een Wingate-test uitgevoerd en moesten de proefpersonen bankdrukken met hun lichaamsgewicht tot uitputting. Hoewel de dosering in dit experiment een stuk hoger lag, verhoogde de totale serum-25(OH)D-concentratie niet. De proefpersonen hadden bij aanvang al een serumconcentratie van circa 100 nmol/l. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de groepen.

In het kader van het verbeteren van de spierkracht en de lichaamscompositie zou een studie waarbij vitamine D-suppletie wordt gecombineerd met een krachttrainingsprogramma en bijpassend dieet bij atleten interessant zijn. Tot op heden ontbreekt echter een dergelijke klinische studie. Wel is er zo'n studie uitgevoerd in ongetrainde jongeren en ouderen [6]. In deze studie werden de jongeren ($n = 20$) en ouderen ($n = 20$) elk onderverdeeld in een vitamine D-groep en een placebogroep. De vitamine D-groepen kregen 1920 IE vitamine D3 en 800 mg calcium per dag, en de placebogroepen kregen alleen het calcium. De suppletieperiode duurde zestien weken, waarvan de laatste twaalf weken gecombineerd met een krachttrainingsprogramma gericht op ontwikkeling van de quadriceps. Er werd een isometrische knie-extensie verricht om kracht te bepalen. Ook werd de dwarsdoorsnede van de quadriceps gemeten om hypertrofie inzichtelijk te maken. De serum-25(OH)D-concentratie steeg significant in beide vitamine D-groepen. Deze steeg van 41.3 nmol/l naar 71.6 nmol/l bij de groep jongeren die vitamine D gesuppleerd kreeg en van 70.7 nmol/l naar 111.2 nmol/l bij de ouderen. Er werd geen significant effect gevonden van vitamine D-suppletie op hypertrofie of kracht na het voltooien van het trainingsprogramma.

12.4 Veiligheid

In tegenstelling tot de meeste voedingssupplementen is er van vitamine D een schat aan data te vinden omtrent veiligheid. Veel overzichtsartikelen in de wetenschappelijke literatuur zijn hier aan gewijd [462, 199, 463, 243, 203, 116, 506, 400]. Een teveel aan vitamine D kan leiden tot problemen, die voornamelijk voortvloeien uit de hypercalcemie (een te hoog calciumgehalte in het bloed) die dit tot gevolg kan hebben (en ook hyperfosfatemie; een te hoog fosfaatgehalte in het bloed). Dit kan zorgen voor hoofdpijn, misselijkheid, overgeven, diarree, gewichtsverlies, polyurie en polydipsie. Op de lange termijn kan mineralisatie van zachte weefsels optreden, waaronder calcificatie van de vaatwanden. In elk geval is overmatige activiteit van het vitamine D-systeem hier de boosdoener [243].

De serum-25(OH)D-concentratie die kan worden bereikt met veel zonlichtblootstelling ligt rond de 100-150 nmol/l [462, 35]. Er is nog nooit vitamine D-toxiciteit door zonlichtblootstelling gerapporteerd, zodoende kan er geredeneerd worden dat dit een veilige concentratie is. Inderdaad, de serum-25(OH)D-concentratie waarbij hypercalcemie ontstaat is onzeker, maar men schat dat deze voor langere tijd ten minste boven 375-500 nmol/l zou moeten liggen [243]. Dergelijke concentraties zijn in de literatuur alleen waargenomen bij onopzettelijke overdosering. De dosering die benodigd zou zijn om bij de meeste mensen een concentratie boven 100 nmol/l te bereiken lijkt op ongeveer 4000 IE per dag te liggen [462, 464], ervan uitgaande dat er een lage serum-25(OH)D-concentratie aanwezig is, zoals veelal het geval is. Bij personen die al een concentratie van boven de 100 nmol/l hebben, zal er een verdere stijging plaatsvinden door suppletie.

Een risico-analyse van Hathcock e.a. stelt de hoogste dosering waarbij geen schadelijk effecten optreden (NOAEL, Eng.: *no-observed-adverse-effect level*) op 10.000 IE vitamine

D3 per dag [199]. Deze NOAEL wordt bovendien ondersteund door de afwezigheid van toxiciteit in klinische studies met gezonde personen die meer dan deze dosering gesuppleerd kregen. De aanvaardbare bovengrens van inname die gehanteerd wordt door de Gezondheidsraad voor volwassenen is echter vastgesteld op 4000 IE. Deze waarde berust op het advies van de Europese Voedselveiligheidsautoriteit (EFSA) [140].

Ook zijn er enkele aanwijzingen voor toxiciteit die niet het gevolg is van hypercalcemie. Zo zijn er enkele studies die een associatie aantonen tussen een hoog serum-25(OH)D-niveau en onder meer cardiovasculaire aandoeningen, kanker, allergieën en mortaliteit. De meeste gevonden associaties zouden echter verklaard kunnen worden door verscheidene versturende (Eng.: *confounding*) variabelen. Desalniettemin lijkt de associatie met allergieën waarschijnlijk [177]. De populatie in de meeste van deze studies besloeg echter baby's en kinderen. Het mechanisme wat er aan ten grondslag zou kunnen liggen zou een verschuiving zijn van de balans tussen Th1-cellen en Th2-cellen richting meer Th2-cellen (zie kader 12.1).

Alleszins is er momenteel weinig aanleiding om schadelijkheid van vitamine D-suppletie te verdenken bij doseringen lager dan 10.000 IE vitamine D3 per dag in een gezonde populatie.

Kader 12.1



Th1-cellen (T-helper-1-cellen) en Th2-cellen (T-helper-2-cellen) zijn celtypen die behoren tot het immuunsysteem. Beide worden gevormd uit dezelfde voorlopercel. Th1-cellen zijn belangrijk in het stimuleren van ontstekingsreacties door afgifte van de ontstekingsfactor tumornecrosefactor-alfa (TNF α). Ook activeren zij macrofagen door hun interferon-gamma (IFN- γ)-productie. De primaire rol van deze cellen is dan ook gericht op het onschadelijk maken van intracellulaire pathogenen, zoals virussen en sommige bacteriën. De Th2-cellen produceren onder meer de interleukinen IL-4, IL-5 en IL-13. Hiermee zorgen zij voor de vorming van zogeheten plasmacellen. Plasmacellen scheiden op hun beurt verschillende antilichamen af. Wanneer de balans tussen Th1-cellen en Th2-cellen uitschiet naar Th2-cellen kan een teveel aan antilichamen (in het bijzonder immunoglobuline E) leiden tot allergie.

12.5 Conclusie

Vitamine D wordt aangemaakt door de huid onder invloed van UVB-straling en komt in kleine hoeveelheden ook in de voeding voor. Veel Nederlanders worden te weinig blootgesteld aan zonlicht in de zomermaanden om genoeg vitamine D aan te maken voor de rest van het jaar. De aanvulling vanuit de voeding schiet hierbij ook veelal tekort. Recent onderzoek toont aan dat onder Nederlandse atleten een deficiënte of insufficiënte vitamine D-status eveneens vaak voorkomt. Klinisch onderzoek naar een positief effect van vitamine D-suppletie op lichaamscompositie of spierkracht onder atleten is helaas beperkt, maar suggereert een mogelijk positief effect op spierkracht. Meer adequaat vervolgonderzoek is nodig om dit te bevestigen.

Voor optimale sportprestaties is geopperd dat een serum-25(OH)D-concentratie van 125 nmol/l benodigd is. Meer onderzoek is echter noodzakelijk om vast te stellen of er een optimale concentratie bestaat, en waar deze ligt. Afhankelijk van de initiële vitamine D-status van de persoon kunnen doseringen tot 5000 IE vitamine D3 per dag nodig zijn om een adequaat niveau te bereiken. Enkele factoren verhogen risico op een deficiënte of insufficiënte vitamine D-status, waaronder weinig zonlichtblootstelling, een donker

huidpigment en een oudere leeftijd. Door de serum-25(OH)D-concentratie te bepalen door middel van een bloedtest, kan zekerheid worden verschaft over de vitamine D-status. Bij een lage concentratie hiervan is suppletie aan te raden. Na drie maanden suppletie kan opnieuw een bloedtest worden afgenomen om te bepalen of de dosering bijgesteld moet worden.