

INVLOED VAN HET SPIERVEZELTYPE OP DE PRESTATIEBEVORDERENDE EFFECTEN VAN NITRAATINNAME

Aantal woorden: 25017

Jasper Bert & Lena Van Heue

Studentennummer: 01905241, 01905399

Promotor: Prof. dr. Wim Derave

Copromotor: Prof. dr. Eline Lievens

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de richting Master of Science in de lichamelijke opvoeding en de bewegingswetenschappen

Academiejaar: 2023 – 2024

VOORWOORD

Het schrijven van deze masterproef was een intensief, maar bijzonder leerzaam proces dat wij met veel toewijding en samenwerking hebben doorlopen. Het feit dat wij elkaar bij toeval hebben gevonden om deze duo-thesis te schrijven, omdat we het beiden niet zagen zitten om dit traject alleen te doorlopen, heeft ons uiteindelijk sterker gemaakt en gezorgd voor een aangename samenwerking. Aanvankelijk hadden wij onze zinnen gezet op het onderwerp “De negatieve interactie tussen medicatie en trainingsadaptaties: de casus antihistaminica.” Toen we te horen kregen dat we dit onderwerp net niet toegewezen kregen, zijn we niet bij de pakken blijven zitten en hebben we ons vol gestort op onze tweede keuze.

Die keuze viel op het onderwerp “Het prestatiebevorderende effect van histidine-bevattende dipeptides”, een onderwerp waar wij dan ook mee aan de slag zijn mogen gaan. Echter, in overleg met professor Wim Derave en onze co-promotor Eline Lievens hebben we besloten dit onderzoek wat te laten rusten en het over een andere boeg te gooien. Dit leidde ons naar ons huidige onderwerp: “De invloed van het spiervezeltype op de prestatiebevorderende effecten van nitraatname.” Met nieuwe energie en onder begeleiding van Julie Hardeel hebben wij dit onderwerp aangevat. In het laatste jaar nam Jonas Vandecauter de begeleiding over, waarvoor wij hem heel dankbaar zijn.

Onze dank gaat dan ook uit naar onze promotor en co-promotor, Wim Derave en Eline Lievens, voor hun waardevolle feedback en hun voortdurende motivatie om ons naar het hoogste niveau te tillen. Julie Hardeel willen wij bedanken voor haar ondersteuning in het eerste jaar en Jonas Vandecauter voor zijn uitstekende begeleiding ter vervanging van Julie.

Ten slotte willen wij onze ouders en vrienden bedanken voor hun onvoorwaardelijke steun gedurende dit hele proces, zowel in de goede als in de minder goede momenten. Hun aanwezigheid en aanmoediging hebben ons geholpen om deze masterproef tot een goed einde te brengen.

ABSTRACT

Doelstelling

De afgelopen jaren is aangetoond dat nitraatsuppletie (NO_3^-) ergogene effecten kan hebben op diverse sportprestaties. Deze effecten worden toegeschreven aan stikstofmonoxide (NO), dat ontstaat door de reductie van exogeen nitraat tot nitriet (NO_2^-) en vervolgens tot NO. Voorheen werd aangenomen dat nitraat voornamelijk prestatiebevorderend was bij submaximale duursporten, waar een lager zuurstofverbruik werd waargenomen. Recent onderzoek suggereert echter dat nitraat ook invloed kan hebben op spiercontractie en prestaties bij kortdurende, intensieve inspanningen. Aangezien dergelijke inspanningen meer type II spiervezels rekruteren en nitriet onder zuurstofarme en zure omstandigheden (kenmerkend voor type II spiervezels) efficiënter wordt omgezet in NO, wordt gespeculeerd dat de ergogene effecten van nitraat mogelijk meer uitgesproken zijn bij mensen met een hoger aandeel type II spiervezels. Het doel van deze pilootstudie was daarom om te onderzoeken of het spiervezeltype de prestatiebevorderende effecten van nitraatsuppletie beïnvloedt.

Methodiek

Bij acht recreatief actieve proefpersonen werd het spiervezeltype zowel invasief als niet-invasief ingeschat. De deelnemers werden vervolgens willekeurig toegewezen binnen in één van de twee condities (placebo of nitraatsuppletie) in een cross-over studie. Gedurende zeven dagen kregen de proefpersonen geconcentreerd bietensap (6,45 mmol nitraat) of een placebo. Op de zesde en zevende dag vonden twee testdagen plaats. De eerste testdag omvatte een submaximale fietstest en krachttesten, terwijl de tweede testdag een submaximale fietstest en een 4 km fietstijdrit omvatte. Tussen de twee condities werd een wash-out periode van tien dagen ingebouwd.

Resultaat

Er werd een trend tot significantie teruggevonden bij de 4km fietstijdrit, waarbij de nitraatconditie 0,41% sneller was dan de placeboconditie (NIT = $382,75 \pm 26,82$ s vs. PLA = $384,31 \pm 27,02$ s; $p = 0,067$). Bij de krachttesten en de submaximale fietstest werden er geen significante verschillen teruggevonden tussen de placebo en nitraatconditie ($p > 0,05$). Verder werd er één significante sterke positieve correlatie teruggevonden tussen de ROTR en het spiervezeltype van de proefpersonen bepaald op basis van de carnosineconcentratie ($r = 0,774$; $p = 0,024$).

Conclusie

De nitraatsuppletie veroorzaakte niet de gewenste ergogene effecten die verwacht werden op basis van de literatuurstudie. De resultaten suggereren dat weinig tot geen ergogene effect van nitraat te vinden is bij de verschillende testen. Proefpersonen met meer type II spiervezels volgens de carnosine methode, zouden echter wel een snellere spierrelaxatiesnelheid hebben (ROTR), wat wijst op een betere spierfunctie. Deze bevinding is in lijn met de gestelde hypothese maar moet met grote voorzichtigheid geïnterpreteerd worden vanwege de beperkte steekproefomvang, het geringe effect van nitraat en de variatie in methoden voor spiervezeltypebepaling. Verdere studies zijn nodig om deze resultaten te bevestigen en de rol van nitraat in relatie tot spiervezeltype en prestatie beter te begrijpen.

INHOUDSTAFEL

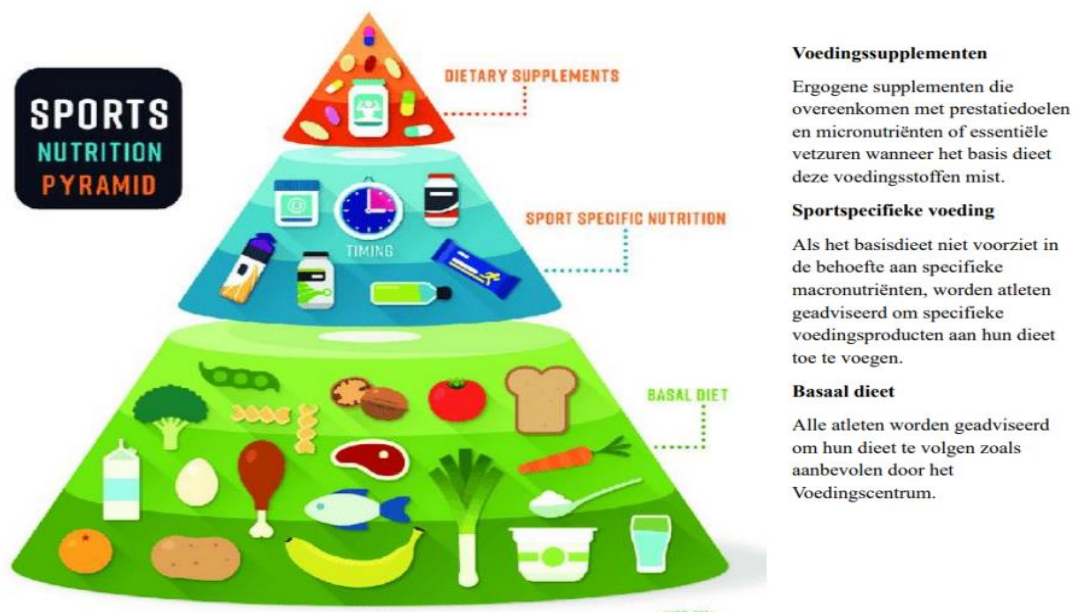
1	Literatuurstudie	1
1.1	Sportvoeding.....	1
1.2	Ergogene voedingssupplementen	4
1.3	Nitraat	6
1.3.1	Absorptieproces.....	6
1.3.2	Distributie.....	10
1.3.3	Metabolisme.....	12
1.3.3.1	L-arginine oxide pathway	12
1.3.3.2	Nitraat- nitriet- NO pathway.....	13
1.3.4	Spieren als reservoir	15
1.3.5	Invloed op sportprestaties.....	17
1.3.5.1	Nitraat heeft ergogene effecten in de sportcontext.....	17
1.3.5.2	Acuut vs chronisch	18
1.3.5.3	Ergogene effecten en trainingsstatus	19
1.3.5.4	Langdurige submaximale inspanning	20
1.3.5.5	De invloed op spierkracht.....	20
1.3.5.6	Lichaamsbeweging aan maximale intensiteit	21
1.3.5.7	Geslachtsspecifieke verschillen.....	22
1.3.6	Mechanismen	24
1.3.7	Spiervezeltype en nitraat	27
1.3.8	Suppletie.....	30
2	Onderzoeksvragen en hypothese.....	31
3	Methodiek	32
3.1	Proefpersonen	32
3.2	Studiedesign	33
3.3	Procedure.....	34
3.4	Meetinstrumenten en -methoden	37
3.4.1	Spiervezeltype bepaling	37
3.4.1.1	De invasieve methode.....	37
3.4.1.2	De non-invasieve methoden	37
3.4.2	De Ramp inspanningstest	39
3.4.3	De 4 km tijddrit	39

3.4.4	De submaximale fietstest	40
3.4.5	De spierkrachttesten	41
3.4.5.1	Isokinetische en isometrische contracties	41
3.4.5.2	Elektrostimulatie.....	42
3.5	Analyses	43
4	Resultaten.....	44
4.1	Effecten van nitraat.....	44
4.1.1	Hartslag en bloeddruk	44
4.1.2	4 km tijddrit.....	46
4.1.3	Submaximale inspanningstest	47
4.1.4	Krachttesten Biodex	49
4.2	Verband met spiervezeltype	52
5	Discussie	57
5.1	Inleiding.....	57
5.2	De 4 km tijddrit en de correlatie met spiervezeltype.....	58
5.3	De submaximale fietstest en de correlatie met spiervezeltype	61
5.4	Spiercontractie en de bijhorende correlaties met spiervezeltype.....	63
5.5	Limitaties en aanknopingspunten voor verder onderzoek	67
5.6	Praktische implicaties.....	69
6	Conclusie.....	70
7	Referenties	71

1 Literatuurstudie

1.1 Sportvoeding

Al eeuwenlang streven atleten naar het behalen van de best mogelijke sportprestaties. ‘Citius, Altius, Fortius’, atleten willen constant naar dat tikkeltje sneller, hoger of sterker en doen er alles aan om de best mogelijke resultaten te behalen in hun discipline en zo de concurrentie te verslaan. Hun carrière heeft een grote impact op de manier waarop ze leven. Er zijn namelijk veel verschillende determinanten die atleten aanpassen om hun sportprestaties te verbeteren, waaronder training, slaap en herstel (Wickham, 2023). Een andere belangrijke factor die een zeer grote invloed heeft op de prestatie van atleten is voeding. Het is geen geheim dat een gezond, nutriëntrijk dieet belangrijk is voor het optimaal functioneren van een lichaam. Zeker in het geval van atleten, die naast het dagelijks functioneren regelmatig extra inspanningen vragen van hun lichaam. Ze zijn fysiek actiever en ondergaan zware trainingen waardoor het herstel van het lichaam extra moeilijk wordt en daar speelt de juiste voeding een grote rol in. Het is dus belangrijk de atleet van gepaste voedingsstoffen en correcte hoeveelheid voedingsstoffen te voorzien. Hiervoor zijn richtlijnen opgesteld (Potgieter, 2013).



Figuur 1. Sports Nutrition Pyramid (Dutch Association of Sports Dietetics, VSN)

Om de voedingsbehoeften van atleten te beschrijven baseert men zich vaak op de ‘sports nutrition pyramid’ (figuur 1). Dit model bestaat uit 3 lagen: het basaal dieet, sportspecifieke voeding en voedingssupplementen. De basis van dit model, het basaal dieet, beschrijft de basisvoeding die samengesteld is volgens de voedingsrichtlijnen die gelden voor de algemene populatie. Die richtlijnen worden voor elk land specifiek opgesteld. Uit de basisvoeding halen atleten de meeste nutriënten. Het is dan ook erg belangrijk dat atleten zich in eerste instantie focussen op het innemen van basisvoeding.

Wanneer echter een basisdieet niet voldoende specifieke macronutriënten aanlevert, kan men overschakelen naar de tweede laag van het model: sportspecifieke voeding. Dat zijn voedingsproducten die specifiek voor sporters gemaakt worden en helpen om optimaal te trainen of te presteren tijdens wedstrijden. Marathonlopers die lange afstanden afleggen, verbruiken bijvoorbeeld een grote hoeveelheid koolhydraten tijdens hun inspanning. Een basisdieet kan in dat geval ontoereikend zijn waardoor men overschakelt naar sportspecifieke voeding waarin die koolhydraten in een geconcentreerde hoeveelheid worden ingenomen. Voorbeelden van sportspecifieke voeding zijn koolhydraatrijke energierepen, eiwitrepen, sportdranken en eiwitpoeders. Naast het soort macronutriënt dat men inneemt via sportspecifieke voeding, is het ook van belang dat men het op het juiste moment voor, tijdens of na de inspanning consumeert om er voordeel uit te halen.

Tot slot stelt de bovenste laag van de piramide het gebruik van voedingssupplementen voor. Dat zijn enerzijds ergogene supplementen die specifiek aansluiten bij de prestaties die atleten proberen te verbeteren. Ze zijn bedoeld om door en door getrainde atleten toch net dat tikkeltje beter te laten presteren want in de topsport kan een klein hulpmiddel een groot verschil maken. Denk maar aan de discipline 100m sprint, waarbij milliseconden sneller lopen het verschil kan maken tussen winst of verlies. Wanneer men dan als atleet bijvoorbeeld creatine inneemt als supplement, zal er een grotere hoeveelheid creatine in de spieren aanwezig zijn. Daardoor zal men meer energie kunnen leveren op korte tijd en dus een voordeel hebben ten opzichte van atleten die niet supplementeren met creatine (Skare et al., 2001). Anderzijds kunnen voedingssupplementen ook micronutriënten of essentiële vetzuren zijn die ontbreken in het basisdieet van de atleet. Micronutriënten bestaan uit vitamines, mineralen of sporenelementen.

In veel studies spreekt men over ‘supplementen’ in het algemeen. Het gaat dan vaak over de 2 bovenste lagen van de piramide, zowel sportspecifieke voeding als ook voedingssupplementen.

Men heeft al verschillende pogingen gedaan om 'supplement' te definiëren maar er bestaat binnen de voedingswetenschappen geen eenduidige definitie (Maughan et al., 2018). Zo beschreef de Dietary Supplement Health and Education Act in 1994 een voedingssupplement als: 'Een product, buiten tabak, dat gebruikt wordt samen met een gezond dieet en dat een of meer van een van volgende voedingsingrediënten bevat: een vitamine, een mineraal, een kruid of een andere botanische stof, een aminozuur, een voedings substantie voor gebruik door de mens om het dieet aan te vullen door de totale dagelijkse behoefte te verhogen, of een concentratie, een metabool, een bestanddeel, een extract of combinaties van deze ingrediënten'. Deze definitie is ontoereikend aangezien het dus enkel om 'een supplement' zou gaan wanneer men daarnaast een gezond dieet heeft. Maughan et al. definiëren een voedingssupplement als volgt: 'Een voedingsmiddel, voedingscomponent, nutriënt of niet-voedingsbestanddeel dat doelbewust wordt ingenomen naast het gewoonlijk geconsumeerde dieet met als doel een specifiek gezondheids- en/of prestatievoordeel te bereiken'. Dit gaat om zowel functional foods, sportvoeding, geïsoleerde nutriënten als combinaties hiervan.

Voedingssupplementen worden veel gebruikt door sporters. Zo blijkt uit onderzoek van Maughan et al. (2007) dat 85% van de elite-atleten in de atletiek gebruikmaakt van voedingssupplementen als onderdeel van hun trainings- of wedstrijdroutine. In deze studie werden zowel micronutriënten als ergogene voedingssupplementen onderzocht. Deze supplementen worden vaak zonder advies van een voedingsdeskundige ingenomen, en zonder dat men de voordelen en risico's ervan volledig begrijpt.

Volgens een meta-analyse van Knapik et al. (2016) bedraagt de prevalentie van het gebruik van voedingssupplementen onder atleten 60%. Omdat dit cijfer atleten uit verschillende sportdisciplines omvat, is het moeilijk om deze bevindingen te generaliseren. Het gebruik van supplementen varieert namelijk sterk tussen verschillende sporten. Elite-atleten maken volgens deze studie vaker gebruik van voedingssupplementen dan recreatieve sporters. Wat betreft de meeste voedingssupplementen, nemen mannen en vrouwen ze in gelijke mate. Uitzonderingen hierop zijn ijzer, dat vaker door vrouwen wordt ingenomen, en eiwitten, creatine en vitamine E, die vaker door mannen worden gebruikt.

1.2 Ergogene voedingssupplementen

Volgens het Australian Institute of Sports (AIS) zijn er 6 ergogene supplementen waarvoor er sterk wetenschappelijk bewijs bestaat dat ze prestatiebevorderende effecten hebben wanneer ze gebruikt worden volgens wetenschappelijk onderbouwde protocols in de sport. Het gaat om cafeïne, B-alanine, bicarbonaat, bietensap (nitraat), creatine en glycerol. Ze worden 'prestatie supplementen' genoemd en als volgt gedefinieerd: 'Supplementen/ingrediënten die sportprestaties kunnen ondersteunen of verbeteren. Het beste te gebruiken met een geïndividualiseerd en evenement specifiek protocol en met de deskundige begeleiding van een erkende sportdiëtist'. Deze 6 prestatie supplementen hebben elk hun eigen specifieke werking.

Cafeïne wordt snel geabsorbeerd door het lichaam en getransporteerd naar verschillende organen waar het een grote verscheidenheid aan effecten heeft. Het werkt voornamelijk in op het centraal zenuwstelsel waardoor het de perceptie vermindert dat men vermoeid is en men voor een langere periode optimaal kan presteren (Guest et al., 2021). Ook B-alanine leidt tot prestatiebevorderende effecten aangezien het bij chronische suppletie de hoeveelheid carnosine in de spieren verhoogt (Harris et al., 2007). Carnosine kan prestaties bevorderen door het verbeteren van de spierbuffercapaciteit, verhoogde gevoeligheid van calciumafgiftekanalen en vasodilatatie. (Baguet et al., 2010).

Bicarbonaat en creatine hebben ook een prestatiebevorderend effect, voornamelijk op inspanningen van hoge intensiteit. Bij bicarbonaat geldt dat op vlak van kracht, capaciteit, snelheid en tijd tot falen bij inspanningen van 2 tot 10 minuten (Carr, 2011; Peart, 2012). Het is een anion dat deel uitmaakt van het voornaamste buffersysteem in het bloed. Creatine wordt zowel endogeen gesynthetiseerd als ook opgenomen via voeding of als supplement waardoor de opgeslagen hoeveelheid creatine in de spier stijgt. Door de verhoogde opslag stijgt de snelheid van de phosphocreatine-resynthese en verhoogt het zo de hoeveelheid creatine en phosphocreatine in de spier. Creatine heeft, wanneer het volgens de huidige aanbevelingen wordt ingenomen, een prestatiebevorderend effect bij korte, intensieve inspanningen (Kreider et al., 2022).

Het volgende supplement, glycerol, is een suikeralcohol met een heel ander endogeen effect. Het zorgt voor een betere retentie van opgenomen vocht. Dat kan voordelig zijn voor atleten

die sporten in hoge temperaturen of tijdelijk geen toegang hebben tot vloeistof. Het wordt gebruikt voor hyperhydratatie en rehydratatie na een inspanning (McCubbin et al., 2022).

Tot slot nitraat, dit is een populair supplement dat meestal in de vorm van rode bietensap wordt ingenomen. De inname ervan verhoogt de biobeschikbaarheid van NO via de nitraat-nitriet-NO pathway (Lundberg et al., 2008). NO speelt een belangrijke rol in de vasculaire en metabole controle van het lichaam en zo ook in de functie van de skeletspier. Het heeft invloed op de regulatie van de bloedflow, de contractiliteit, de calcium en glucose homeostase en de mitochondriale respiratie en biogenese (Stamler et al., 2001). Met die mechanismen in het achterhoofd heeft men de invloed van rode bietensap op sportprestaties al meermaals onderzocht en vond men veelbelovende resultaten. Welke ergogene effecten nitraat nu juist heeft lees je verder in deze thesis.

Het is belangrijk dat atleten de risico's en individuele voordelen inschatten van ergogene supplementen. Ze worden best enkel overwogen wanneer er sterk bewijs is dat ze veilig, legaal, effectief en besproken zijn met een sport nutritionist (Maughan, 2018). Een van de risico's van het nemen van legale supplementen is de contaminatie ervan met illegale supplementen zoals sibutramine en anabole steroïden. Volgens de review van Kozhuharov (2022) zou maar liefst 28% van de 3132 geanalyseerde supplementen een potentieel risico vormen voor onopzettelijk dopinggebruik. Dat toont aan dat er supplementen op de markt zijn die mogelijk doping bevatten.

1.3 Nitraat

Voor onze thesis zullen wij ons meer verdiepen in de invloed van het spiervezeltype op het prestatiebevorderend effect van nitraat-suppletie. Om die reden zullen wij in onze literatuurstudie dus focussen op nitraat als supplement.

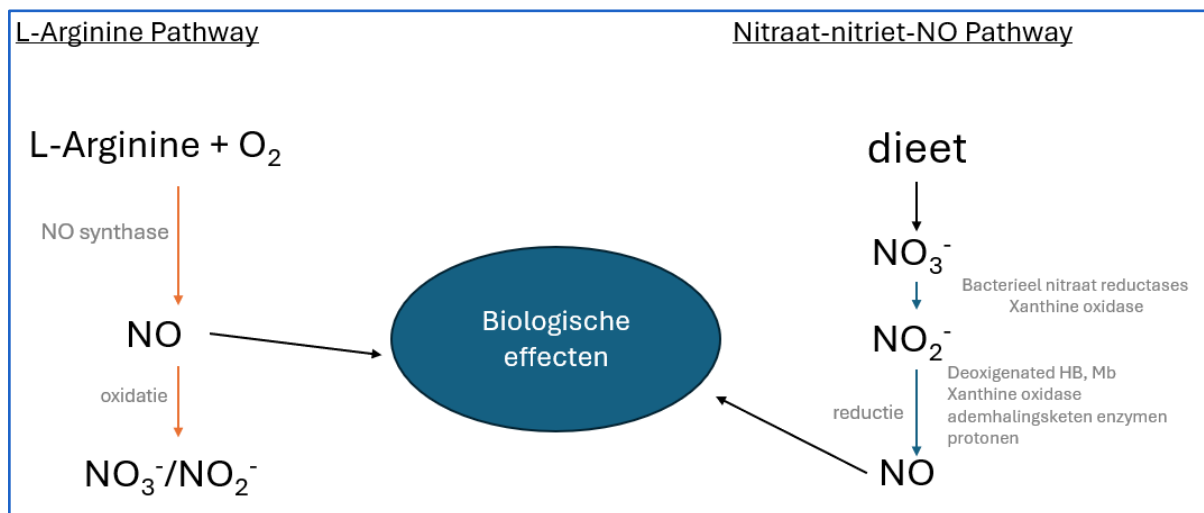
Nitraten zijn stoffen die van nature voorkomen in verschillende groenten, zoals spinazie, rucola, boerenkool, sla en rode bieten (Hord et al., 2009). Nitraat (NO_3^-) zal uiteindelijk niet de stof zijn die voor de belangrijke fysiologische effecten zal zorgen. In het lichaam worden nitraten namelijk via het tussenproduct nitriet (NO_2^-) gereduceerd tot stikstofmonoxide (NO), een gasvormig molecuul dat belangrijk is voor de vasculaire en metabole controle van het lichaam zoals het reguleren van de bloeddruk, de doorbloeding van de weefsels en het verminderen van ontstekingen (Jones, A. M., 2014). Die belangrijke fysiologische functies hebben geleid tot de interesse in het gebruik van dit molecuul als voedingssupplement om gezondheid en prestaties te verbeteren. Nitraat kan door de mens worden opgenomen op natuurlijke wijze via voeding of via nitratzouten. De eerste methode blijkt effectiever dan de tweede (Jones A.M., 2022).

1.3.1 Absorptieproces

Bij de eerste onderzoeken rond nitraat werd aan de hand van langetermijnstudies het nitraatmetabolisme onderzocht. Bij een studie waar men omstandigheden creëerde met lage inname van nitraat bleek dat het nitraat dat werd uitgescheiden via de urine vier keer zo hoog lag dan er ingenomen werd. Aan de hand van balansstudies kon men aantonen dat de bron van het teveel aan nitraat in de urine afkomstig was van endogene nitraat synthese en dus niet van nitraat dat opgeslagen was ergens in het lichaam. (Green et al., 1981). Dit zorgde voor heel wat interesse rond het onderwerp en heeft geleid tot de ontdekking dat L-arginine, een semi-essentieel aminozuur, een precursor voor endogeen gesynthetiseerd nitraat bij mensen is (Leaf et al., 1989).

Er werd lang gedacht dat de aanmaak van stikstofmonoxide enkel gebeurde via de oxidatie van L-arginine waarin de NO-synthase enzymen een belangrijke rol spelen. Dit mechanisme zorgt voor de endogene aanmaak van nitraat en nitriet in het lichaam (Ignarro, 1999; Moncada et al., 1993; R.F. Furchgott, 1999), en wordt logischerwijs de “L-arginine pathway” genoemd (zie figuur 2&3).

Naast die endogene aanmaak van stikstofmonoxide, kan er echter ook een exogene aanvulling gebeuren, de nitraat- nitriet- NO- pathway genoemd (zie figuur 2). Er wordt in enkele studies dan ook gesuggereerd dat de twee pathways elkaar aanvullen. Zo zou de nitraat-nitriet-NO pathway de L-arginine pathway aanvullen op het moment dat er weinig zuurstof ter beschikking is (Lundberg et al., 2008).

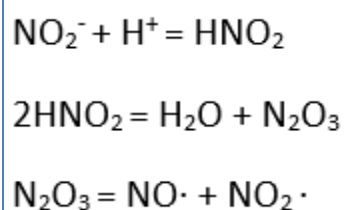


Figuur 2. Deze figuur geeft een schematische weergave van de bovengenoemde pathways en geeft op deze manier een overzicht van de vorming van NO. Voor de L-arginine pathway ziet men dat er zuurstof vereist is terwijl dit bij de exogene pathway niet het geval is. Bron: Dr. Ronald Hoffman, 2021

De exogene aanvulling gebeurt voornamelijk aan de hand van nitratrijke voeding en supplementen. Rode bietensap is een geliefd product bij veel sporters, maar bevat naast nitraten ook veel andere stoffen. Echter is het wel bewezen dat het de nitraten zijn die voor de positieve fysiologische effecten zorgen. Sporters die rode bietensap met nitraat hadden ingenomen, lieten een prestatieverbetering zien, terwijl dit effect niet werd waargenomen bij de groep die een placebo bietensap kreeg, waarbij alle stoffen behalve nitraat aanwezig waren (Hoon et al., 2014).

Het absorptieproces van nitraat begint bij de inname, vaak via nitratrijk voedsel of supplementen, waarna een deel ervan in de mond door het orale microbiom wordt omgezet in nitriet. Dit gebeurt voornamelijk in de mondholte, waar bepaalde anaerobe bacteriën op de tong nitratreductase-enzymen bevatten die verantwoordelijk zijn voor deze omzetting. Onderzoek heeft aangetoond dat het spoelen van de mond met antibacteriële middelen kan leiden tot een aanzienlijke verlaging van nitrietwaarden in zowel plasma als speekselklieren, zonder de nitraatconcentraties te beïnvloeden (Govoni et al., 2008).

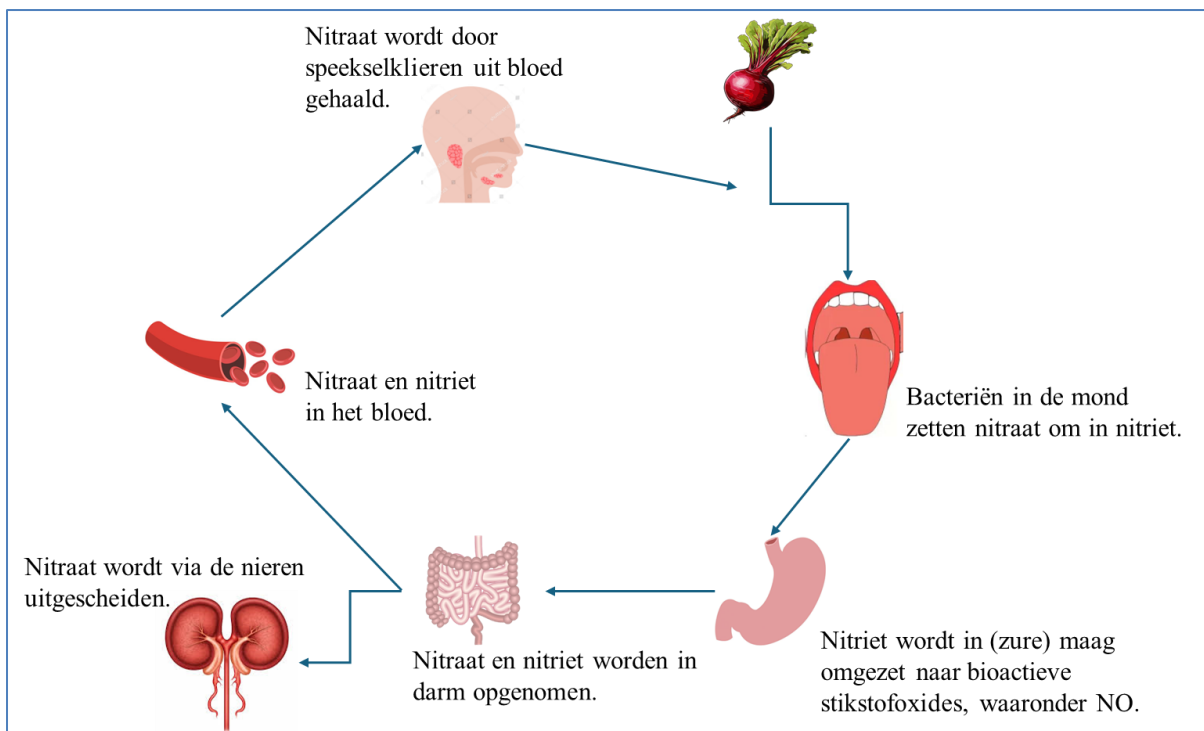
Na de omzetting in de mond worden zowel nitraat als nitriet ingeslikt en bereiken ze de maag. In de zure omgeving van de maag wordt een deel van het ingeslikte nitriet verder gereduceerd tot stikstofmonoxide (NO). Dit gebeurt op een non-enzymatische manier waarbij een waterstofaatom wordt toegevoegd, wat leidt tot de vorming van HNO₂ (waterstofnitriet) en vervolgens gevolgd door de vorming van stikstofoxiden (figuur 3). De vorming van stikstofmonoxide zou daarnaast een belangrijke rol spelen bij het beschermen van de maag tegen bepaalde ingeslikte pathogene micro-organismen (Benjamin et al., 1994; González-Soltero et al., 2020).



Figuur 3. Deze figuur geeft een schematische weergave van de omzetting van nitriet naar stikstofoxiden.

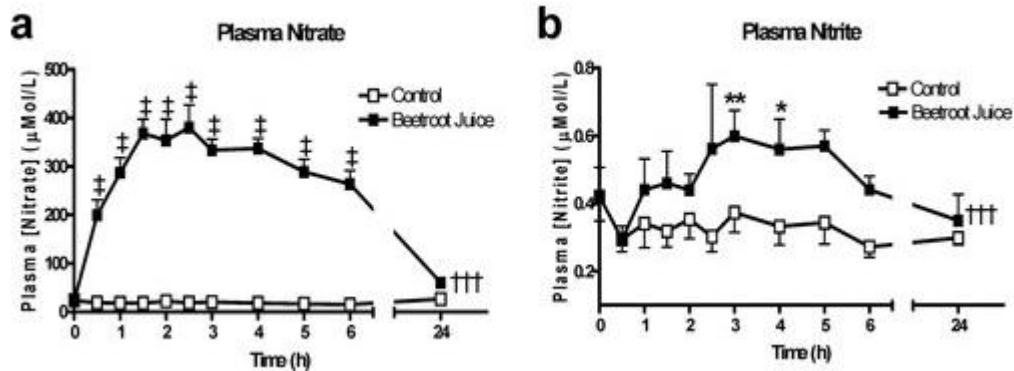
Hierna worden nitraat en nitriet opgenomen in het spijsverteringskanaal. De resterende hoeveelheid nitraat wordt via de nieren uitgescheiden in de urine. Tegelijkertijd komt een deel van het nitraat en nitriet in de systematische circulatie terecht, wat resulteert in een stijging van de plasmaconcentraties (Govoni & Lundberg, 2004). Eenmaal in het plasma wordt nitriet door verschillende reductasen omgezet. Dit omvat enzymatische reductasen zoals oxidoreductasen, deoxy-hemoglobine en myoglobine, evenals niet-enzymatische zure disproportie (Shiva et al., 2007). Dit proces wordt vergemakkelijkt in een zuurstofarme en zure omgeving (Modin et al., 2001).

Tot slot wordt een deel van het circulerende nitraat door de speekselklieren uit het bloed opgenomen en geconcentreerd in het speeksel, daar kan het de volledige circulatie opnieuw doorlopen, zie figuur 4. De dosis nitraat en nitriet in de speekselklieren is afhankelijk van de ingenomen hoeveelheid (Eisenbrand et al., 1980).



Figuur 4. bron: Weitzberg en Lundberg, 2013

Na inname van nitraat bereikt de plasmaconcentratie van NO_3^- een piek na ongeveer anderhalf uur, met voornamelijk een snelle stijging in het eerste halfuur (Webb et al., 2008; figuur 5). In tegenstelling tot nitraat bereikt nitriet pas na 2 tot 4 uur na inname van het supplement een piek in plasmaconcentratie, omdat er tijd nodig is om nitraat om te zetten in nitriet. Deze vertraging wordt ook weerspiegeld in figuur 5 (Webb et al., 2008). Normale plasmaconcentraties van nitraat liggen tussen de 20 en 40 $\mu\text{M}/\text{L}$ en kunnen bij suppletie toenemen tot ongeveer 430 $\mu\text{M}/\text{L}$. Voor nitriet liggen deze waarden tussen de 110 en 140 nM/L , en ze kunnen vergelijkbaar stijgen na suppletie tot ongeveer 600 nM/L (Govoni & Lundberg, 2004). Bovendien keren zowel de nitraat- als de nitrietconcentraties na verloop van tijd (ongeveer 24 uur) terug naar hun oorspronkelijke waarden.



Figuur 5. bron: Webb et al., 2008

1.3.2 Distributie

Met een beter inzicht in hoe nitraat wordt opgenomen en omgezet tijdens het absorptieproces, is de focus nu gericht op de verspreiding van nitraat en nitriet door het lichaam. Zowel nitraat als nitriet dienen als opslagvormen of voorlopers die in het lichaam worden omgezet tot NO, de stof die uiteindelijk voor de biologische effecten zal zorgen.

Nadat nitraat is omgezet in nitriet, wordt nitriet zelf via de bloedbaan verdeeld naar verschillende organen, zoals de lever of het hart. Daar zorgen verschillende nitrietreductasen, zoals XOR (xanthine oxidoreductase), aldehyde oxidase of deoxyhemoglobine (in het bloed), voor de omzetting van nitriet in stikstofmonoxide. De precieze werking hiervan wordt verder besproken in het gedeelte over metabolisme, maar dit geeft alvast een inzicht in hoe de verspreiding door het lichaam verloopt.

Aangezien we in deze thesis focussen op spiervezeltype en de invloed op het prestatiebevorderend effect van nitraat-suppletie is het vanzelfsprekend dat er in dit deel van de thesis gefocust wordt op de opname en opslag van nitraat en nitriet in de spieren. Een van de eerste studies die dit onderzocht was een dierlijke studie op ratten. De nitraat en nitrietwaarden in de skeletspieren werden onderzocht en men vond een significant hogere waarde voor nitraat in het spierweefsel in vergelijking met het bloed en andere organen zoals de lever. De variatie van nitriet bleek iets minder in de verschillende weefsels (Picknova et al., 2015).

Een tweede studie onderzocht of er wel degelijk een transport en opslag was van exogeen gesupplementeerd nitraat in ratten. De bedoeling van de studie was om ratten een verschillend

dieet te geven, een dieet met veel nitraat en één zonder nitraat. Uit de studie bleek dat de ratten met het nitraatrijk dieet een stijging hadden van nitraat in het spierweefsel. Het omgekeerde werd gezien bij een nitraatarm dieet, dit wijst op het transport van exogeen nitraat naar de spieren (Gilliard et al., 2018).

Ook bij mensen wordt exogeen nitraat opgenomen in de spieren. In een recent onderzoek door Kadach et al. (2023) werden spierbiopsieën genomen bij 10 proefpersonen, zowel vóór als 1 en 3 uur na het innemen van gelabeld nitraat. Een uur na het innemen van nitraat steeg de hoeveelheid nitraat in de spieren van 35 naar 147 nmol/g. Bijna al het gestegen nitraat was gelabeld en dus exogeen ingenomen. Exogeen toegediend nitraat wordt dus daadwerkelijk naar de spieren getransporteerd. Dit nitraat, dat in het bloed circuleert, wordt ter hoogte van het spierweefsel uit het bloed gehaald door anion-transporters en, in iets mindere mate, door diffusie. Er zijn meerdere transportmechanismen die nitraat in het spierweefsel kunnen transporteren.

Een eerste mechanisme is de nitraattransporter sialine, die verondersteld wordt ook werkzaam te zijn in het speeksel en het spijsverteringsstelsel (Qin et al., 2012). Sialine vindt men voornamelijk terug in de myotubes en myoblastcellen. Het staat bekend als een nitraattransporter en de functie ervan werd aangetoond in de studie van Srihirun et al (2018). In deze studie werd de expressie van sialine onderdrukt in de myoblasten. Men zag vervolgens dat de opname van nitraat in myoblasten significant afnam in vergelijking met cellen waarbij sialine niet onderdrukt werd. Dat wijst op de rol van dit eiwit bij de opname van nitraat in de myoblasten. Echter zag men wel dat de opname van nitraat niet volledig geïnhibeerd was, wat wijst op de werking van andere transporters zoals CLC-1 voor de opname van nitraat.

Naast sialine is er dus ook een chloride kanaal proteïne 1 (CLC-1) gemedieerd nitraat transport aanwezig aan het celoppervlak van de skeletspieren om nitraat in de spieren te transporteren (Rychkof et al., 1998). Deze transporter is enkel aanwezig in de cellen van spierweefsel en komt verder niet voor in andere organen.

Aangezien deze transporters verantwoordelijk zijn voor het transport van nitraat naar de spieren, kunnen we verwachten dat de piek van de nitraatconcentratie in het spierweefsel later optreedt dan in het plasma. Dit werd aangetoond in een studie waarin de concentratie in de vastus lateralis van de quadriceps werd gemeten bij 11 gezonde personen na nitraatsuppletie

(KNO₃) en bij 5 personen die een placeboprodukt kregen (KCL). De piekconcentratie in de spier werd gemiddeld na 3 uur bereikt, met een piek van ongeveer 181 nmol/g, wat later is dan de piek in het plasma (Kadach et al., 2022).

1.3.3 Metabolisme

1.3.3.1 L-arginine oxide pathway

Arginine staat bekend als een veelzijdig semi-essentieel aminozuur dat voornamelijk fungeert als voorloper van verschillende eiwitten, waaronder ureum, glutamaat, creatine, agmatine, polyamines, proline en stikstofmonoxide. Het kan via voeding worden opgenomen en komt in grote hoeveelheden voor in zeevruchten, watermeloen sap, noten, zaden, algen en vlees (King et al., 2008). Daarnaast kan L-arginine ook endogeen worden aangemaakt, waarop er in deze paragraaf vooral gericht zal worden. Vervolgens zijn wij vooral geïnteresseerd in L-arginine als voorloper van stikstofmonoxide en zullen daarom dieper ingaan op deze pathway.

Zoals reeds eerder vermeld dient de endogene L-arginine oxide pathway als een grote bron voor de synthese van stikstofmonoxide (NO), in aanwezigheid van zuurstof. Deze endogene pathway wordt tot stand gebracht door de interactie tussen de aminozuren L- citrulline en L- arginine. Het is bekend dat verschillende organen en cellen een rol spelen binnen de endogene synthese van L-arginine, maar de nieren worden beschouwd als de belangrijkste spelers op dit gebied (Dhanakoti et al., 1990).

De nieren filteren L-citrulline uit het bloed en zetten het vervolgens om in L-arginine, een proces dat afhankelijk is van de enzymen argininosuccinaat synthase en argininosuccinaat lyase. Deze enzymen bevinden zich in de cortex van de nier, dat is dan ook waar de omzetting plaatsvindt (dhanakoti et al. , 2008; Wakui et al., 1992). Na de synthese van L-arginine wordt het aminozuur terug uitgescheiden door de nieren in het lichaam.

Extracellulair L-arginine wordt vervolgens opgenomen in de endotheelcellen. In de aanwezigheid van moleculair zuurstof en nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat (NADPH) ondergaat het aminozuur vervolgens een oxidatiereactie die leidt tot de vorming van stikstofmonoxide (Schmidt et al., 1988; Moncada en Higgs, 2012). Dit proces is een complexe reactie die wordt gekatalyseerd door NOS-enzymen (stikstofmonoxide synthasen), die op hun beurt specifieke actieve bindingsplaatsen bezitten voor interactie met L-arginine. Er zijn drie

verschillende isovormen van NOS, namelijk neuraal NOS (nNOS) (type I), induceerbare NOS (iNOS) (type II) en endotheel NOS (eNOS) (type 3) (Smiljić et al., 2014). Vanuit een sportprestatieperspectief is eNOS bijzonder interessant omdat het aanwezig is in de endotheelcellen van bloedvaten, waar het verantwoordelijk is voor de productie van NO. Dit stikstofmonoxide vervult diverse functies in het cardiovasculaire systeem.

1.3.3.2 Nitraat- nitriet- NO pathway

Bij intensieve lichamelijke inspanningen zien we een shift van de L-arginine pathway naar de nitraat-nitriet-NO pathway, die gestimuleerd wordt door een geleidelijke daling van de zuurstofconcentratie, ook wel hypoxie genoemd. Deze pathway kan worden beschouwd als een alternatieve manier waarop NO geproduceerd wordt in afwezigheid van voldoende zuurstof, in vergelijking met de eerder genoemde pathway die verband houdt met het aminozuur L-arginine.

Naast de niet-enzymatische omzetting van nitriet naar NO in de maag is het voor onze thesis belangrijk om te kijken naar het metabolisatieproces in de spieren en het plasma. In deze weefsels wordt nitraat op een enzymatische manier omgezet in nitriet en vervolgens verder gemetaboliseerd in stikstofmonoxide. Deze omzetting wordt mogelijk gemaakt door eiwitten en nitraat- en nitrietreductase-enzymen. Het meest voorkomende voorbeeld hiervan is xanthine oxidoreductase (XOR) (Millar et al., 1998). Daarnaast zullen we ook aldehyde oxidase (AO), sulfietoxidase (SO) en mitochondriale amidoxidereducerende component (mARC) bespreken (Sparacino et al., 2014). Hoewel deze enzymen overvloedig aanwezig zijn in de lever, worden ze ook in zekere mate aangetroffen in alle weefsels van zoogdieren. Bovendien spelen deoxyFeII-eiwitten, zoals hemoglobine in het bloed (Cosby et al., 2003) en myoglobine in de spieren (Rassaf et al., 2007; Shiva et al., 2007), een rol bij dit proces.

Ten eerste behandelen we de rol van xanthine oxidoreductase (XOR) in de nitraat-nitriet-NO-route. In een onderzoek uitgevoerd door Millar et al. (1998) werd de functie van XOR bij de reductie van nitraten en nitrieten tot stikstofmonoxide (NO) onder hypoxische omstandigheden onderzocht. De onderzoekers voerden experimenten uit met geïsoleerde enzymen onder gecontroleerde laboratoriumomstandigheden om hypoxie na te bootsen. Ze ontdekten dat XOR in staat is om de reductie van nitraten en nitrieten naar NO te katalyseren, zelfs in afwezigheid van voldoende zuurstof (Millar et al., 1998). Daarnaast vond een recent onderzoek ook dat

XOR aanwezig was in de spieren van ratten. Interessant genoeg werd gevonden dat de hoeveelheid van aanwezig XOR in de spieren ongeveer 1,5 keer verhoogd was, na een periode van 21 dagen, waarin de ratten gedurende 5 opeenvolgende dagen werden gesuppleerd met nitraat. Deze bevinding suggereert dat de enzymactiviteit kan worden beïnvloed door suppletie met nitraat (Park et al., 2021). Echter is er wel nog verder onderzoek nodig om de mechanismen en de relevantie bij mensen te begrijpen.

Het tweede enzym dat we in deze paragraaf dieper zullen bekijken is aldehyde oxidase (AO). Om de functie van AO in de nitraat-nitriet-NO pathway te bestuderen werd een onderzoek opgesteld waar men gebruik maakte van een inhibitor van aldehyde oxidase, namelijk raloxifene. Resultaten toonden aan dat in aanwezigheid van raloxifene de NO-generatiesnelheid in de lever tot ongeveer 0,46 nm/s afnam, wat overeenkomt met ongeveer 38% remming. Daarnaast werd gevonden dat de NO-generatiesnelheid in het hart afnam tot 0,4 nm/s, wat overeenstemt met ongeveer 35% remming (Li et al., 2008). Dit duidt op de rol van aldehyde-oxidase als katalysator bij de reductie van nitraat tot stikstofmonoxide.

Sulfietoxidase (SO) is een derde enzym dat, net als XOR en AO, in staat is om nitriet te reduceren tot NO (Wang et al., 2015). Daarnaast zijn er de mitochondriale eiwitten mARC1 en mARC2, waarvan de precieze rol in het lichaam nog niet volledig begrepen is. Beide isovormen ARC1 en ARC2, hebben het vermogen om nitriet te reduceren als enzym wanneer ze in hun gereduceerde vorm voorkomen. Onderzoeksresultaten tonen aan dat de snelheid van NO-vorming bijna 3 keer toeneemt wanneer de pH wordt verlaagd van 7.5 naar 6.5 (Sparacino et al., 2014). Dit wijst erop dat een zure omgeving bevorderlijk is voor de nitraat-nitriet-NO pathway.

Ten slotte spelen ook hemoglobine en myoglobine een rol in de omzetting van nitraat naar stikstofmonoxide. Hemoglobine bevordert de omzetting van nitriet naar stikstofmonoxide in het bloed. Onderzoek heeft aangetoond dat bij een lage zuurstofsaturatie van hemoglobine (deoxyhemoglobine), nitriet een krachtigere vaatverwijding veroorzaakt. Dit effect wordt echter verminderd bij hogere zuurstofsaturaties van hemoglobine (oxyhemoglobine). Dit suggereert dat deoxyhemoglobine een hogere affiniteit heeft voor nitriet en het efficiënter kan omzetten in stikstofmonoxide, wat resulteert in een krachtigere vaatverwijding. Verder onderzoek heeft aangetoond dat deoxyhemoglobine de expressie en activiteit van enzymen die betrokken zijn bij de omzetting van nitriet naar stikstofmonoxide verhoogt, waardoor het

vermogen van deoxyhemoglobine om nitriet te verwerken en stikstofmonoxide vrij te geven wordt versterkt. Dit alles suggereert dat in situaties zoals hypoxie, nitriet een effectieve bron of precursor kan zijn voor de vorming van NO (Isbell et al., 2007).

Vervolgens zal myoglobine een rol spelen in de spieren voor de omzetting van nitriet naar NO. Uit onderzoek blijkt namelijk dat deoxymyoglobine in staat is om nitriet aanzienlijk sneller te reduceren dan andere hemoglobine-achtige eiwitten. De reactie tussen deoxymyoglobine en nitriet is een reactie die afhankelijk is van de concentratie deoxymyoglobine, nitriet en protonen (Shiva et al., 2007).

Om deze paragraaf af te sluiten geven we graag nog mee dat het hele metabolisatieproces van nitraat een complex gegeven is waar heel wat enzymen, eiwitten, organen en cellen een rol in spelen. Er is momenteel veel onderzoek naar deze pathway en we zijn ervan overtuigd dat nog niet alles tot in detail geweten is en dat er doorheen de jaren nog heel wat info vergaard zal worden omtrent dit onderwerp. Wel valt het al op dat bijna al deze processen vlotter lijken te verlopen in een zuurstofarme omgeving of omgeving met een lage PH-waarde. Dat is een belangrijke opvatting om in het achterhoofd te houden bij lezen van deze thesis.

1.3.4 Spieren als reservoir

In het deel over distributie werd er aangehaald dat de nitraatwaarden in spierweefsel hoger zijn tegenover plasma en andere organen bij ratten, de verschillen in nitrietwaarden waren dan weer minder groot (Picknova et al., 2015). Deze ontdekking en de aanwezigheid van een nitraatgradiënt van spier naar bloed, heeft geleid tot de hypothese dat spieren mogelijk dienen als opslagbron voor nitraat (Jones et al., 2021). In de voorgaande delen rond distributie, absorptie en mechanismen hebben we al wat info vergaard rond dit topic, maar in deze paragraaf zullen we hier dieper op ingaan.

Voorheen werd gedacht dat de lever en het bloed de belangrijkste plaatsen waren voor het verwerken van stikstofmonoxide (NO) in het lichaam van zoogdieren. Echter, tot voor kort werd er weinig aandacht besteed aan de grote hoeveelheid spierweefsel in skeletspieren bij het bestuderen van de NO-cyclus. Dit ondanks het feit dat we al lang weten dat er aanzienlijke niveaus van actieve neuronale NOS (nNOS of NOS1) in de spieren aanwezig zijn. (Picknova

et al., 2015). Skeletspieren bevatten dus de benodigde mechanismen om nitraat om te zetten naar NO.

De eerder vermelde studie van Gilliard et al. uit 2018, waar men een onderzoek uitvoerde op ratten om de nitraat niveaus te bepalen gaat echter ook over het 'supercompensatie effect'. De studie ging namelijk te werk met een groep ratten die gedurende zeven dagen een dieet kregen met zo min mogelijk nitraat om zo het nitraatreservoir in de spieren uit te putten. Hierna kregen ze een dieet met veel nitraat aangeboden, opnieuw gedurende zeven dagen. Men zag dat de nitraatniveaus binnen de drie dagen hersteld waren naar hun oorspronkelijke waarden. Na deze drie dagen merkte men op dat de nitraatwaarden niet alleen de spier-nitraatniveaus van de oorspronkelijke niveaus overschreden, maar ook de niveaus die werden gemeten bij een aparte groep die een dieet met veel nitraat kreeg zonder initiële nitraatdepletie. Deze resultaten wijzen op de “supercompensatie” van nitraat-niveaus na een nitraatdepletie. Dit is vergelijkbaar met de spierglycogendepletie die al eerder aangetoond werd (Ahlborg et al. 1967).

De aanwezigheid van de lokale opslag van nitraat in spierweefsel zal mogelijk dus bijdragen aan NO-gerelateerde samentrekkings-, metabolische en vasculaire processen. Spierweefsel zal mogelijks verder niet enkel fungeren als een passief reservoir voor de levering van nitraat aan andere organen via de bloedbaan, maar zou daarnaast ook in staat kunnen zijn om situ gebruik te maken van het eigen nitraatreservoir. Zoals eerder besproken werd bij ratten tijdens inspanning een afname van nitraatniveaus en een toename van nitrietniveaus in skeletspieren waargenomen (Piknova et al., 2016), wat suggereert dat opgeslagen nitraat in skeletspieren een belangrijke bron is van tijdens inspanning gegenereerd NO.

In tegenstelling tot de studies op muizen en ratten, zitten de studies rond nitraatopslag bij de mens nog in het beginstadium. Er is nog heel wat onderzoek nodig om de kennis hier rond uit te breiden. In de studie van Kadach et al. (2022), zag men dat proefpersonen na het acut innemen van nitraat een drievoudige stijging hadden van de nitraatwaarden in de spier ten opzichte van de baseline waarden. Maar na 9 uur zouden deze waarden weer gelijk zijn aan de baseline waarden vooraf. Daarnaast zag men dat, in tegenstelling tot nitraat, de nitrietwaarden in de spier niet significant gestegen waren.

Verder werd er bij de vergelijking van de nitraatconcentraties in de vastus lateralis-spier en in het bloed geen significant verschil gevonden. Zowel voor als na nitraatsuppletie was de

nitraatconcentratie in de spier vergelijkbaar met die in plasma. Er werd geen bewijs gevonden voor langdurige nitraatopslag in menselijke spieren, aangezien de niveaus van NO₃- in zowel spieren als bloed 24 uur na inname terugkeerden naar de basislijn. Hoewel deze resultaten de hypothese van spier-nitraatopslag in twijfel trekken, zijn ze specifiek voor de vastus lateralis-spier en mogelijk niet representatief voor het hele lichaam. Bovendien was dit een acute interventie, wat verdere studie vereist voor conclusies op lange termijn.

1.3.5 Invloed op sportprestaties

1.3.5.1 Nitraat heeft ergogene effecten in de sportcontext

In 2007 werd de rol van de suppletie van nitraat voor het eerst onderzocht in de context van sport door Larsen et al. In deze studie liet men 9 gezonde, jonge, getrainde mannen een submaximale en maximale fietstest afleggen nadat ze voor de test 3 dagen nitratozouten innamen. Men zag dat de zuurstofkost verminderd was met 5% bij de submaximale test maar in VO₂ max vond men geen verschil. Naast het zuurstofverbruik onderzocht men ook andere parameters zoals lactaat, hartslag, ventilatie en RER maar daar vond men geen significante verschillen tussen de nitraat en -controlegroep.

Deze interessante bevinding werd ook door Bailey et al. bevestigd in 2009 maar dan met de suppletie van rode bietensap en aan de hand van een cross-overstudie waarbij men 8 mannelijke recreanten 6 dagen bietensap of een placebo liet innemen. Op de drie laatste dagen van de suppletieperiode werd er een stappen-protocol uitgevoerd op de fiets aan submaximale intensiteit en een fietstest aan een hoge intensiteit. Tijdens de submaximale test zag men dat de stijging in zuurstofgebruik, die gepaard ging met de start van de inspanning, verminderd was met 19% bij de bietensap conditie. Ook was bij de intensieve inspanningstest de tijd tot uitputting verlengd van 583s bij de placebo conditie naar 675s bij de nitraat conditie. De daling van de zuurstofkost bij een inspanning met eenzelfde vermogen zette wetenschappers aan het denken en leidde tot de volgende hypothese: ‘men kan door suppletie met nitraat een hoger vermogen produceren voor hetzelfde verbruik aan O₂ en zo kan men een bepaalde afstand in een kortere tijdspanne afleggen’.

Dit werd bevestigd door Lansley et al. (2011), die onderzochten hoe het drinken van 0,5 liter bietensap 2,5 uur voor de test de prestaties van negen recreatieve mannelijke fietsers

beïnvloedde. De fietsers voerden zowel een 4 km als een 16 km tijdrit uit op een fietsergometer. Uit de resultaten bleek dat het gemiddelde vermogen significant toenam, wat leidde tot een prestatieverbetering van respectievelijk 2,8% en 2,7%. Cermak et al. (2012) ondersteunden deze bevindingen door het effect van chronische nitraatsuppletie te onderzoeken. Twaalf recreatief getrainde fietsers kregen gedurende zes dagen 8 mmol nitraat per dag. Vervolgens fietsten zij 60 minuten op submaximale intensiteit en legden daarna een 10 km tijdrit af. Ook hier was er sprake van een toename van het gemiddelde vermogen met 2,1% en een prestatieverbetering van 1,2% tijdens de tijdrit. Daarnaast werd een daling van het submaximale zuurstofverbruik waargenomen, respectievelijk 3,5% en 2%, bij 45% en 65% van het maximale vermogen tijdens de submaximale test.

Uit voorgaande studies kunnen we dus aannemen dat suppletie met nitraat een positief effect kan hebben op de prestaties van recreatief getrainde sporters bij duurinspanningen. Het gaat hier dan voornamelijk over een verbetering van het vermogen, de prestatie en de tijd tot uitputting bij hoog intensieve testen. Terwijl er bij submaximale testen vooral een daling van het zuurstofverbruik te zien is.

1.3.5.2 Acut vs chronisch

In eerdere studies is aangetoond dat zowel chronische (gedurende 3-6 dagen) als acute suppletie met nitraat een positief effect kan hebben op de prestaties (Bailey et al., 2009; Cermak et al., 2012; Lansley et al., 2011). Echter, er is nog weinig onderzoek gedaan naar mogelijke verschillen in effect tussen chronische en acute suppletie. In een studie uit 2010 hebben Vanhatalo et al. geprobeerd om de effecten van meerdaagse suppletie te onderzoeken. Deze gebalanceerde, gerandomiseerde, dubbelblinde cross-overstudie omvatte een washoutperiode van 10 dagen en betrof 8 gezonde deelnemers die een incrementele ramp test uitvoerden. De proefpersonen werden getest na 2.5 uur, 5 dagen en 15 dagen suppletie. In vergelijking met de placebogroep verminderde de 'steady-state' VO_2 tijdens matige lichaamsbeweging met ongeveer 4% na 2.5 uur, een effect dat vergelijkbaar was na 5 en 15 dagen (3-4%) BR-suppletie. Echter, alleen na 15 dagen nitraatinnname werd een significant hogere piekvermogenoutput waargenomen ten opzichte van de baseline (5.4%-11%). Deze studie suggereert dat zowel acute als chronische suppletie met nitraat een positief effect kan hebben op prestaties, met mogelijk meer uitgesproken voordelen na langdurige suppletie. Echter,

verdere onderzoeken zijn nodig om de langetermijneffecten en mogelijke verschillen tussen acute en chronische suppletie beter te begrijpen.

1.3.5.3 Ergogene effecten en trainingsstatus

De vraag is dan, heeft nitraat ook een ergogeen effect op de prestaties van elite atleten? Elite atleten zijn door en door getraind en kunnen zoals eerder vermeld veel baat hebben bij een kleine verbetering. Om die reden heeft men de laatste jaren het effect van de suppletie van nitraat onderzocht bij doorgedreven getrainde elite atleten. In tegenstelling tot de sub-elite, zag men vaak geen ergogene effecten terugkeren bij prestaties met betrekking tot uithouding bij elite atleten na acuut of kort chronisch (3 dagen) te supplementeren met nitraat (Bescos et al., 2012; Peacock et al., 2012; Wilkerson et al., 2012).

Er zijn verschillende factoren die kunnen verklaren waarom het ingenomen nitraat mogelijk niet ergogeen werkt in deze context. Een mogelijke verklaring is dat de basale nitrietwaarden in het plasma van elite-atleten ongeveer 33% hoger zijn dan bij sub-elite atleten (Jungersten et al., 1997; Lansley et al., 2011; Wilkerson et al., 2012). Dit zou kunnen komen door een verhoogde NOS-activiteit, wat wijst op een beter getrainde L-arginine route. Aangezien nitriet vooral wordt omgezet in stikstofmonoxide onder omstandigheden van lage zuurstofdruk, en elite-atleten doorgaans een betere spiercapillarisation hebben (Jensen et al., 2004), kan verwacht worden dat er meer zuurstof beschikbaar is in de spieren, wat de NOS-activiteit verder verhoogt. Beide pathways, de NOS-route en de nitraat-nitriet-NO-route, vullen elkaar aan, wat suggereert dat beter getrainde atleten mogelijk minder afhankelijk zijn van de nitraat-nitriet-NO-route. Dit wordt ondersteund door bevindingen van Porcelli et al. (2015), die aantoonde dat individuen met een betere aerobe conditie minder baat hadden bij nitraatsuppletie. Bij deze groep werd een lagere stijging van nitraat- en nitrietconcentraties in het plasma waargenomen, wat kan verklaren waarom zij minder voordeel halen uit exogeen nitraat.

1.3.5.4 Langdurige submaximale inspanning

In de studie van Wilkerson et al. (2012) namen goed getrainde fietsers acuut 0,5 l rode bietensap in 2,5h voor een tijdrif van 80 km, een aanzienlijk grotere afstand dan in voorgaande studies. Het ging om een gerandomiseerd, enkel blind crossover design met een washout periode van 7 dagen. Er was geen verbetering te zien van prestatie in de bietensap conditie ten opzichte van de placebo conditie, al was er wel een neiging tot een lagere zuurstofopname bij de bietensap conditie (een gemiddelde daling van 1,8%).

De afstand van de tijdrif zou een reden kunnen zijn voor de afwezigheid van significante effecten. Logischerwijs wordt een afstand van 80 km aan een lagere intensiteit afgelegd dan een afstand van bijvoorbeeld 10 km. Bij lagere intensiteit bevatten de spieren meer zuurstof dan bij een hoge intensiteit. Tevens zal bij een lagere intensiteit minder verzuring van de spieren optreden, waardoor minder nitriet zal worden omgezet naar stikstofmonoxide. Daarnaast is er een kans dat deze proefpersonen, die getraind zijn in fietsen, merendeels trage spiervezels bevatten. Het effect van lange duurtraining heeft namelijk een invloed op de spiervezel typologie, spiervezels maken een shift van type 2 naar type 1 spiervezels (Simoneau & Bouchard, 1995; Wilson et al., 2012). In het deel ‘spiervezeltype en nitraat’ wordt hier verder op ingegaan. Verder zag men dat er een kleinere stijging van nitriet in het plasma plaatsvond. Er waren zogenaamde ‘non-responders’. De stijging in nitriet was gemiddeld 16% terwijl bij de studie van Lansley et al. (2011), een studie met dezelfde supplementatie regimes, men een stijging zag van 138%. Tot slot ging het hier om goed getrainde atleten, dus zouden de hypothesen omtrent elite atleten in de vorige paragraaf hier mogelijk ook een rol in kunnen spelen.

1.3.5.5 De invloed op spierkracht

De laatste tijd is er naast het uithoudingsaspect steeds meer interesse in het ergogene effect van nitraat op spierkracht en krachthuithouding. Nadat men ontdekte dat nitraat de contractiliteit van de spier verbetert in muizen (Hernández et al., 2012), deze studie wordt later nog verder toegelicht, zijn er verschillende onderzoeken gepubliceerd omtrent dit onderwerp bij de mens (Coggan et al., 2015; Coggan et al., 2018; Domínguez et al., 2017; Haider and Folland; Rimer et al., 2016).

Haider and Folland (2014) waren de eerste onderzoekers die uitgebreid onderzoek deden naar de contractiliteit van de menselijke spier na suppletie van nitraat. In dit onderzoek liet men 19 gezonde ongetrainde mannen 7 dagen lang bietensap innemen. De laatste dosis bietensap werd ingenomen op de testdag waarop ze een serie van vrijwillige en elektrisch gestimuleerde isometrische contracties uitvoerden met de knie extensoren. Bij de elektrisch gestimuleerde maximale contracties zag men een significante verbetering in de explosieve kracht in de eerste 50ms van 8-14%. Daarnaast ook een verbetering van 7% in de piekkracht. In tegenstelling tot de elektrisch gestimuleerde contracties zag men bij de vrijwillige contracties geen verbeteringen.

De meeste sporten zijn natuurlijk dynamisch, het was daarom zeker ook interessant om te kijken of nitraat ook een ergogeen effect heeft op isokinetische contracties. Coggan et al. ging dit na in 2015 bij 12 gezonde mannen en vrouwen. Er werd acuut bietensap ingenomen 2 uur voordat de strekkracht van de knie werd gemeten aan verschillende hoeksnelheden. Na inname van rode bietensap werd er een toename van 4% gevonden in de maximale knie extensor kracht bij de hoogste hoeksnelheid die gemeten werd (6,28 rad/s). Ook in een gelijkaardige studie met een groter aantal proefpersonen zag men gelijkaardige resultaten. De Pmax (maximale kniestrek vermogen) steeg van 6,3 W/kg in de placeboconditie naar 6,6 W/kg in de bietensapconditie (Coggan et al., 2018). Een interessant gegeven dat in deze studie echter naar voren kwam is de interindividuele variabiliteit tussen de proefpersonen. Er was een verschil in de stijging van Pmax van -9,6% tot +26,8% in de nitraatconditie. Deze stijging was gecorreleerd met de stijging van nitriet in het plasma. Niet elke proefpersoon zal dus evenveel nitraat omzetten tot nitriet en de ergogene effecten van nitraat kunnen zo individueel heel verschillend zijn.

1.3.5.6 Lichaamsbeweging aan maximale intensiteit

Om echt te kunnen bepalen of nitraat een ergogeen effect heeft op de spiercontractiliteit bij sporten, is men verder gaan kijken dan de beweging van enkel de kniestrekkers. Er werden dan ook enkele veelbelovende resultaten gevonden. Na acute nitraatsuppletie vonden Rimer et al. (2016) een verhoogde fiets Pmax van 6% en trapfrequentie van 6,5% bij een fietstest met traagheidsbelasting. Daarnaast vonden Domínguez et al. (2017) een verhoging van 6% in piekkracht en verkorte tijd van -8,4% tot de piekkracht bij een wingate test, ook na acute suppletie. Beide studies werden afgenomen bij getrainde atleten. Verder werd de chronische

suppletie (6 dagen) van nitraat getest bij mannelijk CrossFit atleten aan de hand van een Wingate test. De proefpersonen behaalde hier ook een significante verbetering van de piek Wingate power van 889 W naar 948 W in de bietensapconditie ten opzichte van een niet-significante stijging in de placeboconditie. In de isometrische en isokinetische strekkracht van de knie zag men daarentegen geen verschil in beide condities.. Belangrijk om hier te vermelden is dat de laatste dosis nitraat de dag voor de test werd ingenomen. Het gaat hier dus eerder over chronische adaptaties (Kramer et al., 2016).

Tot slot zijn er ook enkele studies die een verbetering vonden van de sprint en intervallen aan hoge intensiteit na chronische suppletie met nitraat van 1,2 % - 3,9 % (Thompson et al., 2015; Thompson et al., 2016). Wylie et al. (2016) vond een verbetering van het gemiddeld vermogen 5% bij sprintintervallen uitgevoerd door teamsporters die 5 dagen suppletie met bietensap kregen. Opvallend was dat deze significante verbetering enkel plaatsvond bij het protocol waarbij men 5 keer 6 seconden all-out sprintte met 24s rust. Bij het protocol waarbij men 6 keer 60 seconden sprintte met 60 seconden actieve rust vond men geen significante verbetering in het gemiddeld vermogen. Nitraat suppletie zou dus mogelijks ergoegen kunnen zijn bij zeer korte intensieve inspanningen met korte rustperiodes. Dit komt overeen met het beweegpatroon in verschillende teamsporten.

1.3.5.7 Geslachtsspecifieke verschillen

Geslachtsspecifieke verschillen in de effectiviteit van nitraatsuppletie zijn een belangrijk en onderbelicht aspect binnen het onderzoek naar de ergogene effecten van nitraat. De meeste studies hebben zich traditioneel gericht op mannelijke participanten (Bailey et al., 2009; Cermak et al., 2012; Lansley et al., 2011; Larsen et al., 2007), waardoor er mogelijk geslachtsverschillen over het hoofd zijn gezien. Zo blijkt bijvoorbeeld uit de studie van Coggan et al. (2018), dat vrouwen mogelijk beter reageren op nitraatsuppletie dan mannen, met een grotere toename in maximale kracht (P_{max}) bij vijf van de zeven vrouwelijke deelnemers. Deze studie suggereert dat vrouwen meer baat kunnen hebben bij nitraatsuppletie, vooral in de context van maximale krachtontwikkeling.

Daarentegen heeft onderzoek naar de effecten van nitraatsuppletie bij vrouwen gemengde resultaten opgeleverd. In enkele specifieke studies gericht op vrouwelijke atleten werden geen significante prestatieverbeteringen gevonden na suppletie, wat zou kunnen duiden op een

verminderde effectiviteit van nitraat als ergogeen middel bij vrouwen (Buck et al. 2015; Wickham et al. 2019). Bovendien wijzen gegevens uit enkele meta-analyses erop dat het algehele effect van nitraatsuppletie bij vrouwen minder uitgesproken is in vergelijking met mannen of gemengde groepen (Senefeld et al. 2020).

Mogelijke verklaringen voor deze verschillen tussen mannen en vrouwen kunnen van verschillende aard zijn. Vrouwen hebben bijvoorbeeld over het algemeen een lagere diastolische en systolische bloeddruk, wat kan leiden tot kleinere bloeddrukverlagingen na nitraatsuppletie (Wickham et al., 2019). Ten tweede zou het verschil te maken kunnen hebben met hormonale factoren zoals progesteron. Progesteron, een hormoon dat vooral bij vrouwen voorkomt en tijdens de menstruatiecyclus en zwangerschap verhoogd is, kan de productie van stikstofmonoxide onderdrukken (Scichilone et al. 2013). Ook andere antropometrische, fysiologische en metabolische factoren kunnen het verschil tussen mannen en vrouwen misschien verklaren, denk maar aan een grotere relatieve proportie van Type I spiervezels bij vrouwen (Haizlip et al. 2015) of hogere hemoglobine levels bij mannen (Murphy et al. 2014).

Deze bevindingen benadrukken de noodzaak van verder onderzoek naar de invloed van geslacht op de effectiviteit van nitraatsuppletie, met name omdat vrouwen ondervertegenwoordigd zijn in dit onderzoeksveld. Toekomstige studies moeten deze ondervertegenwoordiging aanpakken en rekening houden met de specifieke fysiologische kenmerken van vrouwelijke deelnemers om een beter begrip te krijgen van hoe nitraat als prestatieverhogend middel kan worden geoptimaliseerd voor beide geslachten.

1.3.6 Mechanismen

Stikstofmonoxide (NO) speelt een belangrijke rol op fysiologisch niveau, het is dan ook niet verrassend dat er verschillende mechanismen zijn die het ergogene effect ervan op sportprestaties proberen te verklaren. Een van deze mechanismen is het vaatverwijdende effect van NO, wat resulteert in een verbeterde bloedstroom, waardoor er meer zuurstof naar actieve skeletspieren kan worden gebracht. Ferguson et al. (2012) toonden dit aan in een dierstudie waarin muizen gedurende 5 dagen rode bietensap kregen toegediend. Vervolgens legden de muizen een submaximale looptest af op een loopband. Uit de studie bleek dat de bloeddruk tijdens de test significant lager was, namelijk 8%, bij de muizen die bietensap hadden gekregen. Bovendien werd er een grotere bloedstroom waargenomen in de skeletspieren van de achterpoot en een verbeterde vasculaire geleiding van respectievelijk 28% en 33%. Dit suggereert dat een verhoogde zuurstoftoevoer naar de skeletspieren kan leiden tot een beter behoud van het spiermetabolisme en daardoor de vermoeidheid van de spier kan uitstellen. Het is belangrijk om te vermelden dat deze vasculaire effecten enkel in snelle spiervezels werden teruggevonden.

Hoewel het voorgaande mechanisme zich extracellulair afspeelt, vinden de meeste onderzochte mechanismen van NO intracellulair plaats of met andere woorden: in de spier. Deze intracellulaire mechanismen zullen hier uitvoerig besproken worden.

Ten eerste, het phosphocreatinesysteem, dit is een belangrijke energiebron voor korte, intense inspanningen zoals sprinten of gewichtheffen. Onderzoek suggereert dat NO de efficiëntie van het phosphocreatinesysteem kan verbeteren, wat resulteert in een verbeterde energieproductie tijdens dergelijke inspanningen. Dit mechanisme is te danken aan een lagere activiteit van ATP-ase door NO. Hierdoor wordt er minder ATP geproduceerd, waardoor het fosfaatgebonden creatine (Pcr) kan worden gespaard. Bovendien leidt de lagere ATP-ase activiteit door NO tot minder accumulatie van adenosinedifosfaat (ADP) en anorganisch fosfaat (P), stoffen die normaal gesproken vermoeidheid induceren bij een intensieve inspanning. Dit betekent dat NO de ophoping van vermoeidheidsgerelateerde stoffen kan verminderen, waardoor de spier langer op een hoger prestatieniveau kan blijven.

Deze veranderingen in het energiesysteem van de spier werden bevestigd door Bailey et al. (2010). In deze studie namen deelnemers gedurende zes dagen rode bietensap in, waarna zij zowel een lage- als hoge-intensiteitstest uitvoerden op een ergometer. De resultaten lieten zien

dat er een zuiniger gebruik van fosfocreatine (Pcr) plaatsvond en dat er minder accumulatie van ADP en fosfaat (P) was. Op basis van deze bevindingen concludeerden de onderzoekers dat nitraatsuppletie invloed heeft op de energieproductie die nodig is voor het leveren van spierkracht.

Bovenstaande vaststelling is niet de enige mogelijke verklaring waarom het energiemetabolisme in de spier wordt beïnvloed. De suppletie van nitraat zou ook een invloed hebben op de mitochondriale efficiëntie en spieroxygenatie. Een van de mogelijke mechanismen die hierbij een rol speelt, is de verandering in de aanwezigheid van adenine nucleotide translocase (ANT). Onderzoek heeft aangetoond dat na drie dagen nitraattoediening de aanwezigheid van ANT in de mitochondriën afneemt (Larsen et al., 2011). ANT is een eiwit dat zich in het membraan van de mitochondriën bevindt en verantwoordelijk is voor het transport van adenine nucleotiden. Het speelt ook een rol in het handhaven van de elektrochemische gradiënt in het binnenmembraan van de mitochondriën.

De reden waarom ANT minder voorkomt bij nitraatsuppletie is volgens Larsen et al. (2011) dat NO bindt aan cytochroom c oxidase (COX), een enzym dat een belangrijke rol speelt bij de energielevering in de mitochondriën. Door de binding van NO aan COX wordt de activiteit van COX geremd, wat de cel kan waarnemen als een lichte hypoxie (zuurstoftekort). Als reactie hierop wordt de expressie van ANT verminderd, wat resulteert in een verminderde "lek"-ademhaling, dat is een lager verlies van protonen in het binnenmembraan van de mitochondriën. Door de waargenomen 'hypoxie' denken de mitochondriën dus dat ze moeten compenseren om dit 'zuurstoftekort' tegen te gaan door efficiënter te werken. Dit resulteert in minder energieverlies tijdens het proces van oxidatieve fosforylering, dat verantwoordelijk is voor de productie van ATP.

Een ander intracellulair mechanisme waarbij NO betrokken is, is de regulatie van de calciumgevoeligheid. Calcium speelt een cruciale rol bij spiercontractie. Tijdens het sporten is de Ca_2^+ -ATPase een grote bron van energie (Barclay et al. 2007). Wetenschappers wilden daarom weten of NO effectief een invloed had op de Ca_2^+ -ATPase door te kijken naar de expressie van de eiwitten die betrokken zijn bij dit proces tijdens spiercontractie. Er werden dan ook veelbelovende resultaten gevonden bij een dierstudie. Hernandez et al. (2012) vond een verbetering van de contractiele functie bij geïsoleerde snelle spiervezels van muizen (met elektrische stimulatie) die 7 dagen nitraatzouten toegediend kregen. De snelheid waarop de kracht ontwikkeld werd was 35% sneller in de nitraat conditie. Bij deze muizen zag men ook

dat er in het sarcoplasmatisch reticulum van de snelle spiervezels een stijging was van calciumionen. Daarnaast zag men een stijging in de expressie van calsequestrine 1 en de dihydropyridine receptor, eiwitten die betrokken zijn bij het beheer van Ca^{2+} .

Hoewel deze bevindingen veelbelovend waren, was het nog onbekend hoe het beheer van calcium veranderde bij mensen. Een onderzoek uitgevoerd door Whitfield et al. (2017) onderzocht dit mechanisme bij 8 recreatief actieve mannen. Zij kregen gedurende 7 dagen nitraat toegediend in de vorm van rode bietensap, waarna de contractiele eigenschappen van de vastus lateralis werden gemeten. Ook hier werd een verbetering in de contractiele functie met elektrische stimulatie waargenomen na suppletie met nitraat. In tegenstelling tot de muizenstudie werden er echter geen verschillen gevonden in de concentraties van eiwitten die betrokken zijn bij het beheer van calcium, zoals calsequestrine 1 en de dihydropyridine receptor. Op basis van deze bevindingen vermoedt men dat NO mogelijk geen invloed heeft op de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij het beheer van calcium bij mensen, in tegenstelling tot de bevindingen bij muizen.

Hoe het dan wel komt dat NO invloed heeft op de werking van Ca^{2+} wordt beschreven door Coggan & Peterson (2018). Ryanodine receptor 1 (RyR1) zou door NO geactiveerd worden en zo het vrijgeven van Ca^{2+} bevorderen in condities met een lage O_2 druk, bijvoorbeeld in de actieve skeletspier. Het gevolg hiervan is meer Ca^{2+} in de spieren. Daarnaast zou NO ook zorgen voor een hogere Ca^{2+} gevoeligheid. Dit gebeurt via een specifiek enzym, myosine lichte keten kinase (MLCK). Dit specifieke enzym bevordert de fosforylering van de myosine lichte keten regulator (RLC). RLC fungeert als een schakelaar die de fosforyleringstoestand van de lichte keten van myosine reguleert. De fosforylering van de lichte keten van myosine heeft invloed op de interactie tussen myosine en actine, wat essentieel is voor spiercontractie. Wanneer de lichte keten niet gefosforyleerd is, kan myosine binden aan actine en zo spiercontractie veroorzaken. Tot slot zou er door NO een betere signalering kunnen zijn via de originele sGC-cGMP-PKG pathway, een belangrijk mechanisme in celcommunicatie dat verschillende fysiologische processen reguleert, wat ook weer tot een stijging van pRLC of gefosforyleerd RLC zorgt. Deze beschreven mechanismen zouden dus kunnen zorgen voor betere contractiliteit in de spier na suppletie met nitraat.

Samenvattend speelt NO een veelzijdige rol bij het verbeteren van sportprestaties en zijn er verschillende mechanismen die dit proberen te verklaren.

1.3.7 Spiervezeltype en nitraat

De laatste jaren is er steeds meer interesse in de link tussen nitraat en spiervezeltype. De skeletspieren van de mens bestaan namelijk uit verschillende soorten spiervezels, type I en type II spiervezels, in type II vezels maakt men ook nog eens een onderscheid tussen type IIa en type IIx vezels. Ze verschillen in functie en morfologie. Type I spiervezels worden ook wel ‘de trage spiervezels’ genoemd aangezien het tijdens een contractie 110 ms duurt voordat ze hun maximale kracht bereiken. Type II vezels daarentegen halen ongeveer dubbel zo snel hun maximale kracht, namelijk in 50ms, waardoor ze ‘de snelle spiervezels’ worden genoemd (Kenney, 2012). Het verschil in contractiesnelheid komt doordat ze verschillende vormen van myosine ATP-ase bevatten. Dit enzym splitst ATP om zo energie te genereren voor een spiercontractie. Trage vezels bevatten een trage vorm van myosine ATP-ase en snelle vezels bevatten een snelle vorm. Bij neurale stimulatie van de spier zal bij trage vezels ATP dus trager splitsen dan bij snelle vezels waardoor bij trage vezels de contractie trager gebeurt.

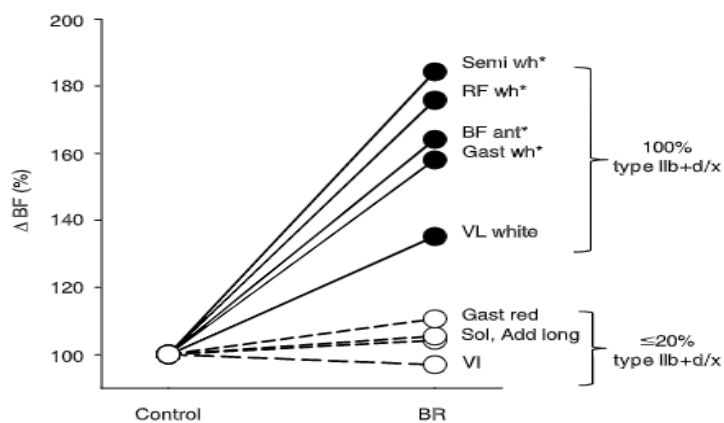
Naast de contractiesnelheid zijn er nog andere belangrijke verschillen tussen de spiervezeltypes, de verschillen in mitochondriale en capillaire densiteit (Andersen et al., 1984). Trage spiervezels worden gekenmerkt door hun hoge oxidatieve capaciteit, ze bevatten naast meer myoglobine (Nemeth et al., 1984) ook meer mitochondriën dan snelle spiervezels. Mitochondriën zijn de energiecentrales van de spier. Doordat er meer myoglobine aanwezig is in de vezels, kan er meer O₂ gebonden en vervoerd worden naar de mitochondriën waardoor deze vezels vooral energie produceren op een oxidatieve manier. Type II spiervezels daarentegen produceren vooral energie op een glycolytische manier, aan de hand van glycogeenvoorraden in de spier (Bottinelli, & Reggiani 2000).

De verdeling van spiervezels verschilt van mens tot mens en van spier tot spier. Zo’n 45% van dit verschil is genetisch bepaald en zo’n 40% is bepaald door omgevingsfactoren zoals training (Simoneau & Bouchard, 1995). Het verschil in spiervezeltype is opvallend anders in verschillende type sporters. Zo hebben elite langeafstandslopers gemiddeld 88% trage vezels in de quadriceps terwijl elite sprinters ongeveer 40% trage vezels hebben in de quadriceps femoris (Johnson et al., 1973). Men kan door het gebruik van verschillende technieken het aantal spiervezels per type inschatten in de skeletspieren, voorbeelden hiervan zijn gelelektroforese, op basis van myosine heavy chain of een nieuwere methode, proton magnetic

resonance spectroscopy (1H-MRS) (Baguet et al., 2011), op basis van de hoeveelheid carnosine.

De interesse van wetenschappers in het vezelspecifieke effect van de suppletie van nitraat is niet zonder reden. Er zijn namelijk verschillende denkwegen en mechanismen die suggereren dat nitraat vooral effect zou hebben op snelle spiervezels. Aangezien we weten dat verschillende sporten een andere spiervezelrekrutering vragen en atleten verschillende verhoudingen in spiervezels bevatten, is het interessant om hier dieper op in te gaan.

Ten eerste weten we dat nitriet onder bepaalde fysiologische omstandigheden één elektron afstaat en zo wordt omgezet in stikstofmonoxide (NO). Dit proces wordt voornamelijk gestimuleerd in een omgeving met weinig zuurstof en een lage pH, om de beschikbaarheid van NO in het lichaam te waarborgen. Deze zuurstofarme omgeving komt meer overeen met de omgeving van snelle spiervezels. Deze spiervezels hebben namelijk aanzienlijk lagere zuurstofniveaus (PO₂mv) in de kleine bloedvaten dan trage spiervezels (Behnke et al., 2003). Dit wordt bepaald door de zuurstoftoevoer (QO₂) en de zuurstofopname ($\dot{V}O_2$) en betekent dat nitriet waarschijnlijk gemakkelijker wordt omgezet naar NO in type II spiervezels dan in type I spiervezels. Aangezien we dan ook weten dat NO een verhoogde bloedstroom veroorzaakt, kan dit betekenen dat de zuurstoftoevoer (QO₂) in type II spiervezels toeneemt na suppletie. Dit werd bevestigd bij muizen, waarbij werd opgemerkt dat de toename in bloedflow vooral plaatsvond in spieren die voornamelijk uit type II spiervezels bestaan (Figuur 6) (Ferguson et al., 2013).



Figuur 6. Deze figuur geeft het verschil in bloedflow weer tussen de controleconditie en de bietensapconditie in de muizenstudie Ferguson et al. (2013).

Ten tweede zijn er bepaalde mechanismen die hierboven al werden besproken, die gefaciliteerd worden door een lage PO₂ zoals het effect van NO op de calciumflux via RyR1 en de mitochondriale ademhaling via cytochroom c oxidase (Jones et al., 2016). Verder zagen we ook in de studie van Hernández et al. (2012) dat de suppletie van nitraat bij muizen leidde tot een verhoogde aanwezigheid van eiwitten die betrokken zijn bij de CA²⁺ handeling zoals calsequestrine 1 en de dihydropyridine receptor. Dit kon niet bevestigd worden bij mensen maar er werd wel een ander belangrijk verschil gevonden in de resultaten. De suppletie van nitraat bij de muizen had namelijk een positief effect op de contractiele functie van de extensor digitorum longus die vooral type II spiervezels bevat. Dat effect werd niet gezien bij de soleus, die vooral type I spiervezels bevat.

Daarnaast zagen we al dat suppletie van nitraat waarschijnlijk vooral effect heeft op inspanningen van voldoende hoge intensiteit (Wilkerson et al., 2012). Dit werd ook aangetoond in een andere studie van Bailey et al. (2015) waarin men 7 proefpersonen een fietstest liet doen aan hoge en lage trapfrequentie na suppletie van nitraat. De resultaten van deze studie waren een verhoogde spieroxigenatie, een snellere verandering in opname van O₂ en langere tolerantie na inname van nitraat bij hoge trapfrequentie. Bij lage trapfrequentie werden deze resultaten niet gevonden. Het is ook zo dat bij dergelijke inspanningen van hoge intensiteit meer type II spiervezels gerekruteerd worden. Daarnaast zal men ook een grotere hoeveelheid zuurstof verbruiken en zal er uiteindelijk meer weefselhypoxie ontstaan in de spieren. Dat leidt tot een hogere omzetting van nitriet naar NO in de spiervezels en dat waarschijnlijk vooral in de meer gerekruteerde type II vezels.

De ergogene effecten van nitraat bij inspanningen van hoge intensiteit worden niet altijd bevestigd. Zo zag men geen verbetering van herhaalde fietssprints bij elite duursporters na 6 dagen nitraatsuppletie (Christensen et al., 2013). De ergogene effecten van nitraat worden namelijk moeilijk teruggevonden bij elitesporters en dat zou verschillende redenen kunnen hebben. Naast het eerder aangehaalde feit dat ze meer NOS activiteit en dus een beter ontwikkelde L-arginine pathway zouden hebben, zou de verdeling van spiervezels bij elitesporters ook een invloed kunnen hebben op de invloed van nitraat. Elite duursporters bevatten een groter aandeel type I spiervezels ten opzichte van type II spiervezels. Meer type I spiervezels zou willen zeggen dat er minder ergogene effecten van nitraat optreden tijdens prestatie aangezien de literatuur suggereert dat nitraatsuppletie vooral werking heeft in type II spiervezels (Hernández et al., 2012).

Door deze bevindingen verwacht men dat nitraatsuppletie meer effect heeft op sportprestaties waarbij er meer type II spiervezels worden gerekruteerd. Onderzoekers stellen zich nu de vraag: ‘Heeft nitraatsuppletie meer ergogene effecten bij sporters met een groter aandeel type II spiervezels?’

1.3.8 Suppletie

De aanbevolen dosis nitraat volgens het Internationaal Olympisch Comité varieert van 5-9 mmol en kan op verschillende manieren worden ingenomen, zowel acuut als chronisch. Bij acute suppletie wordt de dosis nitraat idealiter 2-3 uur vóór fysieke inspanning ingenomen, omdat in die tijdspanne de prestatiebevorderende effecten optreden. Aan de andere kant kan chronische suppletie gedurende meer dan 3 dagen vooral gunstig zijn voor goed getrainde atleten, bij wie prestatieverbetering moeilijker te bereiken is (Maughan et al., 2018).

Volgens Van de Walle et al. (2018) is het aan te raden om nitraat zoveel mogelijk uit anorganische bronnen te halen, zoals rode bieten, spinazie of rucola. Het gebruik van organische nitraten, die voornamelijk voorkomen in medicijnen zoals nitroglycerine of nitraatzouten, is minder bestudeerd en moet worden vermeden, omdat ze op lange termijn in verband worden gebracht met endotheeldysfunctie (Omar et al., 2012). Rode bietensap biedt een praktische manier om geconcentreerde hoeveelheden anorganisch nitraat te consumeren zonder de noodzaak van volledige maaltijden.

Volgens Senefeld et al. (2020) is een acute of dagelijkse dosis nitraat pas prestatiebevorderend boven de 6 mmol, en er lijkt geen extra voordeel te zijn bij doseringen boven de 12 mmol.

Het is ook belangrijk op te merken dat bij het innemen van nitraat als supplement het gebruik van antibacteriële tandpasta of mondspoeling moet worden vermeden om een optimale biologische beschikbaarheid te garanderen. Het gebruik van antibacteriële stoffen zal de concentratie nitriet in de speekselklieren en het plasma drastisch verminderen, aangezien bacteriën essentieel zijn voor de omzetting van nitraat naar nitriet (Govoni et al., 2008).

De suppletie van nitraat kan dus potentieel prestatievoordelen veroorzaken, maar het is essentieel om de aanbevolen doseringen en richtlijnen op te volgen en rekening te houden met individuele verschillen en behoeften.

2 Onderzoeksvragen en hypothese

Onderzoeksvraag:

Heeft de verdeling van spiervezeltype in recreatief actieve mannen en vrouwen een invloed op de prestatiebevorderende effecten van nitraatinname?

Hypothese A: Er wordt verwacht dat er meer prestatiebevorderende effecten plaatsvinden bij recreatief actieve mannen en vrouwen die meer type II spiervezels bevatten na suppletie met nitraat.

3 Methodiek

3.1 Proefpersonen

Voor dit onderzoek werden 8 recreatief, actieve proefpersonen tussen 18 en 35 jaar gerekruteerd. De deelnemers werden willekeurig verdeeld om te beginnen in een van de twee condities (placebo- of nitraatsuppletieconditie) van de cross-over studie. Om de kwaliteit van de steekproef te waarborgen, werden strikte exclusiecriteria gehanteerd, waaronder geen claustrofobie, geen recente ernstige letsels, geen spier- en/of cardiovasculaire aandoeningen, geen hoge bloeddruk, geen chronische medicatie-inname en niet roken. Ook was de inname van (voedings)supplementen gedurende een periode van drie maanden voor aanvang van het onderzoek niet toegelaten. De specifieke leeftijd en fysieke karakteristieken van de proefpersonen zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 Leeftijd en fysieke karakteristieken van de proefpersonen

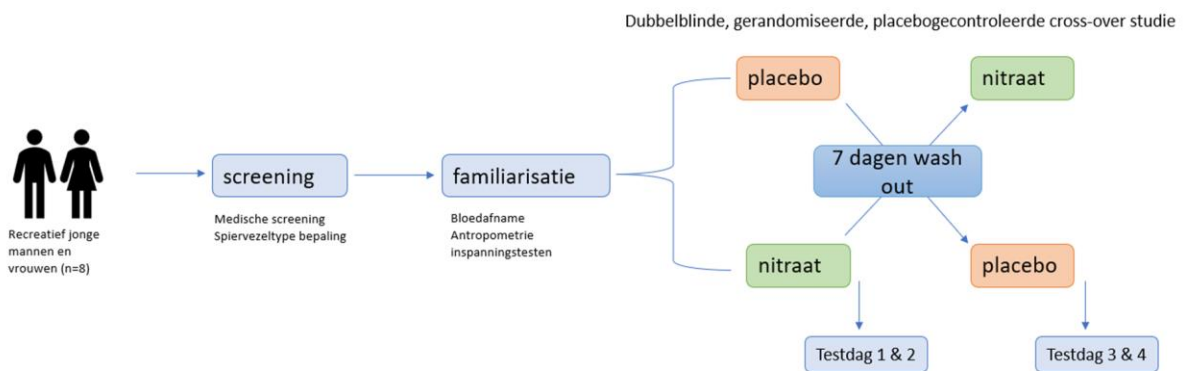
	Volledige steekproef (n=8)	Mannen (n=4)	Vrouwen (n=4)
Leeftijd (jaar)	26,43 ± 2,23	26,80 ± 2,88	26,07 ± 1,72
BMI (kg/m²)	22,49 ± 1,33	22,97 ± 1,34	22,02 ± 1,30
Vetpercentage (%)	15,76 ± 5,49	11,80 ± 1,72	19,73 ± 5,05
VO₂piek (ml/kg/min)	49,75 ± 8,69	56,55 ± 4,15	42,96 ± 5,99

Noot. Data zijn gemiddelde ± SD (SD = standaarddeviatie)

3.2 Studiedesign

Het onderzoek werd uitgevoerd als een dubbelblinde, gerandomiseerde, placebogecontroleerde cross-overstudie. Deze studieopzet werd gekozen om de betrouwbaarheid en validiteit van de resultaten te vergroten en om mogelijke vertekeningen en vooroordelen te minimaliseren.

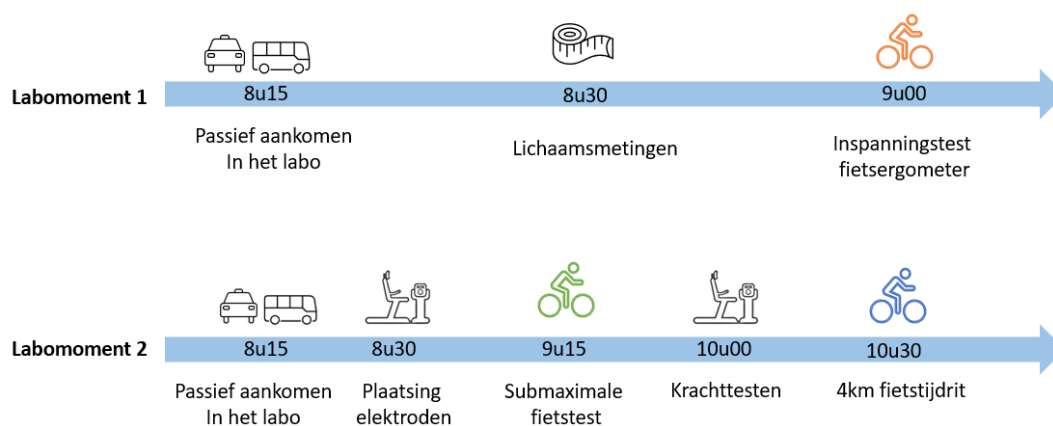
Dubbelblindheid zorgde ervoor dat zowel de proefpersonen als de onderzoekers niet wisten welke behandeling, supplement of placebo, aan wie werd gegeven, waardoor verwachtingen de objectiviteit niet konden beïnvloeden. Daarnaast verminderde het gerandomiseerd toewijzen van deelnemers aan behandelingen de selectiebias en zorgde het voor een evenwichtige verdeling. De placebocontrole omvatte een groep die een placebo ontving, vergelijkbaar met de interventiegroep, maar zonder nitraten. Ten slotte hield de cross-over studieopzet in dat elke deelnemer beide behandelingen, de interventie en de placebo, gedurende 6 tot 7 dagen ontving met een washout periode van 7-10 dagen ertussen (zoals te zien in figuur 7). Dit maakt het mogelijk om binnen dezelfde deelnemers te vergelijken en interindividuele variabiliteit te verminderen, omdat elke proefpersoon als zijn/haar eigen controlegroep fungeert.



Figuur 7. Deze figuur geeft een schematische weergave van het studiedesign.

3.3 Procedure

De studie startte met een medisch onderzoek en een bepaling van de spiervezeltypering. Vervolgens werd er een screening uitgevoerd in functie van lichaamsmetingen, waaronder lengte, gewicht en vetpercentage gemeten aan de hand van huidplooiemetingen, alsook een maximale inspanningstest. Daarna volgde de familiarisatie waarbij de proefpersonen het volledige inspanningsprotocol reeds doorliepen, bestaande uit een submaximale fietstest met zuurstof- en NIRS-metingen, isometrische en isokinetische krachttesten alsook elektrostimulatie afgenomen met de Biodex en een 4 km fietstijdrit. Deze twee labomomenten zijn weergegeven op een tijdlijn op figuur 8.



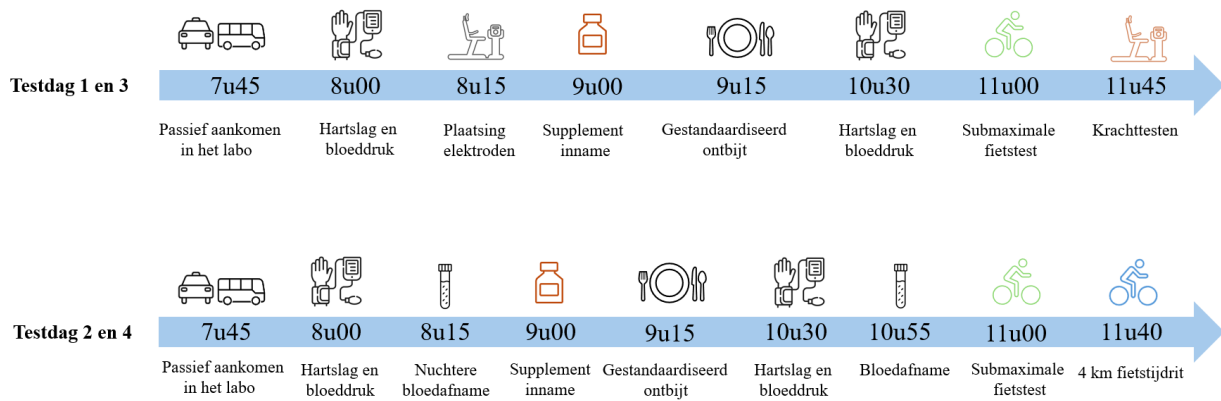
Figuur 8. Deze figuur geeft een schematisch overzicht van labomoment 1 en 2.

Tijdens de effectieve testperiode namen de proefpersonen gedurende zeven dagen geconcentreerd bietensap of een placebo zonder nitraat in. Het supplement of de placebo werd steeds op hetzelfde tijdstip ingenomen en dit werd bijgehouden in een suppletiedagboek. Het geconcentreerde bietensap was een shot van 70 ml dat 400 mg (6,45 mmol) natuurlijk nitraat bevatte. Op de laatste twee dagen, dag zes en zeven van de suppletieperiode, vond telkens een testdag plaats. Na een washoutperiode van 7-10 dagen werd dit herhaald met de andere conditie, zodat er in totaal 4 testdagen werden uitgevoerd (figuur 9).

Om zoveel mogelijk te standaardiseren werden er vanaf de eerste dag van de suppletieperiode maatregelen genomen. Zo mochten de proefpersonen geen nitraatrijke voeding meer eten en mochten ze geen gebruik meer maken van antibacteriële mondproducten. Verder werd er gevraagd aan de vrouwelijke proefpersonen om de anticonceptie door te nemen om te controleren voor hormonale veranderingen. Deze maatregelen golden tot aan het einde van de studie. Daarnaast mochten de proefpersonen de dag voorafgaand aan ieder labomoment geen sport of zware fysieke activiteit uitvoeren, geen alcohol drinken en dienden ze voedingsrichtlijnen te volgen. Deze richtlijnen omvatten drie hoofdmaaltijden gespreid over de dag en een koolhydraatrijk avondmaal. Hun voeding werd bijgehouden in een voedingsdagboek aangezien men op testdag 3 hetzelfde at als op testdag 1 en op testdag 4 hetzelfde at als op testdag 2. Op de eigenlijke testdagen dienden de proefpersonen zich op een passieve manier naar het labo te begeven en mochten ze nog geen ontbijt innemen, ook alcohol of cafeïne waren niet toegelaten.

De vier testdagen hadden een gelijkaardig verloop en de exacte timing van alle stappen wordt schematisch weergegeven in figuur 9. De eerste en derde testdag vertoonden hetzelfde patroon. Ten eerste werd de hartslag en bloeddruk gemeten en vervolgens werden de elektroden geplaatst in voorbereiding van de krachttesten. Daarna namen de proefpersonen het supplement in, gevolgd door het gestandaardiseerd ontbijt. Hierna werden de bloeddruk en hartslag opnieuw gemeten 1,5u na de supplementinname, waarna een submaximale fietstest met zuurstof- en NIRS-metingen werd uitgevoerd. Ten slotte werden isometrische en isokinetische krachttesten en elektrostimulatie uitgevoerd.

De tweede en vierde testdag vertoonden hetzelfde patroon, maar er werden ook bloedstalen afgenomen en de krachttesten en elektrostimulatie werden vervangen door een tijddrit van 4 km. Het bloed van de proefpersonen werd afgenomen voor het innemen van het supplement en ongeveer 2u erna, net voor de start van de submaximale test. Na het uitvoeren van de submaximale test werd tenslotte de 4 km tijddrit voltooid.



Figuur 9. Deze figuur geeft een schematisch overzicht van testdagen 1,2,3 en 4.

3.4 Meetinstrumenten en -methoden

3.4.1 Spiervezeltype bepaling

De verhouding van spiervezeltypes bij de proefpersonen werd zowel op invasieve als niet-invasieve wijze ingeschat. De invasieve methode omvatte het nemen van spierbiopten, terwijl de niet-invasieve methoden onder meer het meten van de carnosineconcentratie, lactaatconcentratie na een Wingate-test en de rate of torque relaxation na een enkele stimulatie omvatten.

3.4.1.1 De invasieve methode

In een eerdere studie met dezelfde proefpersonen werden in totaal 4 spierbiopten afgenomen waarvan twee in de gastrocnemius en twee in de vastus lateralis spier met een Bergström bioptnaald onder lokale verdoving. De spierstalen werden meteen bevroren in vloeibaar stikstof en later bewaard in -80°C . Vervolgens werden de spierstalen gesneden tot dunne secties ($8\mu\text{m}$) waarna kleuring werd uitgevoerd met antilichamen voor myosine heavy chain I, IIa & IIx. Met behulp van een fluorescentiemicroscoop werden deze gekleurde spierdoorsneden gevisualiseerd en geanalyseerd. Voor elke dwarsdoorsnede werden alle duidelijke vezels geteld per vezelsoort. De oppervlakte van type II spiervezels en de spiervezelsamenstelling werden vervolgens bepaald door het totale aantal vezels per vezeltype van elke spierdoorsnede te tellen. Bovendien werden 100 willekeurige spiervezels per vezeltype manueel omcirkeld, waarbij alleen spiervezels met een goed georiënteerde ligging en circulariteit werden geselecteerd. Het percentage van het oppervlak aan type II vezels werd vervolgens berekend door de gemiddelde oppervlakte van type II vezels te vermenigvuldigen met het totale aantal type II vezels, en dit te delen door het totale oppervlak van zowel type I als type II vezels. Voor elke proefpersoon werd daarna een Z-score berekend voor het gemiddelde percentage aan oppervlakte type II vezels om de resultaten te standaardiseren en te vergelijken. Hiervoor werd een referentiepopulatie van 20 mannen en 20 vrouwen gebruikt.

3.4.1.2 De non-invasieve methoden

Gemiddeld carnosine in m. gastrocnemius en m. vastus lateralis

Er bestaat een positieve correlatie tussen het carnosinegehalte en de oppervlakte type II spiervezels in de spier (Baguet et al. 2011), dit werd bevestigd door Van Vossel et al. (2023). Het voordeel aan carnosine is dat het grotendeels onafhankelijk is van extrinsieke factoren

zoals dieet en training. Alleen langdurig vegetarisme of het innemen van hoge doses beta-alanine gedurende meerdere weken kan het carnosinegehalte in de spieren veranderen (Baguet et al., 2011; Derave et al., 2007). Het werd gemeten in de m. gastrocnemius en de m. vastus lateralis van de proefpersonen aan de hand van proton magnetische resonantie spectroscopie ($^1\text{H-MRS}$). Vervolgens werd de carnosineconcentratie van de spieren omgezet naar een Z-score ten opzichte van een controlegroep van 275 actieve, gezonde, niet-atleten die gelijkend waren in leeftijd en geslacht. Proefpersonen met een gemiddelde Z-score ≤ -0.5 werden als type I beschouwd, proefpersonen met een Z-score hoger dan -0.5 en lager dan 0.5 werden als intermediair beschouwd en proefpersonen met een gemiddelde carnosine score $\geq +0.5$ werden als type II beschouwd.

Lactaat na een Wingate test

Onderzoek heeft aangetoond dat de lactaatwaarden na een 30-seconden 'all-out' fietstest, bekend als de Wingate-test, hoger zijn bij proefpersonen met een hoger percentage type II spiervezels dan bij degenen met meer type I spiervezels (Lievens et al., 2020). Daarom werden in deze studie aan de hand van een vingerprik de lactaatwaarden van de proefpersonen gemeten 3 minuten na het uitvoeren van de Wingate-test. Vervolgens werd voor elke proefpersoon een Z-score van de lactaatwaarden berekend op basis van een referentie van 20 mannen en 20 vrouwen, waardoor een schatting van de spiervezelverdeling van de proefpersonen kon worden gemaakt.

Rate of torque relaxation

Type I en type II spiervezels vertonen verschillen in hun contractiele eigenschappen, waaronder de rate of torque relaxation (ROTR). Dit verwijst naar de snelheid waarmee de spierkracht afneemt nadat de maximale contractie is bereikt. In een onderzoek uitgevoerd door Lievens et al. (2020) werd vastgesteld dat de ROTR, gemeten bij het startpunt ('baseline'), 46% hoger was bij proefpersonen met een overwicht aan type II spiervezels in vergelijking met degenen die voornamelijk type I spiervezels hadden.

Deze studie gebruikte de Biodex om knie-extensie dynamometrie met elektrische stimulatie uit te voeren om de ROTR te meten na een enkele samentrekking van de quadricepsspier. De proefpersonen zaten in de stoel met een kniehoek van 90° en een romp-dij hoek van 100° . Ook

werden ongewenste bewegingen van het bovenlichaam vermeden door twee schouderharnassen, het kruisen van de armen en het rechterbeen stevig aan het apparaat te bevestigen met een klittenband. Er werden vier zelfklevende elektroden op de huid geplaatst op specifieke locaties. De eerste twee elektroden werden op de vastus lateralis geplaatst, stonden in voor elektromyografie (EMG) om de M-wave te bepalen. De derde elektrode diende als referentielocatie op de trochanter major en de vierde elektrode bevond zich op de nervus femoralis voor de elektrostimulatie.

Voorafgaand werd de stimulusintensiteit bepaald door deze te laten stijgen vanaf 20mA met stappen van 5 mA totdat de M-wave amplitude een plateau bereikte in de vastus lateralis. Deze intensiteit werd dan met 20% verhoogd. Vervolgens werd tijdens een enkele stimulus van de vastus lateralispiers de ROTR bepaald op het tijdstip dat de spier het snelst relaxeerde. Op basis van de ROTR werd er dan voor elke proefpersoon een Z-score berekend om de resultaten te standaardiseren en te vergelijken.

3.4.2 De Ramp inspanningstest

Tijdens het eerste labomoment ondergingen de proefpersonen een inspanningstest (Ramp-test) op een LODE-fietsergometer. Het doel was om VO_2 piek te bepalen alsook de juiste cadans en de Gas Exchange Threshold (GET) te identificeren in functie van de submaximale fietstest. De GET werd bepaald met behulp van de V-slope methode. Dit is een analytische benadering die de GET tijdens een inspanningstest bepaalt door de veranderingen in zuurstofverbruik en koolstofdioxideproductie grafisch weer te geven, waarbij de GET wordt geïdentificeerd als het punt waar deze verhouding verandert (Schneider et al., 1993).

De GET werd later gebruikt om submaximale inspanningen op 80% van deze drempel te definiëren. Door 'breath-to-breath' metingen uit te voeren, konden nauwkeurige gegevens over gasuitwisseling en ademhaling worden verzameld. Dit zorgde voor een gepersonaliseerd en nauwkeurig referentiepunt voor de submaximale inspanningen tijdens de testdagen.

3.4.3 De 4 km tijdrit

In deze studie werd de 4 km tijdrit uitgevoerd op de Cyclus 2 ergometer, met als doel dat de proefpersonen de tijdrit zo snel mogelijk aflegden. De test begon zodra de proefpersonen een cadans van 70 bereikten na het starten met fietsen. De eerste 250 meter van de test werden

afgelegd aan 90% van hun maximaal vermogen, terwijl een vaste cadans werd aangehouden. Het vermogen en de cadans waren gebaseerd op de resultaten van de $\dot{V}O_2$ max-test tijdens de familiarisatie, en deze konden de proefpersonen volgen op het scherm van de ergometer.

Na de eerste 250 meter konden de proefpersonen zelf kiezen welke cadans ze wilden fietsen en werd het scherm afgedekt zodat ze alleen nog maar de afstand konden zien. Ook werd hen om de 500 meter gevraagd of ze wilden schakelen, terwijl ze voortdurend werden aangemoedigd.

De belangrijkste meetparameters voor deze test waren vermogen, tijd en hartslag. De hartslag werd gemeten met behulp van de Polar hartslagmeter, terwijl tijd en vermogen werden vastgelegd met de Cyclus 2 ergometer. Met deze gegevens konden later analyses worden uitgevoerd om de prestaties tussen verschillende testdagen te vergelijken.

3.4.4 De submaximale fietstest

De submaximale fietstest werd op de 4 verschillende testdagen uitgevoerd om te compenseren voor dag-tot-dag variabiliteit. Voor verdere analyse van de data werd van elke stap het gemiddelde van de vier testdagen genomen, waarbij het protocol op elke testdag exact hetzelfde verliep. Het begon met het stilhouden van de benen om de $\dot{V}O_2$ in rust te bepalen. Daarna fietsten de deelnemers gedurende 3 minuten aan 20 watt en 30 rpm als baseline. Vervolgens fietsten ze 6 minuten op 80% van de GET (gematigd), waarbij de cadans constant bleef (de cadans die per persoon bepaald werd tijdens de ramp-test). Na een rustperiode van 7 minuten met het been waarop de NIRS-sensor was geplaatst in dezelfde positie, volgden opnieuw 3 minuten fietsen aan 20 watt en 30 rpm. Ten slotte fietsten ze opnieuw 6 minuten op 80% van de GET.

Het doel van de submaximale fietstest was om een beeld te krijgen van de fysiologische reacties tijdens submaximale inspanning. Hiervoor werden Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) en de Metalyzer 3B (R3) gebruikt. NIRS maakte het mogelijk om de lokale zuurstoflevering en -opname in de spieren te meten door het detecteren van hemoglobine (Hb) en myoglobine (Mb) in de spier. Voor dit onderzoek werd de NIRS Oxiplex TS met Rigid Sensor gebruikt, die verschillende golflengten licht uitzendt om onderscheid te maken tussen zuurstofrijk hemoglobine (O_2Hb) en zuurstofarm hemoglobine (HHb). De concentratie van deoxyhemoglobine ([HHb]) verandert nauwelijks door schommelingen in het bloedvolume

tijdens het sporten. Hierdoor kon het worden gebruikt om te beoordelen hoe goed zuurstof naar de spieren werd gebracht en hoeveel ervan werd gebruikt.

Het nauwkeurig plaatsen van de NIRS-sensor op de vastus lateralis spierbuik, lateraal op 1/3 afstand, was essentieel voor betrouwbare metingen. Na de eerste submaximale test werd de locatie van de NIRS omcirkeld met een stift zodat deze bij de volgende drie testen op exact dezelfde plaats kon worden geplaatst, om zo betrouwbaarheid en consistentie van de metingen te garanderen. Het is ook belangrijk om te vermelden dat de subcutane vetlaag boven de vastus lateralis spier de metingen kan beïnvloeden. Proefpersonen met een hoger vetpercentage aan het bovenbeen hebben meer kans op verstoorde metingen.

De Metalyzer 3B (R3) voerde breath-by-breath/intrabreath-metingen van $\dot{V}O_2$ (zuurstofopname) en VCO_2 (koolstofdioxideproductie) uit. Door deze metingen te combineren met de NIRS metingen verkreeg men een grondige evaluatie van zowel de lokale zuurstofverzadiging in de spieren als de ademhalingsparameters tijdens de test. De gegevens van beide systemen werden continu verzameld en opgeslagen voor latere analyse.

3.4.5 De spierkrachttesten

Om de spierkracht van de proefpersonen te meten, werden zowel isokinetische als isometrische krachttesten uitgevoerd, net als in het eerder genoemde onderzoek van Lievens et al. (2020) met de biodex. De elektrostimulatie werd uitgevoerd na de isokinetische en isometrische tests. Echter, voorafgaand aan deze testen werden al voorbereidingen getroffen voor de elektrostimulatie. Hierbij werden vier elektroden op specifieke locaties op de huid aangebracht, waarna de maximale M-wave werd vastgesteld om de intensiteit van de elektrostimulatie te bepalen. Deze stappen volgde dezelfde procedure zoals beschreven in alinea 3.4.1.2.

Als laatste voorbereidende stap wordt de 'richting' ingesteld. Het rechterbeen van de proefpersoon werd zo ver mogelijk gestrekt en zo ver mogelijk geplooid, daarna werd het vastgezet in een positie van 90°. Zo werd de maximale bewegingsrange en de hoek van 90° bepaald.

3.4.5.1 Isokinetische en isometrische contracties

Eerst volgden de isokinetische testen, waarbij de torque van de kniestrekkers van het rechterbeen werd gemeten bij een constante hoeksnelheid. Alvorens de start van de

isokinetische testen werd er een opwarming gedaan met drie submaximale isokinetische kniesticrekkingen 1 keer aan 60°/s, 1 keer aan 180°/s en 1 keer aan 300°/s. De eigenlijke isokinetische test bestond uit telkens twee kniesticrekkingen met maximale inspanning bij hoeksnelheden van 60°/s, 180°/s en 300°/s, met rustperiodes van twee minuten tussen de sets. Tijdens de kniesticrekkingen werden de proefpersonen aangemoedigd.

Het isokinetische protocol:

60 °/s – 1' rust – 60 °/s – 2' rust – 180 °/s – 1' rust – 180 °/s – 2' rust - 300°/s – 1' rust – 300°/s

Na twee minuten te rusten werden isometrische testen uitgevoerd om de 'Maximum Voluntary Contraction' (MVC) te meten. Deelnemers oefenden twee keer gedurende 5 seconden maximale kracht uit tegen de onbewogen arm van het Biodex-apparaat, zonder beweging van het kniegewricht. Tussen deze pogingen was er een rustperiode van 3 minuten. Ook tijdens deze testen werden de proefpersonen aangemoedigd.

3.4.5.2 Elektrostimulatie

Na een rustperiode van 2 minuten werd een elektrische stimulatie gegeven, waarbij er 1 minuut rust was tussen de herhalingen. Het verloop van de twee elektrische stimulaties was identiek: een dubbele stimulatie aan 10Hz, gevolgd door een dubbele stimulatie aan 100Hz en een enkele (singlet) stimulatie. De proefpersonen kregen de instructie om zich te ontspannen met de armen gekruist.

3.5 Analyses

Voor iedere test dat werd afgenomen in deze studie werden er verschillende variabelen gemeten waaruit telkens een uitgebreide dataset kwam. De ruwe data werd eerst grondig voorbereid door het opschonen van eventuele fouten, waaronder het identificeren van uitschieters die significant afweken van de rest van de dataset. Vervolgens werd voor iedere proefpersoon het gemiddelde berekend van elke gemeten variabele, zowel voor de nitraatsuppletieconditie als de placeboconditie.

Nadien werd de data ingevoerd in SPSS. Dit hield in dat elke rij in de dataset een proefpersoon vertegenwoordigde en elke kolom de gemiddelde waarde van een bepaalde variabele onder de nitraatsuppletieconditie of de placeboconditie. Om de normaliteit van elke variabele na te gaan, werden de variabelen onderworpen aan de Shapiro-Wilk's test, skewness en kurtosis werden gecontroleerd en Q-Q-plots werden geëvalueerd. Om de verschillen tussen placebo- en nitraatcondities te beoordelen, hebben we verschillende statistische methoden toegepast, afhankelijk van de verdeling van de data. Voor de normaal verdeelde variabelen van de hartslag en bloeddruk hebben we een *Repeated Measures ANOVA* gebruikt. Dit stelde ons in staat om veranderingen over tijd en tussen condities te analyseren. Daarnaast hebben we voor andere variabelen, afhankelijk van hun verdeling, zowel de *Paired Sample t-test* (voor normaal verdeelde data) als de *Wilcoxon Signed Rank Test* (voor niet normaal verdeelde data) toegepast. Deze tests werden gebruikt om de verschillen tussen de placebo- en nitraatcondities te bepalen voor die specifieke variabelen. Statistische significantie werd vastgesteld op $p < 0,05$, en alle data werd geanalyseerd met behulp van SPSS. De resultaten worden weergegeven in gemiddelden \pm standaarddeviatie.

De correlaties voor de normaal verdeelde gegevens werden bepaald met behulp van de Pearson correlatiecoëfficiënt. Voor de niet-normaal verdeelde gegevens werd de Spearman rangcorrelatiecoëfficiënt gebruikt. Correlaties werden uitgevoerd tussen het relatieve effect van nitraat ten opzichte van placebo en de spiervezeltypering, uitgedrukt in Z-scores. Deze relatieve effectdelta werd berekend via het verschil tussen de waarde van nitraat en placebo te nemen en dit te delen door de placebo waarde. Om de sterkte van de correlatiecoëfficiënten te interpreteren werden volgende waarden gehanteerd: 0,0 tot 0,3 werd beschouwd als verwaarloosbaar, 0,3 tot 0,5 werd beschouwd als een zwakke correlatie, 0,5 tot 0,7 werd beschouwd als een matige correlatie en 0,7 tot 1,0 werd beschouwd als sterke correlatie.

4 Resultaten

4.1 Effecten van nitraat

In de resultatensectie van deze masterproef worden de bevindingen gepresenteerd in twee hoofddelen. Het eerste deel bespreekt de effecten van nitraat ten opzichte van de placebo bij alle parameters van de uitgevoerde testen. Het tweede deel richt zich op de correlaties en de effecten van verschillende spiervezeltypes op de prestatiebevorderende effecten van nitraat.

4.1.1 Hartslag en bloeddruk

Tijdens dit onderzoek werd er op elke testdag bij aankomst een nuchtere meting gedaan van de bloeddruk en de hartslag. Anderhalf uur na de inname van het supplement werden dezelfde metingen opnieuw uitgevoerd. Op deze manier werd er telkens voor elke variabele en testconditie een pre- en postwaarde gemeten (tabel 2). Voor de hartslag zijn er geen significante verschillen te zien tussen de placebo- en nitraatcondities ($p=0,690$), zowel voor de pre- als postmetingen. Verder zien we dat de hartslag na de interventie, ongeacht of het placebo of nitraat was, significant verhoogd is in vergelijking met de pre-waarde ($p=0,003$). Er was echter geen significante interactie tussen tijd en conditie ($p=0,503$), wat aangeeft dat de toename in hartslag vergelijkbaar was tussen de placebo- en nitraatgroepen (zie tabel 3).

Tabel 2: Gemiddelde hartslag en bloeddruk placebo vs. nitraat

Meting		Placebo	Nitraat
Hartslag	Pre	57,58 ± 11,02	55,94 ± 9,00
	Post	61,27 ± 9,16	60,88 ± 7,85
Systolische bloeddruk	Pre	111,50 ± 15,25	113,13 ± 14,40
	Post	117,78 ± 14,96	118,00 ± 13,03
Diastolische bloeddruk	Pre	64,31 ± 4,32	65,44 ± 4,61
	Post	63,31 ± 4,87	64,13 ± 4,58

Noot. Data zijn gemiddelde ± SD

Naast de hartslag werden ook de systolische en diastolische bloeddruk gemeten. Net als bij de hartslag zijn er geen significante verschillen te zien tussen placebo- en nitraatcondities van zowel de systolische als diastolische bloeddruk ($p=0,397$ en $p=0,319$; respectievelijk). Daarnaast stijgt de systolische bloeddruk significant van pre- naar postmeting, in lijn met de hartslag, ongeacht of het placebo of nitraat betreft ($p<0,001$). Dit wijst erop dat de tijd een significante invloed had op de systolische bloeddruk, terwijl er geen significante interactie tussen tijd en conditie werd gevonden ($p=0,203$; tabel 3).

De diastolische bloeddruk daarentegen blijft constant en vertoont geen significante veranderingen van pre- naar postmeting in zowel de placebo- als nitraatcondities ($p=0,125$). Ook hier werd geen significante interactie tussen tijd en conditie waargenomen ($p=0,647$), wat betekent dat de tijdsgerelateerde veranderingen in diastolische bloeddruk consistent waren tussen de condities (tabel 3).

Tabel 3: Statistische Analyse hartslag en bloeddruk

Meting	Effect	P-waarden
Hartslag	Tijd	0,003
	Conditie	0,690
	Tijd x conditie	0,503
Systolische bloeddruk	Tijd	< 0,001
	Conditie	0,397
	Tijd x conditie	0,203
Diastolische bloeddruk	Tijd	0,125
	Conditie	0,319
	Tijd x conditie	0,647

Noot. Tijd & conditie geven hoofdeffecten weer. Tijd x conditie= interactie-effect.

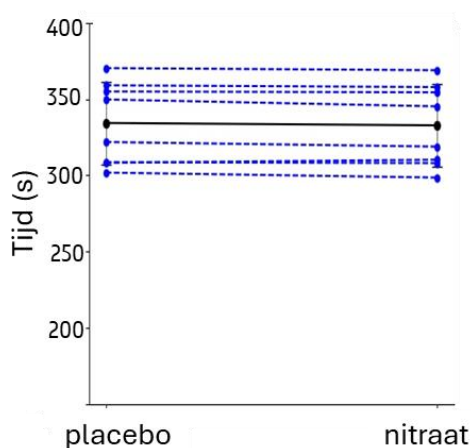
4.1.2 4 km tijdrit

In dit onderzoek werd het effect van nitraatsuppletie bij een 4 km tijdrit gemeten aan de hand van drie verschillende variabelen. In Tabel 4 worden de gemiddelde groepswaarden weergegeven voor de drie variabelen: tijd, gemiddelde vermogen en gemiddelde hartslag tijdens de tijdrit. Een trend tot significantie werd waargenomen, waarbij proefpersonen met nitraat een 0,41% snellere tijd hadden op de 4 km tijdrit dan met placebo ($p=0,067$, figuur 10). Het gemiddelde vermogen tijdens de tijdrit leek hoger te zijn bij de nitraatsuppletieconditie dan bij de placeboconditie, hoewel dit verschil niet statistisch significant was ($p=0,102$; figuur 11). Evenzo was de gemiddelde hartslag vergelijkbaar tussen de nitraatsuppletieconditie en de placeboconditie, zonder significant verschil ($p=0,348$).

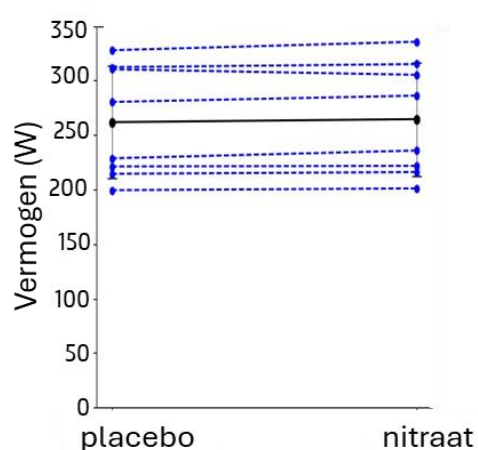
Tabel 4: Inspanningsdata van de 4 km tijdrit (TT) placebo vs nitraat

Meting	Conditie		P-waarden
	PLA	NIT	
4 km TT tijd(s)	384,31 ± 27,02	382,75 ± 26,82	0,067
4 km TT vermogen (W)	261,79 ± 51,39	264,58 ± 51,80	0,102
4 km TT hartslag (bpm)	167,13 ± 9,46	168,88 ± 10,86	0,348

Noot. Data zijn gemiddelde ± SD (PLA=placebo; NIT= nitraat)



Figuur 10. Prestatietijd (s) op een 4 km tijdrit (volle lijn) en individuele responsen (stippellijnen) voor een 4 km tijdrit met placebo als controle- en nitraat als interventieconditie.



Figuur 11. Gemiddeld vermogen (W) voor een 4 km tijdrit (volle lijn) en individuele vermogenswaarden (stippellijnen). Placebo als controle- en nitraat als interventie conditie.

4.1.3 Submaximale inspanningstest

De resultaten van de submaximale fietstesten, uitgevoerd op de vier verschillende testdagen, geven inzicht in de gemiddelde HHb- en $\dot{V}O_2$ -waarden bij verschillende intensiteitsniveaus aan de hand van NIRS- en breath-by-breath-metingen. De gemiddelde zuurstofopname ($\dot{V}O_2$) vertoonde bij de nitraatconditie licht hogere waarden in vergelijking met de placeboconditie, zowel tijdens het fietsen aan 20 Watt als aan 80% van de GET. Echter waren deze verschillen zeer beperkt en dus niet significant ($p=0,518$; $p=0,767$). Daarnaast was de stijging van $\dot{V}O_2$ tussen het fietsen aan 20 Watt en aan 80% van de GET (amplitude $\dot{V}O_2$) gelijk tussen de placebo- en nitraatconditie wat wijst op geen extra voordelig effect van het supplement ($p=0,958$; tabel 5, figuur 12a).

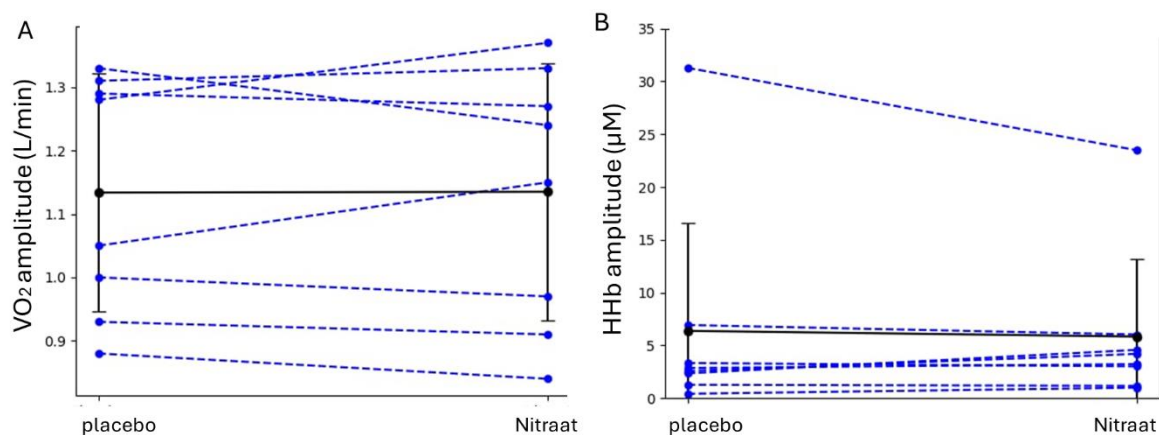
HHb-waarden werden bepaald aan de hand van de NIRS. Bij een inspanningsniveau van 20 Watt toonden de resultaten aan dat de gemiddelde HHb-waarden vergelijkbaar waren tussen de nitraat- en placeboconditie, zonder een statistisch significant verschil ($p=0,452$; tabel 5).

Bij 80% van de GET, werden HHb-waarden gemeten om te beoordelen hoe het lichaam reageerde op een hogere inspanning. Wederom waren deze verschillen te verwaarlozen ($p=0,674$; tabel 5), alsook bij de stijging van 20 Watt naar 80% GET. ($p=0,779$; tabel 5, figuur 12b).

Tabel 5: Data submaximale inspanningstest

Meting	Conditie		P-waarde
Zuurstofopname ($\dot{V}O_2$)	PLA	NIT	
20 Watt (L/min)	0,54 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,518
80% GET (L/min)	1,68 ± 0,19	1,69 ± 0,20	0,767
80% GET – 20 Watt (L/min)	1,13 ± 0,19	1,14 ± 0,20	0,958
Deoxyhemoglobine			
20 Watt (μM)	19,11 ± 11,65	18,33 ± 10,33	0,452
80% GET (μM)	25,50 ± 21,31	24,17 ± 17,13	0,674
80% GET – 20 Watt (μM)	6,38 ± 10,24	5,84 ± 7,32	0,779

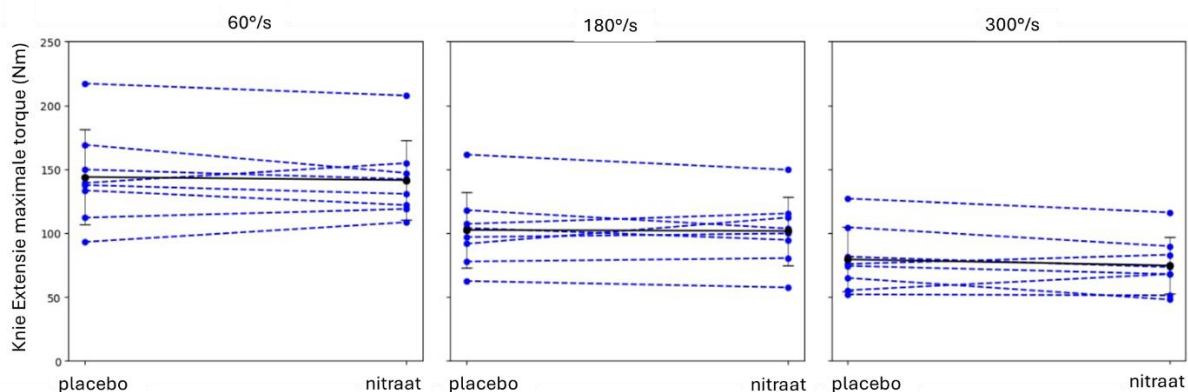
Noot. Data zijn gemiddelde ± SD



Figuur 12. A: $\dot{V}O_2$ amplitude (L/min; verschil tussen $\dot{V}O_2$ 80% GET en $\dot{V}O_2$ 20 W). Groepsgemiddelde ± SD en individuele responsen (stippellijn) **B:** HHb amplitude (μM ; verschil tussen HHb 80% GET en HHb 20W) . Groepsgemiddelde ± SD en individuele responsen (stippellijn).

4.1.4 Krachttesten Biodex

Bij de isokinetische krachttesten op de Biodex werden twee variabelen gemeten: maximale torque en gemiddelde torque, bij drie verschillende hoeksnelheden: 60°/s, 180°/s en 300°/s. Bij de isokinetische krachttesten werden geen significante verschillen in de maximale torque gevonden voor kniestrekkingen tussen placebo- en niraatsuppletieconditie. Hoewel deze waarden niet significant verschillen was de maximale torque bij zowel 60°/s, 180°/s en 300°/s iets hoger bij placebo dan bij niraat (1,70%; 0,78%; 5,99%; respectievelijk). Deze verschillen worden echter als niet significant beschouwd en kunnen worden gezien als verwaarloosbaar in praktische zin ($p=0,625$; $p=0,852$; $p=0,238$; tabel 6 en figuur 13). Daarnaast werden ook voor de gemiddelde torque geen significante verschillen gevonden bij hoeksnelheden aan 60°/s, 180°/s en 300°/s ($p=0,208$; $p=0,908$; $p=0,270$; tabel 6).



Figuur 13. Peak torque voor isokinetische knie extensies aan verschillende hoeksnelheden: 60°/s, 180°/s, 300°/s. Groepsgemiddelde (\pm SD) en individuele responsen (stippellijnen) zijn weergegeven. Vergelijking tussen placebo- en niraatconditie.

Bij de isometrische testen werden twee maximale vrijwillige contracties gemeten (MVC 1 en MVC 2). Voor beide MVC's werden twee variabelen geanalyseerd: de maximale torque en de gemiddelde torque. Van deze twee variabelen (MVC 1 en MVC 2) werden telkens de gemiddelden berekend om de variatie tussen de twee pogingen te compenseren. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de placebo- en niraatsuppletieconditie voor alle variabelen bij de knie-extentie ($p>0,05$; tabel 6). Ondanks het gebrek aan statistische significantie was de prestatie iet beter met placebo in vergelijking met niraat, behalve voor de gemiddelde torque van MVC 2.

Tenslotte werden ook elektrostimulatie testen gedaan op de Biodex, zowel met een enkelvoudige shock (singlet) als met dubbele shocken aan een frequentie van 10 Hz en 100 Hz, om het effect van nitraatsuppletie op de spierkracht en -prestatie te onderzoeken. Voor alle metingen van de maximale torque bereikten de verschillen geen significantie ($p > 0,05$; tabel 6). Daarnaast werden ook andere variabelen gemeten zoals de mate van relaxatie (ROTR), de mate van krachtontwikkeling, de contractietijd en de half relaxatietijd, maar wederom was dit niet significant en bijgevolg niet verder gerapporteerd in deze thesis.

Tabel 6: Inspanningsdata krachttesten Biodex placebo vs nitraat (kniestrekkingen)

Meting	Conditie		P-waarden
<u>Isokinetische testen</u>	PLA	NIT	
Maximale torque 60°/s (Nm)	143,90 ± 37,40	141,45 ± 30,91	0,625
Maximale torque 180°/s (Nm)	102,42 ± 29,51	101,62 ± 26,87	0,852
Maximale torque 300°/s (Nm)	79,42 ± 25,32	74,66 ± 21,97	0,238
Gemiddelde torque 60°/s (Nm)	87,34 ± 27,06	84,71 ± 25,45	0,208
Gemiddelde torque 180°/s (Nm)	59,64 ± 20,95	60,00 ± 18,28	0,908
Gemiddelde torque 300°/s (Nm)	47,39 ± 19,49	42,96 ± 12,26	0,270
<u>Isometrische testen</u>			
Maximale torque MVC 1 (Nm)	195,75 ± 44,35	187,73 ± 37,52	0,493
Maximale torque MVC 2 (Nm)	182,85 ± 44,49	180,40 ± 36,76	0,484
Maximale torque MVC 1&2 (Nm)	189,30 ± 43,78	184,06 ± 35,88	0,596
Gemiddelde torque MVC 1 (Nm)	180,06 ± 42,65	172,22 ± 37,90	0,557
Gemiddelde torque MVC 2 (Nm)	159,35 ± 32,08	161,03 ± 37,16	0,888
Gemiddelde torque MVC 1&2 (Nm)	169,70 ± 36,08	166,62 ± 36,26	0,786
<u>Elektrostimulatie</u>			
Maximale torque enkel (Nm)	38,48 ± 10,89	36,72 ± 9,35	0,134
Maximale torque 10 Hz (Nm)	62,03 ± 19,73	60,32 ± 17,87	0,208
Maximale torque 100 Hz (Nm)	65,90 ± 12,92	64,61 ± 14,85	0,401
ROTR 100 Hz	-663,49 ± 147,97	-571,50 ± 125,52	0,132

Noot. Data zijn gemiddeld ± SD

4.2 Verband met spiervezeltype

In Tabel 7 worden de correlaties weergegeven tussen het spiervezeltype van de proefpersonen en de prestatieverbetering met nitraat ten opzichte van placebo, uitgedrukt in relatieve deltawaarden. Deze deltawaarden tonen de procentuele veranderingen van de nitraatconditie ten opzichte van de placeboconditie. Een positieve deltawaarde duidt op een hogere waarde in de nitraatconditie, terwijl een negatieve deltawaarde wijst op hogere waarde in de placeboconditie.

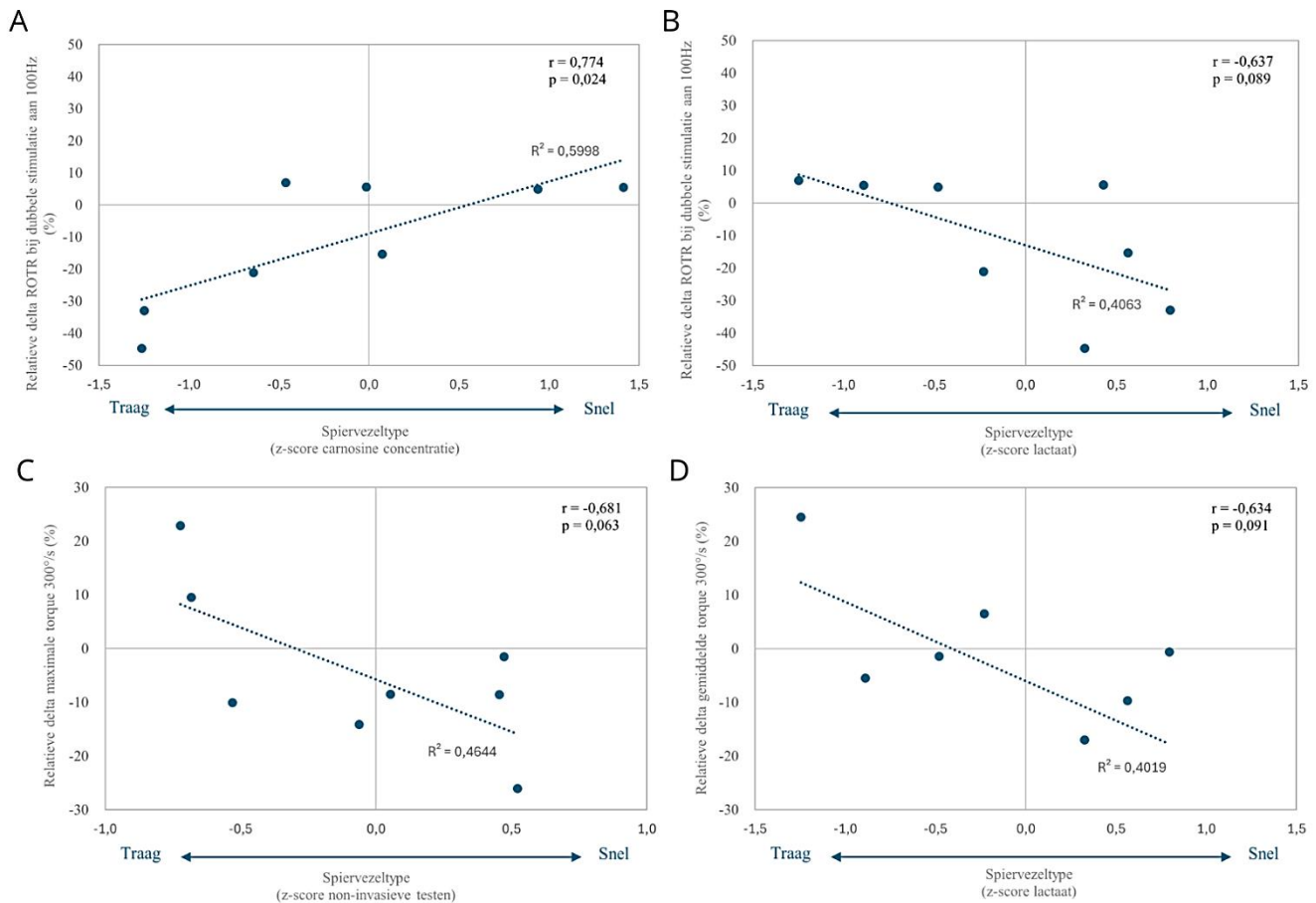
Aangezien het spiervezeltype van de proefpersonen werd bepaald op verschillende manieren, werd de correlatie genomen met de z-scores van iedere soort spiervezeltype bepaling (oppervlakte type II vezels, carnosine concentratie, lactaat na een wingate en de ROTR) en het gemiddelde van de 3 non-invasieve testen.

Tabel 7: De correlatie tussen relatieve deltawaarden van de verschillende testen (placebo vs nitraat) en de z-score van spiervezeltype bepaald met verschillende methoden.

Correlatiecoëfficiënt (r)					
	Z-score oppervlakte type II vezels	Z-score carnosine concentratie	Z-score lactaat	Z-score ROTR	Gemiddelde z-score 3 non-invasieve testen
4 km tijdrit					
Prestatie	0,259	0,023	0,186	0,129	0,188
Vermogen	-0,251	-0,106	-0,155	-0,171	-0,252
Spierkrachttesten					
<i>Isokinetische testen</i>					
Maximale torque 60°/s (Nm)	0,134	0,195	0,008	0,390	0,386
Maximale torque 180°/s (Nm)	-0,084	-0,330	0,018	-0,354	-0,432
Maximale torque 300°/s (Nm)	-0,050	-0,441	-0,378	-0,351	-0,681* (p=0,063)
Gemiddelde torque 60°/s	0,299	-0,071	0,307	0,471	0,418
Gemiddelde torque 180°/s	-0,119	-0,120	0,018	-0,240	-0,227
Gemiddelde torque 300°/s	0,043	-0,072	-0,634* (p=0,091)	0,096	-0,274
<i>Isometrische testen</i>					
Maximale torque MVC 1 (Nm)	-0,586	-0,071	-0,084	0,268	0,099
Maximale torque MVC 2 (Nm)	-0,690* (p= 0,058)	-0,167	-0,381	0,000	-0,310
Maximale torque MVC1&2	-0,690* (p=0,058)	-0,281	0,001	0,066	-0,126
Gemiddelde torque MVC 1	-0,677* (p=0,065)	-0,168	-0,025	0,144	-0,016
Gemiddelde torque MVC 2	-0,218	-0,379	0,258	-0,074	-0,160
Gemiddelde torque MVC1&2	-0,509	-0,336	0,125	0,043	-0,096
<i>Elektrostimulatie</i>					
Gemiddelde torque enkel (Nm)	-0,376	0,336	-0,030	0,057	0,229
Maximale torque 100 Hz (Nm)	-0,333	0,238	0,190	-0,238	-0,071
ROTR 100 Hz	-0,343	0,774** (p=0,024)	-0,637* (p=0,089)	0,056	0,212
Submaximale test					
$\dot{V}O_2$ 20W	0,363	0,660* (p=0,075)	-0,001	-0,015	0,391
$\dot{V}O_2$ 80W	-0,089	-0,383	0,079	-0,331	-0,420
VO ₂ 80% GET - 20W	-0,107	0,102	0,197	0,097	0,219
HHB 80% GET - 20W	-0,292	0,042	-0,108	-0,385	-0,285

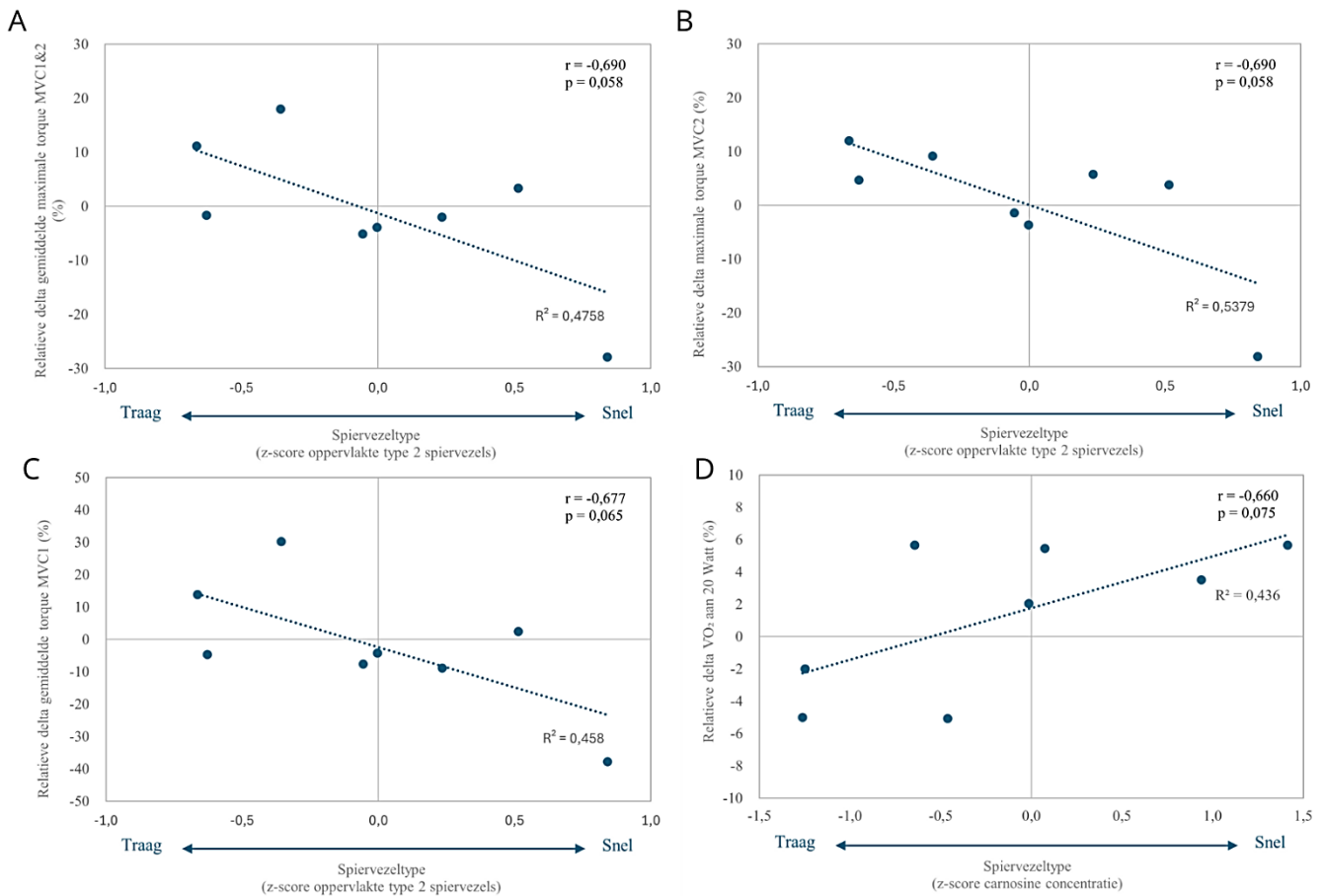
Spearman: Peak torque MVC1, peak torque 100 Hz
Significant** (P <0,05), trend tot significantie* (P = 0,05 - 0,1)

Het merendeel van de significante correlaties of de correlaties die een trend tot significantie toonden werden teruggevonden bij de krachttesten. Er werd slechts één sterke significante positieve relatie gevonden ($r=0,774$; $p=0,024$) tussen het verschil in ROTR bij een dubbele stimulatie aan 100Hz (placebo en nitraat) en het spiervezeltype van de proefpersonen bepaald op basis van de carnosineconcentratie (figuur 14a). Proefpersonen met een hogere carnosineconcentratie, wat wijst op een sneller spiervezeltype, vertoonden bij nitraatgebruik een snellere spiercontractierelaxatiesnelheid in vergelijking met deelnemers met een lagere carnosineconcentratie. Maar wanneer het spiervezeltype bepaald werd aan de hand van de lactaatmethode zag men een tegenovergestelde correlatie ($r=-0,63$; $p=0,089$; figuur 14b), indicierend op een groter voordeel met nitraat voor personen met een traag spiervezeltype. Daarnaast werd er vastgesteld dat de proefpersonen met een trager spiervezeltype, gemeten op basis van de 3 niet-invasieve testen, een hogere maximale torque aan $300^\circ/s$ hadden met nitraat in vergelijking met placebo ($r=-0,681$; $p=0,063$; figuur 14c). Dit kon men ook vaststellen bij de gemiddelde torque aan $300^\circ/s$, maar daarbij werd het spiervezeltype bepaald aan de hand van lactaat ($r=-0,634$; $p=0,091$; figuur 14d).



Figuur 14. : A. De correlatie tussen de z-score van de carnosine concentratie (spiervezeltypering: $\leq -0,5$ = type I; $-0,5-0,5$ = intermediate; $\geq 0,5$ = type II) en het relatieve verschil van de rate of torque relaxation (ROTR) aan 100 Hz tussen de placebo en de nitraatconditie, $r=0,774$. **B.** De correlatie tussen de z-score van de spiervezeltypebepaling aan de hand van de lactaatmethode en het relatieve verschil van de rate of torque relaxation (ROTR) aan 100 Hz tussen de placebo en de nitraatconditie, $r = -0,637$. **C.** De correlatie tussen de z-score van de non-invasieve spiervezeltypebepalingen en het relatieve verschil in maximale torque aan 300° tussen de placebo en de nitraatconditie. **D.** De correlatie tussen de z-score van de spiervezeltypebepaling aan de hand van de lactaatmethode en het relatieve verschil in gemiddelde torque aan 300° tussen de placebo en de nitraatconditie.

Verder werden er bij de isometrische krachttesten drie negatieve correlaties gevonden die een trend tot significantie aantoonden. Proefpersonen met een trager spiervezeltype, gemeten aan de hand van een biopsie, hadden een grotere gemiddelde maximale torque met nitraat in vergelijking met placebo ($r=-0,690$; $p=0,058$; figuur 15a). Ook bij de maximale torque van MVC2 ($r=-0,690$; $p=0,058$; figuur 15b). en de gemiddelde torque van MVC1 ($r=-0,677$; $p=0,065$; figuur 15c) verlopen de correlaties op dezelfde manier. Tot slot werd er bij de submaximale fietstest één correlatie met een trend tot significantie waargenomen. Proefpersonen met een sneller spiervezeltype, gemeten aan de hand van de carnosine concentratie, hadden een hogere $\dot{V}O_2$ aan 20 Watt met nitraat in vergelijking met placebo ($r=0,660$; $p=0,075$; figuur 15d).



Figuur 15. De correlatie tussen de z-score van de spiervezeltypebepaling aan de hand van de oppervlakte type II spiervezels en **A.** het relatieve verschil in de gemiddelde maximale torque van MVC1 en MVC2, $r = -0,690$ **B.** het relatieve verschil in maximale torque van MVC2, $r = -0,690$ en **C.** de gemiddelde torque van MVC1 tussen de placebo en de nitraatconditie $r = -0,677$. **D.** De correlatie tussen de z-score van de spiervezeltypebepaling aan de hand van de carnosineconcentratie en het relatieve verschil in de $\dot{V}O_2$ aan 20 Watt tussen de placebo en de nitraatconditie, $r = -0,660$.

Het is belangrijk om te vermelden dat er slechts één trend tot significant verschil werd geconstateerd bij de vergelijking tussen nitraat en placebo in alle testen van dit onderzoek. Bij de prestatie van de 4 km tijdrit werd er, zoals hierboven al vermeld, een positief effect waargenomen van nitraat ($p = 0,067$). Er werd echter geen significante correlatie gevonden tussen dit verschil en het verschil in spiervezeltype bepaald volgens de 4 methoden.

5 Discussie

5.1 Inleiding

Het doel van dit onderzoek was om te bepalen of de verdeling van spiervezeltypes de prestatiebevorderende effecten van nitraatinname bij recreatief actieve mannen en vrouwen beïnvloedt. Op basis van de literatuurstudie stelden we de hypothese dat nitraatsuppletie grotere prestatiebevorderende effecten zou hebben bij individuen met een hoger percentage type II spiervezels omdat de reductie van nitriet tot stikstofmonoxide wordt bevorderd in een hypoxische en zure omgeving. Hoewel dit effect eerder is bevestigd bij muizen (Jones et al., 2016), bleef de vraag bij mensen onbeantwoord, wat de focus van dit onderzoek heeft bepaald. Om deze hypothese te onderzoeken werden drie verschillende prestatietesten uitgevoerd: een 4 km tijdrit, een submaximale fietstest en krachttesten met behulp van een Biodex-apparaat. Bovendien werd het spiervezeltype van de proefpersonen bepaald en gecorreleerd met de resultaten van de drie testen.

De belangrijkste bevinding van deze studie is dat er geen significant verschil ($p < 0,05$) teruggevonden werd tussen de resultaten van alle testen wanneer de placeboconditie werd vergeleken met de nitraatsuppletieconditie. Een trend naar significantie werd echter waargenomen bij de 4 km tijdrit, waarbij de nitraatconditie 0,41% sneller was dan de placeboconditie. Dit minimale effect van nitraat staat in contrast met onze hypothese dat nitraatinname prestatiebevorderende effecten zou hebben. De correlaties tussen deze ontbrekende effecten op de testen en het spiervezeltype van de proefpersonen moeten dus met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden.

5.2 De 4 km tijdrit en de correlatie met spiervezeltype

De belangrijkste bevinding bij de 4 km tijdrit was een trend richting significantie in de tijd die nodig was om de 4 km tijdrit te voltooien. Proefpersonen onder invloed van nitraat registreerden een 0,41% kortere tijd in vergelijking met de placeboconditie ($p=0,067$). Dit duidt op een mogelijke prestatieverbetering door nitraatsuppletie, hoewel de resultaten geen volledige significantie vertoonden.

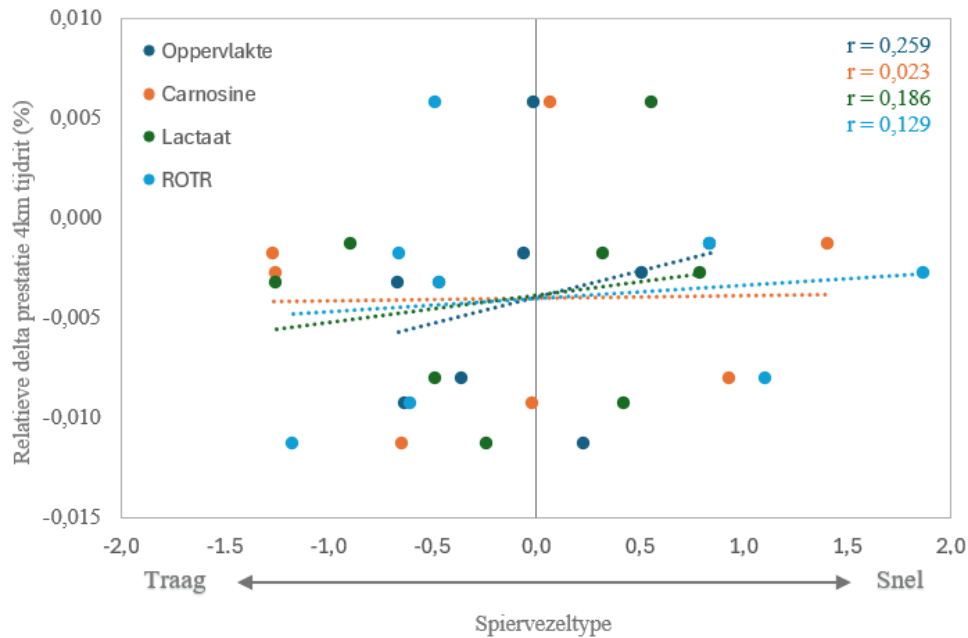
In vergelijking met eerder onderzoek van Lansley et al. (2011), waarin acute nitraatsuppletie met 0,5 liter bietensap (~ 6,2 mmol nitraat) tot een significante prestatieverbetering bij 4- en 16 km-tijdritten (respectievelijk 2,8% en 2,7%) bij getrainde mannelijke wielrenners leidde, is de prestatieverbetering van 0,41% in deze studie beduidend kleiner. Naast een verbeterde tijd vonden Lansley et al. ook een significante stijging van 5% in vermogen na nitraatsuppletie, terwijl in deze studie het vermogen slechts met 1,07% toenam. Het gebrek aan significantie in de huidige studie kan mogelijk worden verklaard door verschillen in het cohort. Lansley et al. gebruikten een vergelijkbaar gerandomiseerd cross-over design met 8 proefpersonen, maar hun cohort bestond uit mannelijke fietsers. De cohort van deze studie omvatte zowel mannen als vrouwen.

De geslachtsverschillen zouden een rol kunnen spelen in de respons op nitraatsuppletie. Op basis van eerder onderzoek zou de hypothese gesteld kunnen worden dat vrouwen mogelijk minder profiteren van nitraatsuppletie dan mannen, door factoren zoals lagere bloeddruk en hormonale invloeden zoals de invloed van progesteron op de NO-productie (Scichilone et al. 2013; Wickham et al., 2019). Andere studies zoals de recente studie van Casado et al. (2021) tonen dan weer aan dat zowel mannen als vrouwen prestatiebevorderende effecten ondervinden van nitraatsuppletie, of zelf dat vrouwen beter reageren op nitraat dan mannen (Coggan et al., 2018). Daarnaast vonden we in deze studie bij afzonderlijke analyses van mannen en vrouwen geen significante verschillen in tijdritprestaties. Dit kan deels te wijten zijn aan het kleine aantal deelnemers (vier mannen en vier vrouwen), wat het moeilijk maakt om eventuele geslachtsverschillen te detecteren. Dit wijst nogmaals dat verdere studies nodig zijn om dit beter te begrijpen en de hypothese te toetsen.

Een ander verschil is het suppletieprotocol, Lansley et al. onderzochten het effect van acute innname van nitraat, terwijl de studie van onze thesis zich richtte op chronische suppletie. Eerder

onderzoek suggereert dat chronische suppletie effectiever zou zijn, omdat het waarschijnlijk de bloednitraatconcentraties aanzienlijk verhoogt en mogelijk een NO-reservoir creëert in bloed en weefsels (Jones et al., 2020). Voorgaand onderzoek, zoals dat van Cermak et al.(2012) en Glaister et al.(2015), toonde aan dat een enkele dosis geconcentreerd bietensap, in tegenstelling tot de studie van Lansley et al., geen significante prestatieverbetering opleverde bij respectievelijk een één uur durende tijdrit en een 20 km tijdrit. Jo et al. (2019) ondersteunde deze bevindingen en liet zien dat langdurige niraatsuppletie prestaties verbeterde zonder veranderingen in zuurstofvoorziening, terwijl eenmalige dosering geen effect had. Ondanks deze bevindingen zijn er ook studies die, net zoals de huidige studie, geen significant effect vonden op een tijdritprestatie na chronische niraatsuppletie (Callahan et al., 2017; de Castro et al., 2019; Kramer et al., 2016). De inconsistentie in de literatuur bij tijdritten is moeilijk te achterhalen, maar kan mogelijk te maken hebben met variabelen zoals het cohort, de suppletieperiode en verschillen in het protocol.

Het huidig onderzoek keek niet alleen naar het effect van niraat in vergelijking met een placebo, maar onderzocht ook een mogelijk verband tussen het spiervezeltype en de effecten van niraatsuppletie. Bij de 4 km tijdrit werden er enkel zwakke, niet significante positieve correlaties teruggevonden (figuur 16). Uit deze resultaten blijkt dus dat de ergogene effecten van niraat mogelijks niet samenhangen met de spiervezeltypologie. Belangrijk om te vermelden is dat deze ‘ergogene effecten’ slechts een trend tot significantie vertoonden en er dus mogelijks onvolledig representatieve correlaties gevormd zijn. Dit gaat in tegen onze hypothese maar in recentelijk onderzoek, met sprintprestaties weliswaar, vertoonde de snelheid tijdens de laatste 10m van een 30-40m sprint een positieve samenhang met het percentage type II spiervezels onder invloed van niraat ($r = 0.57$, $P = 0.015$) (Robinson et al., 2024).



Figuur 16. De correlatie tussen de z-score van de verschillende spiervezeltype bepalingen en het relatieve verschil in de prestatie tussen de placebo en de nitraatconditie op de 4 km tijdrit (tt).

De studie van Robinson et al. (2024) sluit wel aan bij onze hypothese maar zou kunnen suggereren dat er pas samenhang is tussen nitraat en spiervezeltype wanneer de maximale snelheid is bereikt, bij zeer korte intensieve inspanningen. Ondanks dat een tijdrit van 4km aan de korte kant is, zou het dus kunnen dat de intensiteit hiervan niet hoog genoeg lag om een correlatie te zien met het spiervezeltype. Bij inspanningen van hogere intensiteit worden er meer type II spiervezels gerekruteerd, wat dus mogelijks de erogene effecten van nitraat zou kunnen versterken. Dat is het 'size principle' van (Henneman et al., 1965a, 1965b), motorunits worden gerekruteerd op basis van hun grootte: kleinere, langzame motorunits worden eerst gerekruteerd, gevolgd door progressief grotere, snellere motorunits wanneer de krachtbehoefte toeneemt. Er kan hierbij wel opgemerkt worden dat bij zeer korte, maximale inspanningen er mogelijks geen verzuring optreedt aangezien het anaeroob alactisch systeem domineert en de lactaataccumulatie uitblijft. Verzuring is, zoals uit de literatuurstudie gebleken, juist een belangrijke stimulus is voor de omzetting van nitriet naar stikstofmonoxide.

Het is ook belangrijk om te vermelden dat Robinson et al. (2024) geen algemene prestatieverbetering vonden, enkel de snelheid in de laatste meters was verbeterd bij nitraat ten opzichte van placebo. Of er een correlatie was met de volledige sprintsnelheid en het spiervezeltype is onbekend. Er bestaat dus nog geen duidelijkheid of er nu een verband is tussen de invloed van nitraat op tijdritprestaties en het spiervezeltype van proefpersonen. Er is uitgebreider en overtuigender onderzoek nodig om dit aan te kunnen tonen.

5.3 De submaximale fietstest en de correlatie met spiervezeltype

Ten tweede werd tijdens het onderzoek een submaximale fietstest afgelegd, waaruit de $\dot{V}O_2$ en HHB-waarden werden bekeken. De resultaten van deze testen laten zien dat er nauwelijks verschillen waren in de gemiddelde $\dot{V}O_2$ -waarden tussen de nitraat- en placebocondities, bij zowel 20 Watt als 80% van de GET. Dit wijst erop dat nitraatsuppletie in dit onderzoek de zuurstofopname en het -verbruik bij submaximale inspanning niet verbeterde. Het resultaat staat in contrast met enkele eerdere studies, zoals die van Bailey et al. (2009) en Cermak et al. (2012), Larsen et al. (2007), waarin lagere $\dot{V}O_2$ -waarden werden waargenomen bij submaximale inspanningen na nitraatsuppletie, wat werd geïnterpreteerd als een verbeterde efficiëntie van de zuurstofopname in de spieren.

Het zijn voornamelijk elite atleten die geen ergogeen effect van nitraat ondervinden bij submaximale inspanningen (Bescos et al., 2012; Boorsma et al., 2014; Peacock et al., 2012). Zoals aangehaald in '1.3.5.3 Ergogene effecten en trainingsstatus', kan dit mogelijk verklaard worden door het feit dat elite-atleten, vanwege hun hogere basale nitrietwaarden en betere spiercapillarisation, minder afhankelijk zijn van de nitraat-nitriet-NO-route (Jensen et al., 2004; Jungersten et al., 1997; Lansley et al., 2011; Porcelli et al., 2015; Wilkerson et al., 2012). In de literatuur zijn er nauwelijks studies te vinden waarbij de $\dot{V}O_2$ onveranderd blijft bij een vergelijkbare subgroep (recreatief) van proefpersonen. Een mogelijke oorzaak hiervan is publicatiebias. Toch is er een studie uit 2019 waarbij er geen effect van nitraatsuppletie op de $\dot{V}O_2$ werd teruggevonden bij een recreatieve cohort. In deze studie kregen twaalf actieve vrouwen gedurende 8 dagen 26 mmol nitraat per dag, waarna ze een submaximale inspanning aan 50% en 70% van de $\dot{V}O_{2max}$ volbrachten (Wickham et al., 2019). De grote verschillen met huidige studie zijn enerzijds de hoge dosis nitraat (26 mmol/d) die 303% hoger ligt met het gevolg dat 58% van de proefpersonen bijwerkingen ervaarden bij zowel acute als chronische suppletie, dit zou de resultaten beïnvloed kunnen hebben. Anderzijds bestond de cohort voor 100% uit vrouwen en suggereert men ook hier geslachtsverschillen als mogelijke beïnvloedende factor, verder onderzoek zal moeten uitwijzen of deze verschillen bestaan.

Er werd bij deze test één correlatie met een trend tot significantie waargenomen: proefpersonen met een trager spiervezeltype, gemeten aan de hand van de carnosineconcentratie, hadden een lager zuurstofverbruik bij 20 Watt met nitraat in vergelijking met placebo ($r=0,660$; $p=0,075$).

Dit is in tegenstelling tot onze hypothese. Echter lag de VO_2 niet significant lager tussen de placebo- en nitraatcondities, wat zou kunnen suggereren dat deze correlatie mogelijk toeval is wat niet ongebruikelijk is bij een kleine cohort. Daarnaast blijft bij een lage inspanningsintensiteit van 20 Watt het gebruik van de snelle spiervezels mogelijks uit door het 'size principle' (Henneman et al., 1965a, 1965b).

De redenen waarom de bevindingen bij de submaximale test afwijken van de hypothese kunnen dus uiteenlopend zijn en moeilijk te achterhalen, maar ze hebben ons doen nadenken over een nieuwe hypothese: 'Zouden de ergogene effecten van nitraat juist meer voorkomen in trage spiervezels?' Het zou zomaar kunnen dat trage spiervezels, vanwege hun aerobe energieproductie en grotere mitochondriale dichtheid (Andersen et al., 1984; Nemeth et al., 1984), efficiënter gebruik kunnen maken van zuurstof en dus meer zouden kunnen profiteren van nitraatsuppletie. Aangezien trage spiervezels meer zuurstof verbruiken, zou de nood aan zuurstof juist groter kunnen zijn in deze vezels tijdens intensieve inspanningen. Het vaatverwijdende effect van NO zou er voor kunnen zorgen dat de nood aan O_2 in deze vezels makkelijker vervuld wordt. Eerder onderzoek suggereert ook dat nitraat de mitochondriale functie kan verbeteren (Larsen et al., 2011). Het precieze mechanisme is onbekend, maar nitriet kan ervoor zorgen dat er meer ATP wordt geproduceerd per hoeveelheid gebruikte zuurstof. Er wordt gesuggereerd dat NO de efficiëntie van oxidatieve fosforylering kan verbeteren door het verminderen van "lekkage" van de mitochondriale protonpompen of het verlagen van de expressie van ontkoppelingsproteïnen (Clerc et al., 2007). Deze 'alternatieve' hypothese is echter voorzichtig geformuleerd gezien het ontbreken van significantie, dus verder onderzoek is nodig om deze richting verder te verkennen.

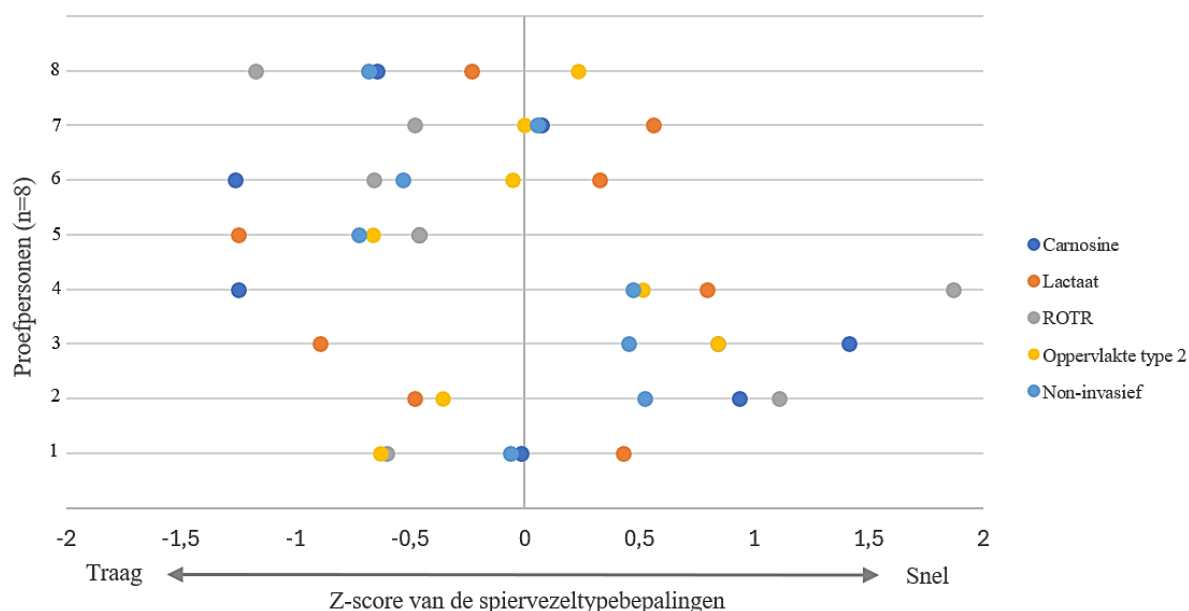
5.4 Spiercontractie en de bijhorende correlaties met spiervezeltype

Ten slotte werden krachttesten uitgevoerd, zowel zonder als met elektrostimulatie, waarbij geen significante verschillen werden gevonden tussen de placebo- en nitraatcondities. De maximale en gemiddelde torques waren over het algemeen iets hoger in de placeboconditie vergeleken met de nitraatconditie. Verder was de ROTR bij dubbele stimulatie aan 100 Hz iets lager in de nitraatconditie, wat betekent dat de spieren van de proefpersonen trager relaxeerden na contractie. Hoewel een tragere spierrelaxatie met nitraat kan duiden op een verminderde spierfunctie (Mathern et al., 2018), was ook dit effect niet significant. Deze resultaten lijken niet in lijn te zijn met de verwachting dat nitraat de spiercontractiele functie zou verbeteren (Haider & Folland, 2014). Echter, Hoon et al. (2015) vonden ook geen verbetering in de half relaxatietijd bij contracties tot 100 Hz tussen nitraat en placebo. In de literatuur zijn er over het algemeen bij krachttesten wisselende resultaten terug te vinden. Ondanks dat er talrijke studies zijn die het ergogene effect van nitraat op de spiercontractiliteit bij de mens aantonen (Coggan et al., 2015; Coggan et al., 2018; Domínguez et al., 2017; Haider en Folland, Rimer et al., 2016), zijn er ook verschillende onderzoeken die dit niet kunnen bewijzen zoals Jonvik et al. in 2021 (chronische suppletie) en Lee et al. in 2019 (acute suppletie) met een gelijkaardige subgroep.

In een vergelijkbaar opgezet onderzoek door Coggan et al. (2018) met acute suppletie werd een gemiddelde stijging van $4.4 \pm 8.1\%$ in maximaal vermogen (torque x hoeksnelheid) waargenomen bij isokinetische kniestrekkingen. Opvallend was echter de interindividuele variabiliteit in maximaal vermogen, variërend van -9.6% tot $+26.8\%$, wat gecorreleerd bleek te zijn met de nitrietconcentratie in het plasma van de proefpersonen. Deze variabiliteit suggereert dat de biobeschikbaarheid van nitraat in het bloedplasma kan leiden tot variërende effecten van de suppletie bij individuen. In het huidige onderzoek zien we ook aanzienlijke individuele variabiliteit terugkomen in de maximale torque van de isokinetische krachttesten, variërend van -26.06% tot $+22.90\%$. Visueel kan er ook opgemerkt worden dat sommige proefpersonen hogere torque scores behalen met nitraat, terwijl anderen juist lagere torque scores laten zien (figuur 13). Bovendien zijn de standaardafwijkingen hoog voor $60^\circ/\text{s}$ ($sd = 30.91$), $180^\circ/\text{s}$ ($sd = 26.87$) en $300^\circ/\text{s}$ ($sd = 21.97$). Helaas werd de nitrietconcentratie in het plasma niet gemeten, maar dit kan in de toekomst een nuttige tool zijn om interindividuele variabiliteit verder te onderzoeken.

Er zijn verschillende zaken die interindividuele variabiliteit zouden kunnen verklaren waaronder het spiervezeltype van de proefpersonen. In de resultatensectie was te zien dat de ROTR bij de nitraatconditie positief gecorreleerd was met een hoger aandeel snelle spiervezels. Als enige positieve correlatie in dit onderzoek lijkt deze op het eerste zicht aan te sluiten bij de gestelde hypothese, maar bij nader inzien wordt het duidelijk dat deze met grote voorzichtig geïnterpreteerd moet worden om verschillende redenen. Eerst en vooral was er geen positief effect van nitraat op deze ROTR zoals hierboven beschreven, de ROTR bij de nitraatconditie was over het algemeen trager dan bij placebo maar dit verschil was niet significant. Ten tweede waren de verschillen tussen placebo en nitraat minimaal bij proefpersonen met een hoger aandeel snelle spiervezels, dit is te zien op figuur 14. De ROTR verhoogde slechts licht bij twee proefpersonen, terwijl de verschillen bij proefpersonen met meer trage spiervezels groter waren. Dit zou eventueel kunnen suggereren dat proefpersonen met meer trage spiervezels een verminderde spierfunctie ondervinden na nitraatsuppletie. Tot slot speelt de kleine cohort van 8 proefpersonen een rol in de betrouwbaarheid van deze correlatie aangezien willekeurigheden de correlatie kunnen beïnvloeden.

Een mogelijke aanwijzing voor de aanwezigheid van willekeurige correlaties in het onderzoek is de tegenstrijdige correlatie bij de ROTR, waarbij opvallend genoeg een negatieve correlatie werd gevonden wanneer het verschil in ROTR werd gecorreleerd met het spiervezeltype, bepaald aan de hand van de lactaatconcentratie. Deze correlatie toonde echter slechts een trend tot significantie maar roept vragen op over de betrouwbaarheid van de correlaties en de methoden om de spiervezeltypes te bepalen. In figuur 17 is te zien dat proefpersonen anders scoren op het continuüm van hoeveelheid trage naar snelle spiervezels, afhankelijk van de gebruikte methode. Er is vaak wel een trend van de 4 testen in dezelfde richting maar de uitkomsten van de methoden komen in deze studie zelden volledig overeen. Voornamelijk bij proefpersoon 3 en 4 is er een grote variatie te zien.



Figuur 17. Geeft de bepaling van spiervezeltype op een continuüm weer per proefpersoon aan de hand van de z-score van elke methode die gebruikt werd in dit onderzoek

Deze bevindingen roepen vragen op voor ons onderzoek, aangezien ze suggereren dat de verschillende methoden voor het bepalen van spiervezeltypes niet consistent met elkaar correleren. Hoewel deze observatie correct is, willen we benadrukken dat de keuze voor deze invasieve en niet-invasieve meetmethoden zorgvuldig is overwogen. Uit ongepubliceerde data uit het labo, waarin hetzelfde protocol werd toegepast op een grotere steekproef van 39 recreatief actieve deelnemers (19 mannen en 20 vrouwen), bleek dat de correlaties tussen de verschillende testen positief en significant waren (zie tabel 8).

Tabel 8: Correlaties tussen de verschillende methoden voor het bepalen van spiervezeltypes bij 39 proefpersonen, uit ongepubliceerde data uit de onderzoeksgroep van Wim Derave.

	Carnosine	Lactaat	ROTR	Oppervlakte type 2
Carnosine	1			
Lactaat	0,417**	1		
ROTR	0,502**	0,478**	1	
Oppervlakte type 2	0,475**	0,689**	0,400**	1

*Noot. Data zijn correlatiecoëfficiënt (r); significant** (P < 0,05)*

Het ontbreken van significante correlaties in onze studie kan mogelijk te wijten zijn aan het beperkte aantal proefpersonen. Aangezien dit een pilotstudie was, gericht op het verkennen van de methoden met het oog op uitbreiding naar een grotere steekproef, lijkt de kleine

steekproefomvang een logische verklaring voor het uitblijven van significante correlaties, zonder dat dit noodzakelijk de validiteit van de gebruikte methoden ondermijnt.

Naast de correlatie met de ROTR werd het effect van nitraat ook negatief gecorreleerd met enkele parameters van de isometrische krachttesten. Dit wijst op een zwakkere maximale of gemiddelde torque bij personen met een snel spiervezeltype, gemeten op basis van de gouden standaard van meerdere biopsies, na inname van nitraat. Deze bevindingen staan in contrast met recent onderzoek waarbij over het algemeen deelnemers met een minder efficiënte mitochondriale ademhaling en een grotere samenstelling snelle spiervezels, de grootste toename in torque bij isokinetische kniestrekkingen na nitraatsuppletie hadden (Robinson et al., 2024). De kniestrekkingen waren na nitraatinname wel over het algemeen ook in dat onderzoek niet significant verbeterd. Aangezien de literatuur hierover nog maar in zijn kinderschoenen staat, is het moeilijk hier reeds conclusies over te trekken. Het is wel duidelijk dat deze resultaten vragen om bijkomend onderzoek.

5.5 Limitaties en aanknopingspunten voor verder onderzoek

Deze studie kent enkele belangrijke beperkingen die in acht moeten worden genomen bij de interpretatie van de resultaten. Ten eerste zijn er slechts acht proefpersonen. Dit geringe aantal vermindert de statistische kracht en generaliseerbaarheid van de bevindingen. Bovendien leken sommige proefpersonen een intermediair spiervezeltype te hebben volgens de spiervezeltypebepaling aan de hand van de oppervlakte type II spiervezels (spierbiopten) (figuur 17), dat niet duidelijk binnen de categorieën trage of snelle spiervezels valt. Dit kan de resultaten beïnvloeden en maakt de steekproef die wel in een van de twee categorieën hoort kleiner. Voorafgaande selectie op basis van spiervezeltypologie zou eventueel beter geweest kunnen zijn.

Daarnaast werden de spierbiopten genomen uit de vastus lateralis en de gastrocnemius. Hoewel dit een gebruikelijke methode is, kan het geen volledige representatie van het spierweefsel in het hele lichaam bieden. Hierdoor is het mogelijk dat de bevindingen niet volledig representatief zijn voor de spiervezeltypes in andere delen van het lichaam. Er wordt echter wel gesuggereerd dat spiervezeltypering bestaat over verschillende spieren heen (Vikne et al., 2012).

Verder is een acute of dagelijkse dosis nitraat volgens Senefeld et al. (2020) pas prestatiebevorderend boven de 6 mmol, en lijkt er geen extra voordeel te zijn bij doseringen boven de 12 mmol. De dosis nitraat in de huidige studie (6,45 mmol per dag gedurende 7 dagen) zou dus mogelijk te laag kunnen zijn geweest voor bepaalde proefpersonen die minder goed reageren op nitraat. Interessant is dat bij hogere nitraatdoseringen er doorgaans meer responders zijn, wat suggereert dat sommige proefpersonen een hogere dosis nitraat nodig hebben om effecten te ervaren (Wylie et al., 2013).

Tot slot is de laatste beperking dat er geen nitraat- en nitrietwaarden in het plasma van de proefpersonen zijn geanalyseerd. Dit bemoeilijkt de beoordeling van de exacte fysiologische veranderingen door de nitraatsuppletie en beperkt ons verder uitspraken te doen over individuele variabiliteit.

Gezien deze beperkingen is het van belang voorzichtig te zijn met het trekken van definitieve conclusies uit deze pilootstudie. Verder onderzoek met een grotere steekproef en aanvullende metingen zoals de analyse van plasmaconcentraties van nitraat en nitriet zijn noodzakelijk om de bevindingen te bevestigen en beter te begrijpen.

5.6 Praktische implicaties

De bevindingen van deze thesis zouden mogelijks implicaties kunnen hebben voor sportvoeding en training. Een bepaalde voorzichtigheid is belangrijk bij het aanbevelen van nitraatsupplementen, omdat de voordelen mogelijk beperkt zijn. De variabiliteit in respons onderstreept het belang van een geïndividualiseerde benadering, waarbij het nuttig kan zijn om atleten individueel te evalueren op mogelijke effectiviteit.

Daarnaast is het essentieel om de kosteneffectiviteit te overwegen, gezien de beperkte prestatieverbeteringen. Deze resultaten benadrukken de behoefte aan verdere studies met diverse populaties om beter te begrijpen wanneer nitraatsuppletie effectief kan zijn. Tot slot is het belangrijk dat atleten zich in de eerste plaats richten op bewezen strategieën zoals trainingsoptimalisatie, dieetverbetering en herstelmethode.

Deze implicaties helpen bij het nemen van beter geïnformeerde beslissingen over het gebruik van nitraatsupplementen en stimuleren verder onderzoek naar effectieve methoden om sportprestaties te verbeteren.

6 Conclusie

Het doel van dit onderzoek was om te bepalen of de verdeling van spiervezeltypes de prestatiebevorderende effecten van nitraatinnname bij recreatief actieve mannen en vrouwen beïnvloedt. De belangrijkste bevinding is dat nitraatsuppletie geen significant verschil ($p < 0,05$) opleverde in prestatie tijdens de 4 km tijdrit, de submaximale fietstest en de krachttesten in vergelijking met de placeboconditie. Een trend naar prestatieverbetering werd wel gezien tijdens de 4 km tijdrit, maar deze bereikte geen statistische significantie.

Hoewel eerdere studies grotere prestatieverbeteringen rapporteerden, kan het gebrek aan significantie in deze studie worden toegeschreven aan de beperkte steekproefgrootte, de samenstelling van het cohort, en mogelijke variabiliteit in de respons op nitraat. Verder staat het gebrek aan significantie tussen placebo en nitraat ons niet toe om sterke uitspraken te doen over de correlaties ervan met spiervezeltype.

Onze bevindingen wijzen op de complexiteit van de invloed van nitraatsuppletie op sportprestaties en benadrukken de noodzaak voor verdere studies met grotere en meer diverse steekproeven. Deze resultaten onderstrepen de noodzaak voor meer onderzoek om de potentiële voordelen van nitraatsuppletie beter te begrijpen en de factoren te identificeren die de effectiviteit ervan kunnen beïnvloeden.

7 Referenties

1. Act, A. (1994). Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 Public Law 103-417 103rd Congress. Public Law, 103, 417.
2. Ahlborg, B.G., J. Bergström, J. Brohult, L.-G. Ekelund, E. Hultman, and G. Maschio (1967). Human muscle glycogen content and capacity for prolonged exercise at different diets. *Försvarsmedicin* 3:85-99
3. Andersen, P. (1975). Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta physiologica scandinavica*, 95(2), 203-205.
4. Bailey, S. J., Winyard, P., Vanhatalo, A., Blackwell, J. R., DiMenna, F. J., Wilkerson, D. P., ... & Jones, A. M. (2009). Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *Journal of applied physiology*.
5. Bailey, S. J., Fulford, J., Vanhatalo, A., Winyard, P. G., Blackwell, J. R., DiMenna, F. J., ... & Jones, A. M. (2010). Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *Journal of applied physiology*, 109(1), 135-148.
6. Bailey, S. J., Varnham, R. L., DiMenna, F. J., Breese, B. C., Wylie, L. J., & Jones, A. M. (2015). Inorganic nitrate supplementation improves muscle oxygenation, O₂ uptake kinetics, and exercise tolerance at high but not low pedal rates. *Journal of applied physiology*, 118(11), 1396-1405.
7. Baguet, A., Everaert, I., De Naeyer, H., Reyngoudt, H., Stegen, S., Beeckman, S., ... & Derave, W. (2011). Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. *European journal of applied physiology*, 111, 2571-2580.
8. Baguet, A., Everaert, I., Hespel, P., Petrovic, M., Achten, E., & Derave, W. (2011). A new method for non-invasive estimation of human muscle fiber type composition. *PLoS One*, 6(7), e21956.
9. Baguet, A., Bex, T., & Derave, W. A New Method for Non-invasive Estimation of Human Muscle Fibre Type Composition in Athletics.
10. Barclay, C. J., Woledge, R. C., & Curtin, N. A. (2007). Energy turnover for Ca²⁺ cycling in skeletal muscle. *Journal of muscle research and cell motility*, 28, 259-274.
11. Behnke, B. J., McDonough, P., Padilla, D. J., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2003). Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. *The Journal of physiology*, 549(2), 597-605.
12. Bergström, J. (1975). Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 35(7), 609-616.
13. Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M., & McKenzie, H. (1994). Stomach NO synthesis [10]. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/368502a0>
14. Boorsma, R. K., Whitfield, J., & Spriet, L. L. (2014). Beetroot juice supplementation does not improve performance of elite 1500-m runners. *Med Sci Sports Exerc*, 46(12), 2326-2334.
15. Bottinelli, R. Y. C. R., & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in biophysics and molecular biology*, 73(2-4), 195-262.
16. Bond, H., Morton, L., & Braakhuis, A. J. (2012). Dietary nitrate supplementation improves rowing performance in well-trained rowers. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 22(4), 251-256.
17. Buck, C. L., Henry, T., Guelfi, K., Dawson, B., McNaughton, L. R., & Wallman, K. (2015). Effects of sodium phosphate and beetroot juice supplementation on repeated-sprint ability in females. *European journal of applied physiology*, 115, 2205-2213.
18. Callahan, M. J., Parr, E. B., Hawley, J. A., & Burke, L. M. (2017). Single and combined effects of beetroot crystals and sodium bicarbonate on 4-km cycling time trial performance. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 27(3), 271-278.
19. Carr, A. J., Hopkins, W. G., & Gore, C. J. (2011). Effects of acute alkalosis and acidosis on performance: a meta-analysis. *Sports medicine*, 41, 801-814.
20. Casado, A., Domínguez, R., Fernandes da Silva, S., & Bailey, S. J. (2021). Influence of sex and acute beetroot juice supplementation on 2 KM running performance. *Applied Sciences*, 11(3), 977.

21. Cermak, N. M., Gibala, M. J., & Van Loon, L. J. (2012). Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 22(1), 64-71
22. Cermak NM, Res P, Stinkens R, Lundberg JO, Gibala MJ, van Loon LJ. No improvement in endurance performance after a single dose of beetroot juice. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2012 Dec;22(6):470-8. doi: 10.1123/ijsnem.22.6.470. Epub 2012 Jul 4. PMID: 22805107.
23. Christensen, P. M., Nyberg, M., & Bangsbo, J. (2013). Influence of nitrate supplementation on $\dot{V}O_2$ kinetics and endurance of elite cyclists. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 23(1), e21-e31.
24. Clerc, Pascaline, Michel Rigoulet, Xavier Leverve, and Eric Fontaine. "Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39 (2007): 158-166.
25. Coggan, A. R., Broadstreet, S. R., Mikhalkova, D., Bole, I., Leibowitz, J. L., Kadkhodayan, A., ... & Peterson, L. R. (2018). Dietary nitrate-induced increases in human muscle power: high versus low responders. *Physiological reports*, 6(2), e13575.
26. Coggan, A. R., Leibowitz, J. L., Kadkhodayan, A., Thomas, D. P., Ramamurthy, S., Spearie, C. A., ... & Peterson, L. R. (2015). Effect of acute dietary nitrate intake on maximal knee extensor speed and power in healthy men and women. *Nitric Oxide*, 48, 16-21.
27. Coggan, A. R., & Peterson, L. R. (2018). Dietary nitrate enhances the contractile properties of human skeletal muscle. *Exercise and sport sciences reviews*, 46(4), 254.
28. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1498-505. doi: 10.1038/nm954. Epub 2003 Nov 2. PMID: 14595407.
29. De Castro, T. F., Manoel, F. D. A., Figueiredo, D. H., Figueiredo, D. H., & Machado, F. A. (2019). Effect of beetroot juice supplementation on 10-km performance in recreational runners. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(1), 90-94.
30. Derave, W., Ozdemir, M. S., Harris, R. C., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., ... & Achten, E. (2007). β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *Journal of applied physiology*, 103(5), 1736-1743.
31. Dhanakoti SN, Brosnan JT, Herzberg GR, Brosnan ME. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *Am J Physiol*. 1990 Sep;259(3 Pt 1):E437-42. doi: 10.1152/ajpendo.1990.259.3.E437. PMID: 1975989.
32. Domínguez R, Garnacho-Castaño MV, Cuenca E, et al. Effects of beetroot juice supplementation on a 30-s high-intensity inertial cycle ergometer test. *Nutrients*. 2017; 9:E1360. doi: 10.3390/nu9121360.
33. DR. RONALD HOFFMAN. (2021, January 27). What are the factors affecting Nitric Oxide formation? | DR. RONALD HOFFMAN. DR. RONALD HOFFMAN | <https://drhoffman.com/article/what-are-the-factors-affecting-nitric-oxide-formation/>
34. Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussmann R. Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology*. 1980;37(4):227-31. doi: 10.1159/000225441. PMID: 7443155.
35. Ferguson, S. K., Holdsworth, C. T., Wright, J. L., Fees, A. J., Allen, J. D., Jones, A. M., ... & Poole, D. C. (2015). Microvascular oxygen pressures in muscles comprised of different fiber types: Impact of dietary nitrate supplementation. *Nitric Oxide*, 48, 38-43.
36. Ferguson, S. K., Hirai, D. M., Copp, S. W., Holdsworth, C. T., Allen, J. D., Jones, A. M., ... & Poole, D. C. (2013). Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. *The Journal of physiology*, 591(2), 547-557.
37. Furchgott RF. Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999 Jul 12;38(13-14):1870-1880. Doi
38. Glaister M, Pattison JR, Muniz-Pumares D, Patterson SD, Foley P. Effects of dietary nitrate, caffeine, and their combination on 20-km cycling time trial performance. *J Strength Cond Res*. 2015 Jan;29(1):165-74. doi: 10.1519/JSC.0000000000000596. PMID: 24978834.

39. Green, L. C., Ruiz de Luzuriaga, K., Wagner, D. A., Rand, W., Istfan, N., Young, V. R., & Tannenbaum, S. R. (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7764-7768.
40. González-Soltero, R., Bailén, M., de Lucas, B., Ramírez-Goercke, M. I., Pareja-Galeano, H., & Larrosa, M. (2020). Role of oral and gut microbiota in dietary nitrate metabolism and its impact on sports performance. In *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu12123611>
41. Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide*. 2008 Dec;19(4):333-7. doi: 10.1016/j.niox.2008.08.003. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18793740.
42. Group A. (z.d.). Australian Sports Commission. https://www.ais.gov.au/nutrition/supplements/group_a#creatine
43. Group A. (n.d.). Australian Sports Commission. https://www.ais.gov.au/nutrition/supplements/group_a
44. Guest, N. S., VanDusseldorp, T. A., Nelson, M. T., Grgic, J., Schoenfeld, B. J., Jenkins, N. D., ... & Campbell, B. I. (2021). International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18(1), 1.
45. Haider, G., & Folland, J. P. (2014). Nitrate supplementation enhances the contractile properties of human skeletal muscle. *Medicine and science in sports and exercise*, 46(12), 2234-2243.
46. Harris, R. C., Tallon, M. J., Dunnett, M., Boobis, L., Coakley, J., Kim, H. J., ... & Wise, J. A. (2006). The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino acids*, 30, 279-289.
47. Henneman, Elwood, George Somjen, and David O. Carpenter. "Excitability and inhibibility of motoneurons of different sizes." *Journal of neurophysiology* 28, no. 3 (1965): 599-620.
48. Henneman, E., Somjen, G., & Carpenter, D. O. (1965). Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of neurophysiology*, 28(3), 560-580.
49. Hernández, A., Schiffer, T. A., Ivarsson, N., Cheng, A. J., Bruton, J. D., Lundberg, J. O., ... & Westerblad, H. (2012). Dietary nitrate increases tetanic $[Ca^{2+}]_i$ and contractile force in mouse fast-twitch muscle. *The Journal of physiology*, 590(15), 3575-3583.
50. Hof, A. L. (1984). EMG and muscle force: an introduction. *Human Movement Science*, 3(1-2), 119-153.
51. Hoon, M. W., Fornusek, C., Chapman, P. G., & Johnson, N. A. (2015). The effect of nitrate supplementation on muscle contraction in healthy adults. *European journal of sport science*, 15(8), 712-719.
52. Hoon, M. W., Jones, A. M., Johnson, N. A., Blackwell, J. R., Broad, E. M., Lundy, B., ... & Burke, L. M. (2014). The effect of variable doses of inorganic nitrate-rich beetroot juice on simulated 2000-m rowing performance in trained athletes. *International journal of sports physiology and performance*, 9(4), 615-620.
53. Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical nutrition*, 90(1), 1-10.
54. Ignarro LJ. Nitric Oxide: A Unique Endogenous Signaling Molecule in Vascular Biology (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999 Jul 12;38(13-14):1882-1892. doi
55. Isbell TS, Gladwin MT, Patel RP. Hemoglobin oxygen fractional saturation regulates nitrite-dependent vasodilation of aortic ring bioassays. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2565-72. doi: 10.1152/ajpheart.00759.2007. Epub 2007 Aug 31. PMID: 17766472.
56. Jensen, L., Bangsbo, J., & Hellsten, Y. (2004). Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 557(2), 571-582.
57. Jilma, B., Kastner, J., Mensik, C., Vondrovec, B., Hildebrandt, J., Wagner, O. F., & Eichler, H. G. (1996). Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life sciences*, 58(6), 469-476.
58. Jo E, Fischer M, Auslander AT, Beigarten A, Daggy B, Hansen K, Kessler L, Osmond A, Wang H, Wes R. The Effects of Multi-Day vs. Single Pre-exercise Nitrate Supplement Dosing on Simulated Cycling Time Trial Performance and Skeletal Muscle Oxygenation. *J Strength Cond Res*. 2019 Jan;33(1):217-224.

59. Johnson, M., Polgar, J., Weightman, D., & Appleton, D. (1973). Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles: an autopsy study. *Journal of the*
60. Jones, A. M. (2014). Dietary nitrate supplementation and exercise performance. *Sports medicine*, 44(Suppl 1), 35-45.
61. Jones, A. M. (2022). Dietary nitrate and exercise performance: New strings to the beetroot bow.
62. Jones, A. M., Ferguson, S. K., Bailey, S. J., Vanhatalo, A., & Poole, D. C. (2016). Fiber type-specific effects of dietary nitrate. *Exercise and sport sciences reviews*, 44(2), 53-60.
63. Jones AM, Vanhatalo A, Seals DR, Rossman MJ, Piknova B, Jonvik KL. Dietary Nitrate and Nitric Oxide Metabolism: Mouth, Circulation, Skeletal Muscle, and Exercise Performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2021 Feb 1;53(2):280-294. doi: 10.1249/MSS.0000000000002470. PMID: 32735111.
64. Jonvik, K. L., Hoogervorst, D., Peelen, H. B., De Niet, M., Verdijk, L. B., Van Loon, L. J., & van Dijk, J. W. (2021). The impact of beetroot juice supplementation on muscular endurance, maximal strength and countermovement jump performance. *European Journal of Sport Science*, 21(6), 871-878.
65. Jungersten, L., Ambring, A., Wall, B., & Wennmalm, A. (1997). Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *Journal of applied physiology*, 82(3), 760-764.
66. Kadach, S., Park, J. W., Stoyanov, Z., Black, M. I., Vanhatalo, A., Burnley, M., ... & Jones, A. M. (2023). ¹⁵N-labeled dietary nitrate supplementation increases human skeletal muscle nitrate concentration and improves muscle torque production. *Acta Physiologica*, 237(3), e13924.
67. Kadach, S., Piknova, B., Black, M. I., Park, J. W., Wylie, L. J., Stoyanov, Z., ... & Jones, A. M. (2022). Time course of human skeletal muscle nitrate and nitrite concentration changes following dietary nitrate ingestion. *Nitric Oxide*, 121, 1-10.
68. Kapil, V., Milsom, A. B., Okorie, M., Maleki-Toyserkani, S., Akram, F., Rehman, F., ... & Ahluwalia, A. (2010). Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension*, 56(2), 274-281.
69. Kenney, W. L., Wilmore, J. H., & Costill, D. L. (2012). *Physiology of Sport and Exercise (Fifth edit). Human Kinetics*
70. King DE, Mainous AG, Geesey ME. Variation in L-arginine intake follow demographics and lifestyle factors that may impact cardiovascular disease risk. *Nutr Res* 2008; 28 (1): 21-4
71. Knapik, J. J., Steelman, R. A., Hoedebecke, S. S., Austin, K. G., Farina, E. K., & Lieberman, H. R. (2016). Prevalence of dietary supplement use by athletes: systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 46, 103-123.
72. Kozhuharov, V. R., Ivanov, K., & Ivanova, S. (2022). Dietary supplements as source of unintentional doping. *BioMed Research International*, 2022.
73. Kramer, S. J., Baur, D. A., Spicer, M. T., Vukovich, M. D., & Ormsbee, M. J. (2016). The effect of six days of dietary nitrate supplementation on performance in trained CrossFit athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13, 1-7.
74. Kreider, R. B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R., ... & Lopez, H. L. (2017). International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1), 18.
75. Lansley, K. E., Winyard, P. G., Bailey, S. J., Vanhatalo, A., Wilkerson, D. P., Blackwell, J. R., ... & Jones, A. M. (2011). Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. *Med Sci Sports Exerc*, 43(6), 1125-1131.
76. Larsen, F. J., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Ekblom, B. (2007). Effects of dietary nitrate on oxygen cost. *Acta physiologica*, 191(1), 59-66.
77. Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Borniquel, S., Sahlin, K., Ekblom, B., Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2011). Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell metabolism*, 13(2), 149-159.
78. Leaf, C. D., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1989). L-arginine is a precursor for nitrate biosynthesis in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(2), 1032-1037.

79. Lee, S., Abel, M. G., Thomas, T., Symons, T. B., & Yates, J. W. (2019). Acute beetroot juice supplementation does not attenuate knee extensor exercise muscle fatigue in a healthy young population. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, 23(1), 55.
80. Li H, Cui H, Kundu TK, Alzawahra W, Zweier JL. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):17855-63. doi: 10.1074/jbc.M801785200. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18424432; PMCID: PMC2440597.
81. Lievens, E., Klass, M., Bex, T., & Derave, W. (2020). Muscle fiber typology substantially influences time to recover from high-intensity exercise. *Journal of applied physiology*, 128(3), 648-659.
82. Lievens, E., Bellinger, P., Van Vossel, K., Vancompernelle, J., Bex, T., Minahan, C., & Derave, W. (2021). Muscle typology of world-class cyclists across various disciplines and events. *Medicine and science in sports and exercise*, 53(4), 816-824.
83. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 1;37(3):395-400. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027. PMID: 15223073.
84. Lundberg, J. O., & Govoni, M. (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027>
85. Lundberg, J., Weitzberg, E. & Gladwin, M. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7, 156–167 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrd2466>
86. Maughan, R. J., Depiesse, F., & Geyer, H. (2007). The use of dietary supplements by athletes. *Journal of sports sciences*, 25(S1), S103-S113.
87. Maughan, R. J., Burke, L. M., Dvorak, J., Larson-Meyer, D. E., Peeling, P., Phillips, S. M., ... & Engebretsen, L. (2018). IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 28(2), 104-125.
88. McCubbin, A. J., Allanson, B. A., Odgers, J. N. C., Cort, M. M., Costa, R. J., Cox, G. R., ... & Burke, L. M. (2020). Sports dietitians Australia position statement: nutrition for exercise in hot environments. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 30(1), 83-98.
89. Modin A, Björne H, Herulf M, Alving K, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand*. 2001 Jan;171(1):9-16. doi: 10.1046/j.1365-201X.2001.00771.x. PMID: 11350258.
90. Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England journal of medicine*, 329(27), 2002-2012.
91. Muggeridge, D. J., Howe, C. C., Spendiff, O., Pedlar, C., James, P. E., & Easton, C. (2014). A single dose of beetroot juice enhances cycling performance in simulated altitude. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 46(1).
92. Murphy, M., Eliot, K., Heuertz, R. M., & Weiss, E. (2012). Whole beetroot consumption acutely improves running performance. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(4), 548-552.
93. Nemeth, P. M., & Lowry, O. H. (1984). Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 32(11), 1211-1216.
94. Ormerod JO, Ashrafian H, Maher AR, Arif S, Steeples V, Born GV, Egginton S, Feelisch M, Watkins H, Frenneaux MP. The role of vascular myoglobin in nitrite-mediated blood vessel relaxation. *Cardiovasc Res*. 2011 Feb 15;89(3):560-5. doi: 10.1093/cvr/cvq299. Epub 2010 Oct 1. PMID: 20889759; PMCID: PMC3028970.
95. Peacock, O., Tjønnå, A. E., James, P., Wisløff, U., Welde, B., Böhlke, N., ... & Sandbakk, O. (2012). Dietary nitrate does not enhance running performance in elite cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc*, 44(11), 2213-9.
96. Peart, D. J., Siegler, J. C., & Vince, R. V. (2012). Practical recommendations for coaches and athletes: a meta-analysis of sodium bicarbonate use for athletic performance. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 26(7), 1975-1983.
97. Piknova B, Park JW, Swanson KM, Dey S, Noguchi CT, Schechter AN. Skeletal muscle as an endogenous nitrate reservoir. *Nitric Oxide*. 2015 May 1;47:10-16. doi: 10.1016/j.niox.2015.02.145. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25727730; PMCID: PMC4439352.

98. Porcelli, S., Ramaglia, M., Bellistri, G., Pavei, G., Pugliese, L., Montorsi, M., ... & Marzorati, M. (2015). Aerobic fitness affects the exercise performance responses to nitrate supplementation. *Medicine and science in sports and exercise*, 47(8), 1643-1651.
99. Potgieter, S. (2013). Sport nutrition: A review of the latest guidelines for exercise and sport nutrition from the American College of Sport Nutrition, the International Olympic Committee and the International Society for Sports Nutrition. *South African journal of clinical nutrition*, 26(1), 6-16.
100. Qin L, Liu X, Sun Q, Fan Z, Xia D, Ding G, Ong HL, Adams D, Gahl WA, Zheng C, Qi S, Jin L, Zhang C, Gu L, He J, Deng D, Ambudkar IS, Wang S. Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 14;109(33):13434-9. doi: 10.1073/pnas.1116633109. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22778404; PMCID: PMC3421170.
101. Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res*. 2007 Jun 22;100(12):1749-54. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.152488. Epub 2007 May 10. PMID: 17495223.
102. Rimer, E. G., Peterson, L. R., Coggan, A. R., & Martin, J. C. (2016). Increase in maximal cycling power with acute dietary nitrate supplementation. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 11(6), 715-720.
103. Robinson, G. (2024). Influence of dietary nitrate supplementation on high-intensity exercise performance: association with skeletal muscle oxidative phenotype (Doctoral dissertation, Loughborough University).
104. Rokkedal-Lausch, T., Franch, J., Poulsen, M. K., Thomsen, L. P., Weitzberg, E., Kamavuako, E. N., ... & Larsen, R. G. (2019). Chronic high-dose beetroot juice supplementation improves time trial performance of well-trained cyclists in normoxia and hypoxia. *Nitric Oxide*, 85, 44-52.
105. Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH. Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CIC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol*. 1998 May;111(5):653-65. doi: 10.1085/jgp.111.5.653. PMID: 9565403; PMCID: PMC2217141.
106. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Böhme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1988 Sep 13;154(2):213-6. doi: 10.1016/0014-2999(88)90101-x. PMID: 3265919.
107. Schneider, D. A., Phillips, S. E., & Stoffolano, S. H. A. N. (1993). The simplified V-slope method of detecting the gas exchange threshold. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(10), 1180-1184.
108. Senefeld, J. W., Wiggins, C. C., Regimbal, R. J., Dominelli, P. B., Baker, S. E., & Joyner, M. J. (2020). Ergogenic effect of nitrate supplementation: A systematic review and meta-analysis. *Medicine and science in sports and exercise*, 52(10), 2250.
109. Shannon, O. M., Duckworth, L., Barlow, M. J., Woods, D., Lara, J., Siervo, M., & O'Hara, J. P. (2016). Dietary nitrate supplementation enhances high-intensity running performance in moderate normobaric hypoxia, independent of aerobic fitness. *Nitric Oxide*, 59, 63-70
110. Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res*. 2007 Mar 16;100(5):654-61. doi: 10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17293481.
111. Simoneau, J. A., & Bouchard, C. (1995). Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *The FASEB journal*, 9(11), 1091-1095.
112. Skare, O. C., Skadberg, Ø., & Wisnes, A. R. (2001). Creatine supplementation improves sprint performance in male sprinters. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 11(2), 96-102.
113. Smiljić, S., Nestorović, V., & Savić, S. (2014). Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Medicinski preglod*, 67(9-10), 345-352.
114. Sparacino-Watkins CE, Tejero J, Sun B, Gauthier MC, Thomas J, Ragireddy V, Merchant BA, Wang J, Azarov I, Basu P, Gladwin MT. Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *J Biol Chem*. 2014 Apr 11;289(15):10345-10358. doi: 10.1074/jbc.M114.555177. Epub 2014 Feb 5. PMID: 24500710; PMCID: PMC4036158.

115. Srihirun S, Park JW, Teng R, Sawaengdee W, Piknova B, Schechter AN. Nitrate uptake and metabolism in human skeletal muscle cell cultures. *Nitric Oxide*. 2020 Jan 1;94:1-8. doi: 10.1016/j.niox.2019.10.005. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31604144; PMCID: PMC7341890.
116. Stamler, J. S., & Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological reviews*, 81(1), 209-237.
117. Thompson, C., Vanhatalo, A., Jell, H., Fulford, J., Carter, J., Nyman, L., ... & Jones, A. M. (2016). Dietary nitrate supplementation improves sprint and high-intensity intermittent running performance. *Nitric Oxide*, 61, 55-61.
118. Thompson, C., Wylie, L. J., Fulford, J., Kelly, J., Black, M. I., McDonagh, S. T., ... & Jones, A. M. (2015). Dietary nitrate improves sprint performance and cognitive function during prolonged intermittent exercise. *European journal of applied physiology*, 115, 1825-1834.
119. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. Crosstalk between nitrite, myoglobin and reactive oxygen species to regulate vasodilation under hypoxia. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8):e105951. doi: 10.1371/journal.pone.0105951. PMID: 25148388; PMCID: PMC4141839.
120. Van De Walle, G. P., & Vukovich, M. D. (2018). The effect of nitrate supplementation on exercise tolerance and performance: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 32(6), 1796-1808.
121. Van Vossel, K., Hardeel, J., Van de Castele, F., Van der Stede, T., Weyns, A., Boone, J., ... & Derave, W. (2023). Can muscle typology explain the inter-individual variability in resistance training adaptations?. *The Journal of Physiology*, 601(12), 2307-2327.
122. Vikne, H., Gundersen, K., Liestøl, K., Mælen, J., & Vøllestad, N. (2012). Intermuscular relationship of human muscle fiber type proportions: slow leg muscles predict slow neck muscles. *Muscle & nerve*, 45(4), 527-535.
123. Wakui H, Komatsuda A, Itoh H, Kobayashi R, Nakamoto Y, Miura AB. Renal argininosuccinate synthetase: purification, immunohistochemical localization, and elastin-binding property. *Ren Physiol Biochem*. 1992 Jan-Feb;15(1):1-9. doi: 10.1159/000173435. PMID: 1372742.
124. Wang J, Krizowski S, Fischer-Schrader K, Niks D, Tejero J, Sparacino-Watkins C, Wang L, Ragireddy V, Frizzell S, Kelley EE, Zhang Y, Basu P, Hille R, Schwarz G, Gladwin MT. Sulfite Oxidase Catalyzes Single-Electron Transfer at Molybdenum Domain to Reduce Nitrite to Nitric Oxide. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Aug 1;23(4):283-94. doi: 10.1089/ars.2013.5397. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25314640; PMCID: PMC4523048.
125. Webb, A. J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S., ... & Ahluwalia, A. (2008). Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*, 51(3), 784-790.
126. Wickham, K. A., & Spriet, L. L. Food for Thought: Physiological Considerations for Nutritional Ergogenic Efficacy. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*.
127. Wickham, K. A., & Spriet, L. L. (2019). No longer beeting around the bush: a review of potential sex differences with dietary nitrate supplementation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(9), 915-924.
128. Wickham, K. A., McCarthy, D. G., Pereira, J. M., Cervone, D. T., Verdijk, L. B., van Loon, L. J., ... & Spriet, L. L. (2019). No effect of beetroot juice supplementation on exercise economy and performance in recreationally active females despite increased torque production. *Physiological reports*, 7(2), e13982.
129. Whitfield, J., Gamu, D., Heigenhauser, G. J., Van Loon, L. J., Spriet, L. L., Tupling, A. R., & Holloway, G. P. (2017). Beetroot juice increases human muscle force without changing Ca²⁺-handling proteins. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 49(10), 2016-2024.
130. Wilkerson, D. P., Hayward, G. M., Bailey, S. J., Vanhatalo, A., Blackwell, J. R., & Jones, A. M. (2012). Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. *European journal of applied physiology*, 112(12), 4127-4134
131. Wilson, J. M., Loenneke, J. P., Jo, E., Wilson, G. J., Zourdos, M. C., & Kim, J. S. (2012). The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 26(6), 1724-1729.

132. Wylie, L. J., Bailey, S. J., Kelly, J., Blackwell, J. R., Vanhatalo, A., & Jones, A. M. (2016). Influence of beetroot juice supplementation on intermittent exercise performance. *European journal of applied physiology*, 116, 415-425.
133. Wylie, L. J., Kelly, J., Bailey, S. J., Blackwell, J. R., Skiba, P. F., Winyard, P. G., ... & Jones, A. M. (2013). Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. *Journal of applied physiology*, 115(3), 325-336.
134. Wickham, K. A., McCarthy, D. G., Pereira, J. M., Cervone, D. T., Verdijk, L. B., van Loon, L. J., ... & Spriet, L. L. (2019). No effect of beetroot juice supplementation on exercise economy and performance in recreationally active females despite increased torque production. *Physiological reports*, 7(2), e13982.