

Syrebrist, metabolism och blodflöde

– mekanismer bakom kärlnybildning vid träning

Regelbunden fysisk aktivitet påverkar de flesta organsystemen i kroppen på något sätt. Exempelvis blir hjärtat större och slår effektivare slag, blodvolymen ökar, mängden fettväv minskar och skelettet stärks. I den vävnad som utför själva arbetet, skelettmuskulaturen, lagras mer glykogen (bränsle). Det bildas fler mitokondrier och fler kapillärer. Dessa förändringar har var för sig betydelse för prestationsförbättringen vid uthållighetsträning, men har sannolikt även en hälsobefrämjande effekt. Ett ökat antal kapillärer leder, via ett flertal olika mekanismer, till en ökad kapacitet för utbyte av syre, energisubstrat som socker och fett, och slaggprodukter mellan blodbanan och skelettmuskulaturen.



Från vänster: Carl-Johan Sundberg², Eva Jansson¹, Anna Strömberg¹ och Thomas Gustafsson¹. På bilden saknas Helena Rundqvist² och Erik Rullman¹.

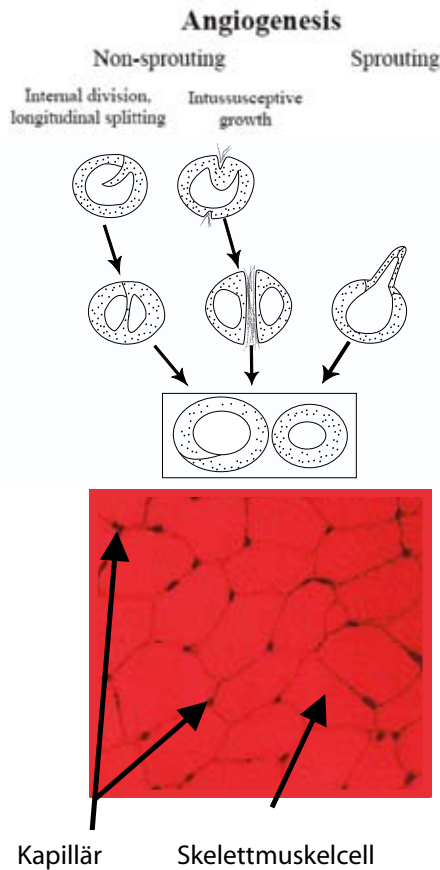
1. Institutionen för laboratoriemedicin, avdelning klinisk fysiologi, Karolinska Institutet, Stockholm.

2. Institutionen för fysiologi och farmakologi, Karolinska Institutet, Stockholm.

Träning och kärlnybildning

Vetskapen om att kärlnybildning är av stor betydelse för tumörtillväxt har lett till en omfattande forskning rörande reglerande stimuli, mekanismer och faktorer bakom denna process (1). I dessa studier har vävnadens syretillgång och ett ökat blodflöde lyfts fram som tänkbara stimuli bakom kärlnybildning. Kärlnybildning kan indelas i olika typer beroende på storleken av det kärl som tillväxer/nybildas. Nybildning av större kärl kallas arteriogenes och bildandet av kapillärer kallas angiogenes (2). Oavsett bakomliggande mekanism regleras slutligen all kärlnybildning via en balans mellan tillväxtstimulerande och hämmande faktorer (2).

Vid uthållighetsträning sker framförallt angiogenes även om det i djurstudier och enstaka humanstudier indikerats att även arteriogenes (nybildning av artärer) kan förekomma i skelettmuskulaturen. Den första beskrivningen av kärlnybildning i skelettmuskulaturen i samband med muskelarbete hos djur gjordes av Vanotti och Magiday 1934, samt sedermera av Petrén 1937 (3, 4). Hos människa beskrevs likartade effekter av uthållighetsarbete av Andersen 1975 och mer i detalj av Andersen och Henriksson 1977 (5, 6). I djurstudier under 1980- och 90-talet visades att två olika typer av kapillärnybildning kan ske i skelettmuskulaturen; "non-sprouting" och "sprouting" angiogenes (7) (fig 1). Non-sprouting angiogenes initieras via faktorer på kärlets insida, såsom



Figur 1. A) Två principiellt olika mekanismer bakom kapillärybildning har beskrivits i skelettmuskulaturen, non-sprouting och sprouting angiogenesis B) Ett vävnadssnitt infärgat för kapillärer. Dessa ses som mörkfärgade "prickar" och är markerade i figuren

ökat blodflöde. Sprouting angiogenesis däremot stimuleras via faktorer på kärlets utsida, såsom nedsatt omgivande syrgasnivå och/eller ökad muskelspänning (7).

Kärltillväxtfaktorer vid uthållighetsarbete

Sedan mitten av 1990-talet har ett flertal studier både på djur och människa utförts, där syftet varit att kartlägga relevanta kärltillväxtfaktorer samt via vilka mekanismer som kärlnybildning stimuleras vid muskelkontraktion och/eller uthållighetsarbete. Morrow och medarbetare visade 1990 i en djurstudie att två kärltillväxtstimulerande faktorer, Fibroblast Growth Factor 1 & 2, ökar vid muskelkontraktion (8). Senare studier på människa har däremot inte kunnat visa att det sker en ökning av dessa faktorer sker vid uthållighetsarbete (9, 10). Den för närvarande bäst karakteriserade kärltillväxtfaktorn är Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) (11). Denna tillväxtfaktor

stimulerar endotelcellerna i kärlets väggar till att dela sig och vandra mot områden som är i behov av ett ökat blodtillflöde (2), exempelvis en "tränande" skelettmuskel.

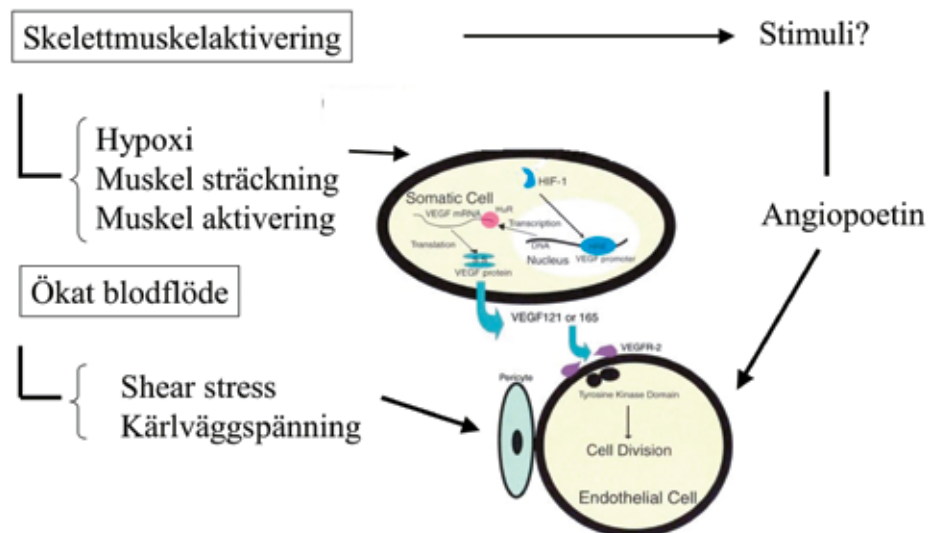
Vi och andra har visat att VEGF-A ökar i skelettmuskeln på mRNA-nivå vid enstaka träningspass (9,10, 12,13), vilket leder till successivt ökade proteinnivåer vid upprepade träningspass (14). Betydelsen av VEGF-A för kärltillväxt i skelettmuskulaturen vid fysisk träning stöds av observationer från skelettmuskel hos djur där det visats att VEGF-A ökar parallellt med kapillärtillväxt, samt att blockering av VEGF-systemet leder till utebliven kärlnybildning (15,16). VEGF-A samverkar med ett flertal andra, kända och troligtvis även okända, tillväxtfaktorer för att på ett korrekt och optimalt sätt stimulera kärlnybildning. Angiopoietin 1 & 2 (Ang 1 & 2) är två faktorer som modifierar den biologiska effekten av VEGF-A (17). Höga nivåer av Ang 1 stabiliserar endotelcellerna och gör dem mindre känsliga för VEGF-A, i motsats till höga nivåer av Ang 2 som destabiliserar endotelcellerna och därmed ökar effekten av VEGF-A (17). Vi har observerat att Ang 2 ökar successivt vid upprepade träningspass med succesivt **ökad** belastning och därmed att kvoten mellan Ang 2 och Ang 1 blir större samtidigt som VEGF-A nivåerna är förhöjda (9). Liknande resultat har rapporterats från djurstudier (18). Detta indikerar att VEGF-A driver angiogenesprocessen, medan Ang 1 & 2 modifierar effekterna av VEGF-A i skelettmuskulaturen vid träning (fig 2). Vid längre tids arbete på **konstant** belastning har vi observerat att Ang 1 ökar i relation till Ang 2, och vid dessa

betingelser är även VEGF-A nivåerna normaliserade (19). Vår tolkning är att detta är en mognad/etableringsprocess av kapillärsystemet "i slutet" av skelettmuskulaturens anpassning till en högre träningsnivå.

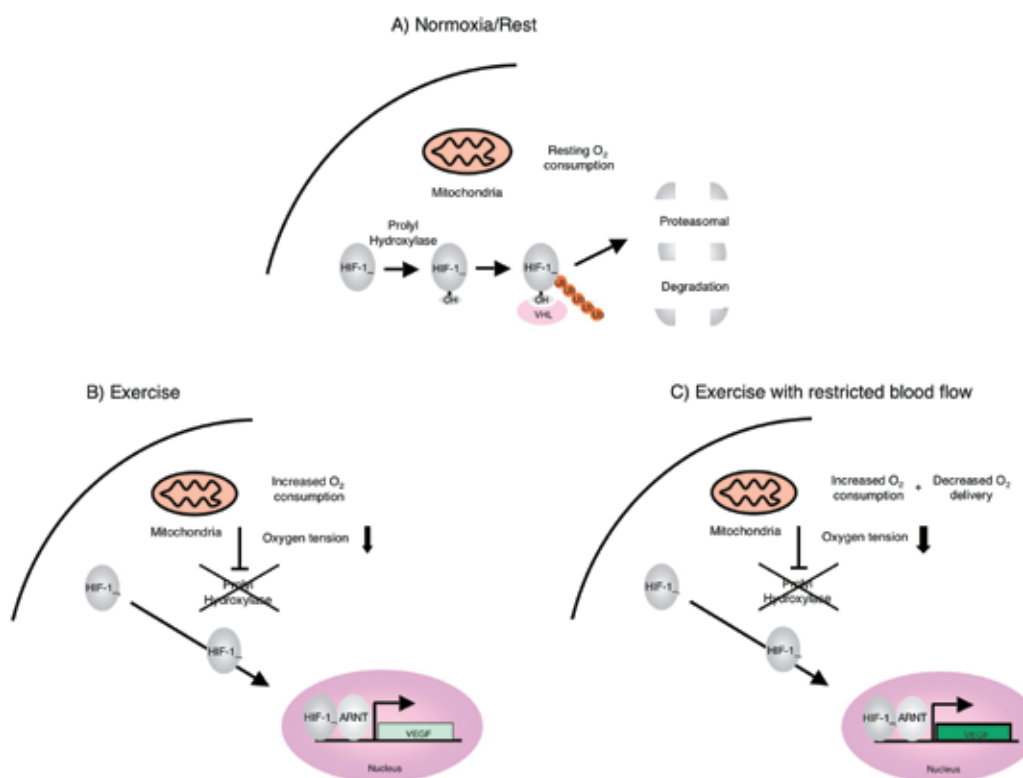
Syrgaskänslighet i vävnaden

Även om VEGF-A stimuleras av ett flertal olika faktorer, är en låg syrgasnivå i vävnaden det stimulus som är bäst beskrivet (11). Våra studier visar att det sker en större ökning av VEGF-A vid minskat blodflöde till den arbetande muskeln (9, 12, 13). Dessa observationer indikerar att den sänkning av syrgasnivån i muskelcellen som sker i samband med muskelkontraktion kan vara en viktig stimulus bakom ökad kapillärisering vid träning. Vi har tidigare beskrivit effekterna av såväl enstaka som upprepade arbetspass under lokal syrebrist (ischemi), åstadkommen genom att begränsa blodflödet till den arbetande muskulaturen. Resultaten visade tydligt att nedsatt cirkulation till arbetande muskulatur förstärker anpassningen till uthållighetsträning (20).

Flera av de faktorer som stimuleras vid lokal hypoxi – till exempel VEGF-A – regleras på ett likartat sätt via transkriptionsfaktorn Hypoxia Inducible Factor (Hif-1)(21). Hif-1 påverkar bildningen av nära 40 olika proteiner och har föreslagits vara en tänkbar nyckelfaktor i upprätthållandet av cellens energi- och syrebalans via reglering av till exempel kapillärisering och metabola enzymer (21). Vid arbetsintensiteter som överstiger 50 procent av VO₂-max sjunker syrenivåerna i den arbetande muskeln till nivåer som *in vitro* har visat sig aktivera Hif-1 (22). Vi har nyligen visat att vid ett enstaka arbetspass ansamlas Hif-1 i



Figur 2. Schematisk bild på möjliga bakomliggande stimuli och tillväxtfaktorer



Figur 3. Figuren visar schematiskt hur Hif-1 stabiliseras och aktiverar uttrycket av målgener i skelettmuskulaturen i samband med arbete.

skelettmuskulaturen och lokaliserar till kärnan där det binder till målgenernas DNA både i human muskel och i mus (15). Detta stöder vår hypotes att Hif-1 stabiliseras och aktiveras i samband med arbete och möjliggör en eventuell roll för Hif-1 i anpassningen till uthållighetsträning (fig 3). Ett genomgående fynd är dock att VEGF-A ökar mer om blodflödet till arbetande muskulatur är reducerat (9, 12, 13), till skillnad från Hif-1 som aktiveras i lika grad på en given belastning oavsett reducerat blodflöde (23). Detta kan tolkas som att även vid relativt låg arbetsbelastning är syrgasnivån i muskeln tillräckligt låg för att aktivera Hif-1, och samtidigt att andra faktorer är av betydelse för arbetsinducerad stimulering av VEGF-A.

Betydelsen av metabola förändringar för kärlnybildning

Metabola (ämnesomsättnings-) förändringar i musklerna uppkommer vid fysiskt arbete. Detta har förelagits vara ett alternativt och/eller additivt stimulus för kärlnybildning, då en förändring i den metabola balansen accentueras vid arbete med reducerat blodflöde samtidigt som att en ökad kärlnybildning sker (20). Detta stöds av att vi tidigare även visat att en statistisk relation föreligger mellan arbetsinducerat uttryck av VEGF-A i

skelettmuskulaturen och laktatfrisättning från arbetande muskulatur (9). AMP-aktiverat proteinkinase (AMPK) är ett enzym som aktiveras när energikonsumtionen överstiger energiproduktionen via förändrad balans mellan ATP:ADP:AMP (24). I en arbetande skelettmuskulatur aktiveras AMPK sannolikt till en nivå som är relaterat till den arbetsinducerade metabola stressen (25). Då AMPK leder till ökat uttryck av VEGF-A är detta en möjlig signaleringsväg för hur metabola förändringar i skelettmuskulaturen skulle kunna reglera kärntillväxt (26).

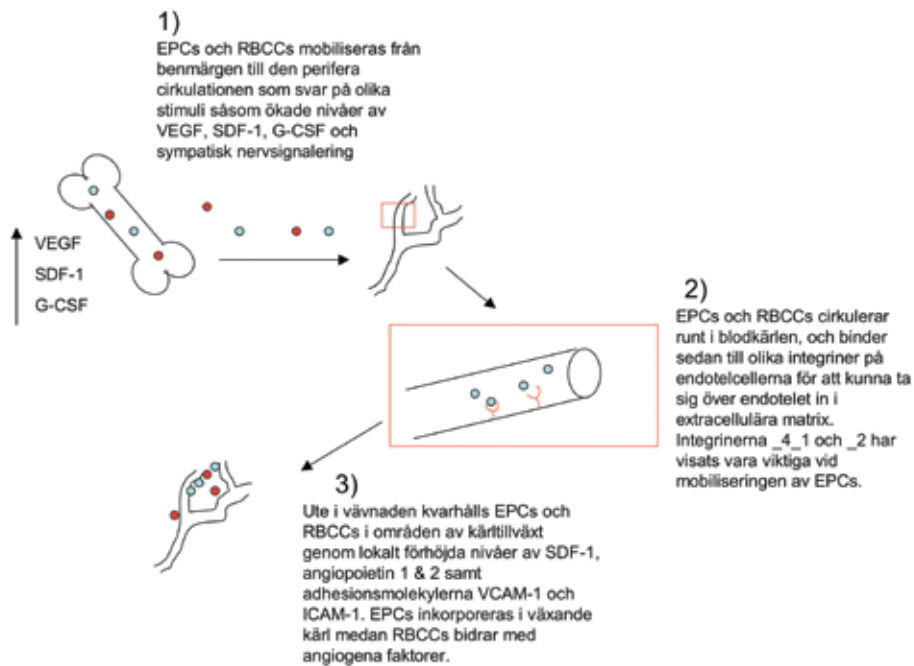
Det finns andra hypoteser om vad som reglerar kärlnybildning i arbetande muskulatur. Vål dokumenterat är att ett ökat blodflöde stimulerar till kärntillväxt (27). Ett ökat blodflöde ger upphov till friktionsstress och ökad väggspänning på och i kärnväggen, vilket kan stimulera till kärlnybildning av typen "non-sprouting" angiogenes (11, 28). Oavsett vilken typ av stimuli; ökat blodflöde eller minskad syrenivå i muskelcellen, ökar VEGF-A i skelettmuskulaturen (28). I djurmodeller har man visat att matrix metalloproteaser (MMP) har avgörande betydelse för "sprouting" angiogenes (28). Detta beror sannolikt på deras förmåga att bryta ned cellulära barriärer, vilket är helt nödvändigt för att kärl ska kunna växa in i vävnaden. Vi har nyligen visat

att MMP aktiveras i human skelettmuskulatur vid muskulärt uthållighetsarbete, vilket stödjer att sprouting angiogenes är involverad vid träning men detta utesluter inte att "non-sprouting" angiogenes samtidigt förekommer, såsom tidigare beskrivits hos tränande djur (29).

Med laserdissektionsteknik har det blivit möjligt att "skära ut" specifika celltyper i skelettmuskeln, såsom endotelceller, skelettmuskelfibrer, inflammatoriska celler och/eller fibroblaster, och analysera dessa var för sig (30). På så sätt kan man få en bättre uppfattning om vilka celler som är involverade i bildandet och frisättandet av ovanstående kärntillväxtpåverkande faktorer i samband med uthållighetsarbete. Detta kan på ett avsevärt sätt bidra till att förstå vilka stimuli som är av störst betydelse för angiogenes vid uthållighetsarbete.

Nya mekanismer bakom kärlnybildning - vasculogenes

Tidigare trodde man att all kapillärtillväxt i vuxna var synonym med tillväxt från befintliga kärl, angiogenes, via stimulering av ovan beskrivna kärntillväxtfaktorer. De senaste åren har man dock visat att kärlnybildning kan ske genom vasculogenes, en process som skiljer sig från angiogenes (31, 32). Vid vasculogenes differentierar omogna benmärgsderiverade progenitorceller till endotelceller, medan angiogenes är en



Figur 4. Schematisk bild på hur EPC skulle kunna regleras och aktiveras till endotelceller i samband med arbetet

process där moget endotel prolifererar och bildar nya blodkärl. Det är dock oklart i vilken uträkning vasculogenes har betydelse för kapillärtillväxt hos den friska människan inklusive den kapillärnybildning som sker i skelettmuskulaturen vid uthållighetsträning.

Stamceller är odifferentierade celler som har förmåga att förnya sig själva, det vill säga ge upphov till nya stamceller, samt utvecklas och bilda olika celltyper. I benmärgen finns den hematopoetiska stamcellen (HSC), som bildar alla blodceller i kroppen. Benmärgsceller har även förmågan att regenerera vävnad i olika organ, och för 10 år sedan gjordes upptäckten att progenitorceller, så kallade EPCs, i benmärgen kan differentiera ut till endotelceller (33). De olika cellerna i blodet identifieras via proteiner på cellernas yta. Dessa proteiner kallas för ytantigen eller ytmarkörer. Varje celltyp har en specifik storlek och uppsättning av ytmarkörer (34).

Indirekt stöd för att EPCs är delaktiga i den kärltillväxt som induceras av arbete är att antalet EPCs ökar i blod som svar på ökad fysisk aktivitet. Flera studier de senaste åren har demonstrerat hur måttligt till intensivt arbete ökar antalet EPCs i blod hos både friska och personer med hjärtsjukdom (35, 36). Det är dock inte helt klart exakt vilka ytmarkörer som kännetecknar EPCs. Ursprungligen användes stamcellsmarkörerna CD34 och CD133, samt VEGF-receptor-2 för att

identifiera EPCs (34). Senare publikationer har visat att även CD14-positiva celler ur monocytpopulationen har förmåga att bilda endotel. Dock uppvisar enbart de CD14-positiva celler som samtidigt uttrycker VEGFR2 en EPC-karaktär (37). EPCs kan alltså deriveras från olika populationer av celler, men gemensamt för dem är uttrycket av VEGF-receptor-2. Risken med att titta på för snävt definierade cellpopulationer är att man missar celler som har en vasculogen potential. Det är viktigt att ta reda på vilka fenotyper av celler i blodet som kan mogna ut till endotelceller för att bättre kunna studera deras vasculogena kapacitet samt om deras antal förändras efter fysisk aktivitet. Vi har opublicerade data från en pilotstudie som visar att VEGFR2-populationen ökar kraftigt i blod efter arbete, medan vi inte kunde se någon skillnad hos CD34 och CD133 populationerna. Sammantaget tyder våra och andras data på att VEGF är en central aktör i rekryteringen av celler med vasculogen potential, samt att uttrycket av VEGFR2 indikerar förmåga att differentiera till endotel. Ett sätt att ytterligare karaktärisera VEGFR2-positiva celler är att sortera ut dem från perifert blod med hjälp av flödescytometri och sedan karaktärisera dem ytterligare genom att bestämma deras andra ytprotein. Huruvida dessa celler har en endotelcellskaraktär måste dock samtidigt studeras *in vitro* med olika metoder, exempelvis genom att mäta

deras bindningsförmåga till olika proteiner eller deras förmåga att bygga kapillärnätverk i odlingsmedium.

En annan viktig fråga är vilka signaler som är av betydelse för en eventuell rekrytering av EPCs vid träning. En mekanism som föreslagits vara av betydelse för rekrytering av EPCs från benmärgen till cirkulationen är ökad sympatikusaktivitet (38), det vill säga en ökad mängd katekolaminer i cirkulationen, vilket sker i samband med arbete (39). En annan mekanism är att cirkulerande kärltillväxtfaktorer, såsom VEGF-A, rekryterar EPCs från benmärgen. Sjunkande plasmanivåer av VEGF-A noteras vid uthållighetsarbete (14, 35) och en möjlig förklaring till detta kan vara att det binds upp av VEGF-receptorer i benmärgen och därigenom rekryterar/mobiliserar EPCs till cirkulationen (40, 41) (fig 4). När de omogna EPCs nått sin destination i vävnaden är det förmodligen en specifik balans av olika cytokiner och tillväxtfaktorer i miljön som sedan får dem att differentiera till endotel (42). Det är dock oklart exakt vilka dessa faktorer är, men angiopoietin och VEGF har i olika studier visats kunna vara av betydelse (42). Detta innebär sannolikt att uthållighetsträning även skapar en positiv miljö för utmognad av EPCs. Figur 4 sammanfattar möjliga arbetsinducerade mekanismer ledande till en ökad kärlnybildning via rekrytering av omogna benmärgsderiverade progenitorceller och differentiering av dessa till endotelceller i skelettmuskulaturen.

Idrottsrelevans

Det är av stor idrottslig relevans att förstå de mekanismer som styr den muskulära anpassning som sker vid uthållighetsträning. Detta kan ge nya infallsvinklar om hur man på bästa sätt kan optimera träningsprotokollet för att uppnå den högsta kapaciteten för aerob metabolism i arbetande muskel. En bättre kunskap om dessa mekanismer kan också öka förståelsen för varför vissa individer förbättrar sin arbetsförmåga mer vid uthållighetsträning än andra samt hur en individs genuppsättning påverkar dess prestationsförmåga och träningsbarhet. Detta kan även öka förståelsen för bakomliggande problematik när träning inte ger avsedd effekt såsom vid överträning. Exempelvis kan rekryteringen av EPCs vara nedsatt vid överträning då nedsatt immunfunktion har visats påverka rekrytering av benmärgsderiverade stamceller, exempelvis EPC.

Fullständig referenslista med 42 artiklar kan rekvireras hos CIF redaktion artur.forsberg@gih.se