

Ergogenic effects of dietary nitrate

Citation for published version (APA):

Nyakayiru, J. D. O. A. (2019). *Ergogenic effects of dietary nitrate*. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20190213jn>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190213jn](https://doi.org/10.26481/dis.20190213jn)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Dietary nitrate is a nutritional supplement that has received a lot of attention in recent years following groundbreaking observations of reduced oxygen cost during submaximal cycling exercise after nitrate ingestion. Many studies have since explored the potential of dietary nitrate to serve as an ergogenic aid, but there is still limited insight in the optimal supplementation strategy. Furthermore, the endogenous conversion of dietary nitrate into nitrite and further into nitric oxide (NO) is believed to be the basic mechanism underlying the beneficial effects of dietary nitrate. However, it is currently still unclear where and/or under what conditions this *nitrate-nitrite-NO pathway* is mostly activated. The studies described in this thesis assessed various factors that may modulate the effects of dietary nitrate supplementation, with the aim to provide further insight into the physiological, pharmacodynamic, and ergogenic properties of dietary nitrate.

Whereas previous work has already established that ~520 mg of dietary nitrate is required to improve exercise performance in recreationally active subjects, one of the remaining questions is whether the duration of dietary nitrate supplementation might influence its effectiveness. In **chapter 2**, we therefore compared the effect of acute versus 6-day dietary nitrate ingestion on submaximal oxygen consumption and 10-km time trial performance in highly trained endurance athletes. We assessed this in trained endurance athletes as the majority of (acute) nitrate supplementation protocols had failed to elicit performance benefits in these athletes. The cross-over design allowed us to determine whether extension of an already high dietary nitrate supplementation strategy (800 mg) from 1 day to 6 days would result in (greater) performance improvements when compared to a placebo. Despite significant increases in plasma nitrate and nitrite concentrations, no reduction was observed in the oxygen cost of submaximal cycling exercise in the trained athletes following either an acute or a 6-day dietary nitrate supplementation protocol. Furthermore, no improvements were observed in 10 km time-trial performance with both supplementation protocols. Based on these findings and similar observations by others, it became apparent that dietary nitrate is probably less effective in improving exercise performance in highly trained endurance athletes.

In **chapter 3**, we assessed the effect of ingesting 800 mg of dietary nitrate in the form of concentrated beetroot juice, sodium nitrate, a rocket salad beverage, or a spinach beverage. We determined whether the ingestion of these sources resulted in different changes in plasma nitrate and nitrite concentrations, and whether the hemodynamic effects differed between sources. We observed similar (~9 fold) increases in plasma nitrate concentrations between the four sources, as well as a similar decrease in diastolic blood pressure (2-8 mmHg) following ingestion of each source. In contrast, a more

pronounced increase in plasma nitrite concentrations was observed following the spinach and rocket salad beverages when compared with the nitrate salt. Most importantly, a decrease in systolic blood pressure was only observed following ingestion of the three vegetable-based sources. We therefore conclude that the ingestion of vegetable-based dietary nitrate sources may be preferred to elicit both pharmacokinetic and pharmacodynamic effects.

In view of the lack of effects in trained endurance athletes as well as the potential preference for vegetable-based nitrate sources, we used beetroot juice in the study described in **chapter 4** to determine whether ingestion of dietary nitrate for multiple days could improve high-intensity intermittent-type exercise performance. Using the Yo-Yo intermittent recovery test, we showed that 6 days of concentrated beetroot juice ingestion increases high-intensity intermittent-type running performance in trained soccer players. This finding is completely in line with the emerging belief that dietary nitrate might primarily exert beneficial effects on type II muscle fibers, which are heavily recruited during high-intensity type exercise.

As the exact mechanism behind the ergogenic effects of dietary nitrate is still unknown, there is ample room to speculate on factors that may be related to the observed effects. For example, observations in animals suggest that nitrate may be stored and locally utilized in skeletal muscle tissue. However, insight in the pharmacokinetics of dietary nitrate in humans has been limited to measuring concentrations in plasma and saliva. In **chapter 5**, we therefore determined the basal nitrate content in human skeletal muscle tissue and compared that to what was present in plasma. We showed that in the basal state, nitrate concentrations are substantially greater in skeletal muscle tissue when compared to plasma concentrations, suggesting a nitrate buffering function of skeletal muscle. In addition, ingestion of a single bolus of dietary nitrate increased both plasma and skeletal muscle nitrate concentrations in the hours following ingestion. The nitrate content of skeletal muscle tissue therefore seems susceptible to dietary nitrate ingestion, and this storage may allow nitrate to serve as a local NO precursor.

A growing number of human and animal studies indicate that dietary nitrate may be most effective during low oxygen and acidic conditions. In **chapter 6**, we assessed the effect of blood flow restriction combined with and without low-load resistance-type exercise on myofibrillar protein synthesis rates. We observed that myofibrillar protein synthesis rates and anabolic signaling increased with blood flow restriction, but only when combined with low-load resistance type exercise. These findings suggest that a transient decrease in

blood flow and oxygen supply may increase the anabolic effect of an otherwise ineffective exercise stimulus. Although we have not yet assessed this, the next step would be to determine whether the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway might play a role in inducing this anabolic effect.

In the last chapter, we focus on discussing the implications of nitrate being stored in human skeletal muscle tissue. We address how the different factors assessed in the current thesis (i.e. duration of supplementation, the nitrate source, the type of exercise) as well as other factors described in literature (such as dose, muscle fiber type composition, training status, age) could be associated with the skeletal muscle nitrate content. Based on this thesis, we suggest that the ability to increase both skeletal muscle nitrate content and its local utilization likely represent important factors modulating the effectiveness of dietary nitrate supplementation when aiming to improve exercise performance. So far, it appears that most benefits are expected with high-intensity type exercise rather than endurance type activities, and with vegetable-based nitrate sources rather than nitrate salts. Yet, future work will need to further unravel how intramuscular nitrate storage is affected by the nitrate source, the dose, and the duration of supplementation, as well as by the type of exercise performed.

Samenvatting

In de afgelopen jaren zijn steeds meer sporters het voedingssupplement nitraat gaan gebruiken omdat het prestatiebevorderend zou kunnen werken. Dit gebeurde nadat ongeveer 10 jaar geleden verschillende onderzoeken lieten zien dat de inname van een nitraatsupplement de hoeveelheid zuurstof die nodig is tijdens inspanning kan verlagen. Onderzoek liet ook zien dat nitraatinname de prestatie tijdens een tijdrit op de fiets kan verbeteren. Het doel van de onderzoeken die beschreven staan in dit proefschrift was om verder inzicht te krijgen in het gebruik van nitraatsupplementen om sportprestaties te verbeteren. De bevindingen uit dit proefschrift zijn hier kort samengevat.

Hoewel er nog veel onbekend is over hoe nitraatsupplementen de prestatie kunnen verbeteren, is het algemeen geaccepteerd dat stikstofmonoxide (afgekort als 'NO') hier een belangrijke rol in speelt. Nitraat wordt namelijk na inname eerst in het lichaam omgezet in nitriet (wat o.a. in de mond gebeurt) en daarna in stikstofmonoxide. Stikstofmonoxide is een stof die betrokken is bij veel fysiologische processen in het menselijk lichaam, waaronder het verwijden van de bloedvaten en het faciliteren van spiercontracties. Omdat nitraat ervoor kan zorgen dat er meer stikstofmonoxide in het lichaam beschikbaar komt, hebben veel studies in de afgelopen jaren onderzocht hoe nitraat het beste gebruikt kan worden om de sportprestatie te verbeteren.

Een van de eerste studies die inzicht gaf in hoe nitraatinname geoptimaliseerd zou kunnen worden, liet zien dat er ongeveer 500 mg nitraat nodig is om de sportprestatie bij recreatieve sporters te verbeteren. In navolging hierop hebben wij in **hoofdstuk 2** onderzocht wat het effect is van een 1- of 6-daagse inname van nitraat op de zuurstof consumptie tijdens inspanning, en op de sportprestatie met behulp van een 10-km tijdrit op de fiets. Dit hebben we onderzocht bij goedgetrainde duuratleten omdat veel studies bij deze atleten geen effect van nitraatinname lieten zien, terwijl dit bij recreatieve sporters wel werd gezien. We wilden onderzoeken of dit wellicht aan de duur van nitraatinname lag. Hoewel we in onze studie een duidelijke stijging in bloedconcentraties van nitraat en nitriet zagen door inname van nitraat, bleek dit geen effect te hebben op de zuurstof consumptie tijdens inspanning en ook niet op de prestatie tijdens de 10-km tijdrit. Tezamen met soortgelijke bevindingen door andere onderzoekers concluderen we dat nitraatinname geen effect heeft op de sportprestatie van goed getrainde *duuratleten*.

Naast eventuele verschillen door de duur van nitraatinname (1 of 6 dagen in hoofdstuk 2) wilden we ook graag weten of de keuze van de nitraatbron van belang kon zijn voor de effectiviteit. Om die reden hebben we in **hoofdstuk 3** vastgesteld wat het effect is van nitraatinname in de vorm van rode bietensap, nitraatzout, een spinazie drankje en een

rucola drankje. Naast het effect op de concentraties van nitraat en nitriet in het bloed, hebben we ook gekeken naar het effect op de bloeddruk. Dit onderzoek liet zien dat bij een vergelijkbare hoeveelheid nitraat de inname van verschillende nitraatbronnen resulteert in een vergelijkbare toename van nitraat concentraties in het bloed. De meest opmerkelijke bevinding was echter dat de bloeddruk (bovendruk) alleen daalde na inname van de nitraatrijke groente bronnen, en dus niet na inname van het nitraatzout. We concluderen op basis van deze resultaten dat de inname van plantaardige nitraatbronnen waarschijnlijk effectiever zal zijn dan wanneer een nitraatzout gebruikt wordt.

Met deze kennis hebben we in **hoofdstuk 4** vastgesteld wat het effect is van rode bietensap op de sportprestatie van goedgebouwde voetballers. We onderzochten dit met behulp van de Yo-Yo test, wat een aangepaste 'shuttle-run test' is (ook wel bekend als de 'piepjes test'). Dit onderzoek speelde in op het feit dat in toenemende mate wordt gedacht dat nitraat vooral effect heeft op (kortdurende) explosieve inspanning van zeer hoge intensiteit, in plaats van laag intensiteit *duur*inspanning. Ons onderzoek liet inderdaad zien dat 6 dagen rode bietensap inname leidt tot een verbetering van de sprintcapaciteit bij goedgebouwde voetballers zoals gemeten met de Yo-Yo test. Deze bevinding suggereert dat nitraat een effect kan hebben op de sportprestatie wanneer de spieren een lage zuurstof beschikbaarheid hebben, zoals bij hoge intensiteit en explosieve inspanning. De mogelijke relatie die dit effect zou kunnen hebben met de zuurstofconcentratie in de spier is interessant, omdat onderzoeken in muizen en ratten eerder hadden aangetoond dat nitraat ook in de spier opgeslagen kan worden. Bij mensen werd alleen naar de concentraties nitraat in het bloed gekeken. De onderzoeken in muizen en ratten concludeerden echter dat nitraat wellicht in de spier wordt opgeslagen om stikstofmonoxide te produceren op momenten dat de zuurstofconcentratie laag is. Omdat vergelijkbare gegevens bij mensen nog niet beschikbaar waren besloten wij om dit in **hoofdstuk 5** te onderzoeken. In lijn met de bevindingen in muizen en ratten, zagen we bij mensen dat de spier hogere concentraties nitraat bevat dan de nitraat concentratie in het bloed. Bovendien bleek dat de inname van nitraat ertoe leidt dat niet alleen de nitraat concentratie in het bloed, maar ook de concentratie in de spier toeneemt. Hoewel het nog onduidelijk is of de omzetting van nitraat naar stikstofmonoxide lokaal in de spier mogelijk is en hoe dit dan precies zou werken, is het wel denkbaar dat dit bij kan dragen aan alle gunstige effecten die met nitraatinname worden verkregen.

In het laatste onderzoek, dat beschreven staat in **hoofdstuk 6**, hebben we gemeten wat de kortdurende restrictie van bloed naar de spier doet met de aanmaak van nieuw spierweefsel. Eerder onderzoek had al aangetoond dat het kortdurend verlagen van de

doorbloeding (en daarmee de beschikbaarheid van zuurstof) een gunstig effect kan hebben op de groei en behoud van spiermassa. Omdat voor de omzetting van nitraat naar stikstofmonoxide een omgeving met weinig zuurstof binnen de spier bevorderlijk lijkt, wilden we vaststellen of dit wellicht een verband had met de gunstige effecten op spiermassa. We wilden echter eerst bevestigen dat een kortdurende restrictie van bloed naar de spier bij gezonde jonge mannen voor een toename in spieraanmaak zorgt. Dit hebben we onderzocht door één groep mannen de restrictie van bloedtoevoer met inspanning te laten combineren, terwijl een andere groep geen inspanning uitvoerde en alleen restrictie van de bloedtoevoer als interventie kreeg. Ons onderzoek liet zien dat de aanmaak van meer spierweefsel alleen gestimuleerd wordt wanneer de kortdurende restrictie van bloedtoevoer gecombineerd wordt met inspanning. Of dit ook gekoppeld is aan de omzetting van nitraat naar stikstofmonoxide in de spier is nu nog de vraag, maar op basis van de beschikbare resultaten zou een verband zeker mogelijk zijn. Toekomstige studies zullen hier meer inzicht in moeten geven.

In het laatste hoofdstuk bediscussiëren we tot slot hoe de opslag van nitraat in spierweefsel invloed kan hebben op de effecten die gezien worden op de sportprestatie. Daarbij wordt een aantal factoren besproken die aan bod zijn gekomen in dit proefschrift, zoals de wijze van nitraatsuppletie (de duur van nitraatsuppletie, de nitraat bron, de dosis), maar ook factoren die mogelijk gerelateerd zijn aan de hoeveelheid nitraat in de spier (zoals bijvoorbeeld leeftijd, de mate van getraindheid en mogelijk spiervezel-specifieke effecten). Op basis van de onderzoeken beschreven in dit proefschrift suggereren wij dat de toename in de hoeveelheid nitraat in spierweefsel, en de mate waarin dit nitraat verbruikt wordt tijdens inspanning in belangrijke mate bepalen wat de effectiviteit is van nitraatsuppletie om sportprestaties te verbeteren. Op dit moment is de verwachting dat de grootste effecten te zien zijn tijdens inspanningen met hoge intensiteit, en bij inname van nitraatrijke groenten in vergelijking met nitraat zouten. Toekomstig onderzoek zal echter verder inzicht moeten geven in de mate waarin nitraat concentraties in spierweefsel beïnvloed worden door factoren zoals de nitraat bron, de hoeveelheid nitraat en de duur van nitraatinname, alsmede hoe het type inspanning van invloed is op het verbruik van het nitraat dat in de spier is opgeslagen.