

**Andreas N. Sørstrøm**

## **Effekter av antioksidanttilskudd på Heat Shock Protein responsen ved styrketrening**

Fysiologiske tilpasninger i  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivåer etter 5 og 10-12 uker med styrketrening og C+E-vitamintilskudd

**Masteroppgave i idrettsvitenskap**

Seksjon for fysisk prestasjonsevne  
Norges idrettshøgskole, 2012

## Sammendrag

**Innledning:** For å håndtere metabolsk- og mekanisk-stress under og etter styrketrening oppjusteres nivåene av en gruppe cellebeskyttende proteiner, kjent som Heat Shock Proteiner (HSP). Denne oppjusteringen blir omtalt som HSP-responsen på styrketrening, og anses som en viktig del av adaptasjonene for å opprettholde homeostase i muskelfibrene (Morton et al., 2009). HSP kan være involvert i beskyttelse mot skade på muskelstrukturer og gjenoppbygging av strukturene etter skade (Paulsen et al., 2007). En av aktiveringsmekanismene for HSP-responsen kan være oksidativt stress. Antioksidanttilskudd, som er utbredt i idrettsmiljøer, kan redusere HSP-responsen etter en økt med utholdenhetstrening (Khassaf et al., 2003; Jackson et al. 2004). Hensikten med denne studien var å undersøke effekten av C+E-vitamintilskudd på Heat Shock Protein-responsen hos trente forsøkspersoner etter en periode med styrketrening.

**Metode:** I en randomisert placebokontrollert studie, i regi av Norges idretthøgskole, fullførte 28 trente forsøkspersoner 10-12 uker med styrketrening med placebo- eller vitamin C (1000mg/ per dag) og E (235mg/ per dag). Forsøkspersonene trente kneekstensjonsmusklene 2 ganger i uken (kneekstensjon, knebøy, benpress og markløft). Muskelbiopsier ble tatt fra m. vastus lateralis før, 5 uker inn i (n=13), og etter treningsperioden. Proteinnivåene av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin ble analysert med elektroforese og western blot.

**Resultater:** HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåene endret seg ikke i noen av gruppene etter 5 eller 10-12 uker med styrketrening. Det ble imidlertid observert en tendens til redusert HSP70-nivå i C+E-vitamingruppen etter 5 uker med styrketrening. Menn tenderte til å ha sterkere HSP-respons enn kvinner, som kan være relatert kvinner så ut til å ha høyere HSP-nivå før treningsperioden. Det ble funnet en negativ korrelasjon mellom HSP-nivå før treningsperioden og HSP-responsen. HSP-responsen var ikke korrelert med muskelvekst.

**Diskusjon:** C+E-vitamintilskudd kan medføre en forbigående reduksjon i HSP70-nivå etter 5 uker med styrketrening hos trente forsøkspersoner. HSP-responsen ser ut til å være sterkere hos menn, og det kan være relatert til at høyere basalverdier hos kvinner. Høyt basalt HSP-nivå ser ut til å forklare redusert HSP-respons. Det ser ikke ut til at HSP-responsen er relatert til muskelvekst.

## **Innhold**

Sammendrag .....	3
Forord .....	6
1.0 Innledning .....	7
Hypoteser .....	8
2.0 Teori .....	9
2.1 Heat shock proteiner .....	10
Regulering av HSP .....	10
$\alpha$ B-crystallin .....	12
Heat Shock Protein 70 .....	12
Treningseffekter på HSP70 og $\alpha$ B-crystallin .....	13
Effekter av treningsstatus på basale HSP-nivåer og HSP-responsen til trening.....	16
Kjønnforskjeller i basale HSP-nivåer og HSP-responsen til trening .....	16
Effekter av HSP på muskelvekst og muskelfunksjon.....	18
2.2 Oksidativt stress og reaktive nitrogen- og oksygenforbindelser (RONS) .....	19
Redokssensitive signalveier.....	20
2.3 Antioksidanter .....	21
Vitamin C og E.....	21
Endogene antioksidanter og antioksidative enzymer .....	22
Effekter av antioksidanter på HSP-responsen .....	22
3.0 Metode .....	25
3.1 Utvalg .....	25
3.2 Supplementering:.....	26
3.3 Treningsprogrammet .....	26
3.4 Estimering av muskelmasse.....	27
Ultralyd - Estimering av muskeltykkelse .....	27
MRI - Estimering av muskeltverrsnitt .....	27

3.5 Biopsitaking.....	28
Homogenisering .....	28
3.6 Analyser av muskelvev.....	28
Totalprotein .....	28
Elektroforese og western blot.....	29
Immunohistokjemi - Estimering av fiberareal og fibertypesammensetning .....	30
3.8 Statistiske analyser .....	32
4.0 Resultater .....	33
5.0 Diskusjon.....	40
5.1 Antioksidanttilskudd og HSP-respons etter styrketrening .....	40
5.2 Effekter av styrketrening på HSP-nivå og individuell variasjon i HSP-responsen .....	42
5.3 Effekter av treningsstatus på HSP-respons og basale HSP-nivåer.....	43
5.4 Kjønnforskjeller i HSP-respons og basale HSP-nivåer .....	44
5.5 Forhold mellom HSP-respons og muskelvekst og fibertypesammensetning .....	45
5.6 Metodekritikk .....	47
Konklusjon .....	49
Referanser:.....	50
6.0 Vedlegg 1.....	56
Treningsprogram fase 1: 3-4 økter per uke i 2 uker.....	56
Treningsprogram fase 2 del 1: 4-6 økter per uke i 4 uker .....	57
Treningsprogram fase 2 del 2: 4-6 økter per uke i 4 uker .....	57
7.0 Vedlegg 2.....	58
Western blot og elektroforese: Protokoll.....	58

## Forord

Masteroppgaven var en del av SARA-prosjektet (Smartfish, Antioxidants, Recovery and Adaptations), som ble gjennomført over to perioder (vår 2011 og høst 2011) i regi av seksjon for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole.

Det er mange som har vært med på å muliggjøre dette prosjektet og analysere forskjellige resultater. Jeg vil først og fremst takke Gøran og Kristoffer for god veiledning og godt samarbeid i gjennomføringen av SARA-runde 2. Jeg vil også takke Rasmus og Håvard H. for gjennomføring av SARA-runde 1, og assistanse ved runde 2. Deltagerne i SARA-prosjektet fortjener også all ros for deres innsats i en tidkrevende intervensjon. Jeg håper prosjektet ga en inspirasjon til videre trening.

Rasmus må også takkes for ultralydmålingene, og Håvard W. for immunohistokjemiske analyser. Jeg også takke Truls for å være behjelpelig med det meste og for invitasjoner til å koble av på fotballbanen.

Takk til alle på muskellaboratoriet som har hjulpet meg i opplæringen, og generelt skapt god stemning i hverdagen. Den siste setningen gjelder også alle på masterkontoret som har blitt trivelige bekjentskaper. Jeg beklager mitt fravær fra kontoret den siste tiden, men det ble vanskelig å fokusere på skrivingen med så mange fantastiske mennesker en halvmetre unna.

Jeg må også min kjære mor for gode tips og korrekturlesing.

## 1.0 Innledning

Heat shock proteiner (HSP) er en fellesbetegnelse på en proteinfamilie med cellebeskyttende funksjoner, som finnes i alle vev hos pattedyr (Voss et al., 2003). Overproduksjon av HSP kan bevare muskelfunksjon og begrense tap av muskelmasse ved atrofierelatert sykdom (Gehrig et al., 2012), og gi raskere gjenvinning av muskelmasse og muskelfunksjon etter immobilisering (Miyabara et al., 2012). HSP bidrar til opprettholdelse og gjenvinning av cellulær homeostase etter forskjellige typer stress som kan forstyrre det homeostatiske miljøet (Morton, Kayani, McArdle, & Drust, 2009).

Ved eksponering til stress øker nivåene av forskjellige HSP i cellene og enkelte forflyttes til eventuelle skadeområder (Paulsen et al., 2009). Forhøyede nivåer av HSP etter eksponering til stress blir omtalt som HSP-responsen. Denne responsen er observert i studier etter forskjellige treningsformer, og er tiltenkt en viktig rolle i beskyttelse mot skader i fra oksidativt og mekanisk stress etter trening (Morton, Kayani, et al., 2009). Medvirkende i den beskyttende rollen mot oksidativt stress er også antioksidanter, som kan nøytralisere produktene som bidrar til oksidativt stress. Bruken av antioksidanttilskudd er utbredt i idrettsmiljøer, både blant profesjonell og amatører (Peternelj & Coombes, 2011), og det oksidative stresset under intensivt muskelarbeid blir brukt som et argument for inntak av antioksidanter av kommersielle aktører.

Systemet bak de cellulære adaptasjonene til trening er imidlertid komplekse, og voksende empiri tyder på at viktige signalveier for treningsadaptasjoner påvirkes av et forbigående oksidativt stress under og like etter treningsøkter (Powers, Talbert, & Adhihetty, 2011). Oksidativt stress kan blant annet aktivere HSF1 som er den primære gentranskripsjonsfaktoren for HSP (Ahn & Thiele, 2003; Bijur, Davis, & Jope, 1999; Jacquier-Sarlin & Polla, 1996), og enkelte studier antyder at antioksidanttilskudd kan redusere HSP-responsen etter en økt med utholdenhetstrening (Fischer et al., 2006; Jackson, Khassaf, Vasilaki, McArdle, & McArdle, 2004; Khassaf et al., 2003; Petersen et al., 2012). Det foreligger etter min viten ikke tilgjengelige studier, som har sett på effekter av antioksidant tilskudd på HSP-responsen til styrketrening. Hensikten med denne studien var derfor å undersøke effekten av antioksidanttilskudd på HSP-responsen etter en periode med styrketrening.

## Problemstillinger

- Hvilke effekter har kombinasjonen av C og E vitamintilskudd på HSP-responsen i m. vastus lateralis etter 5 og 10-12 uker med styrketrening hos personer som trener styrke regelmessig?
- Har kjønn og HSP-nivå ved utgangspunktet noe å si for HSP-responsen på styrketrening?
- Er HSP-responsen relatert til muskelvekst ved styrketrening?

## Hypoteser

- C- og E-vitamintilskudd reduserer HSP-responsen i m. vastus lateralis etter 5 og 10-12 uker med styrketrening hos personer som trener styrke regelmessig.
- Kvinner vil ha mindre HSP-respons enn menn ved styrketrening.
- Personer med høye HSP-nivåer ved utgangspunktet (baseline) vil ha mindre HSP-respons på styrketrening.
- HSP-responsen er relatert til muskelvekst.

## 2.0 Teori

Generelt regnes HSP som cellebeskyttende proteiner, som kan redusere effektene av potensielt skadelig stress på blant annet muskelcellenes proteiner og strukturer som sarkomerer, cytoskjelett og sarkolemma. En rekke faktorer kan påvirke graden av HSP-respons, hvilke HSP som aktiveres, og hvilke cellulære områder HSP-nivåene forhøyes i etter trening. Disse faktorene er blant annet treningsform og intensitet, involverte muskler, fibertype, kjønn, alder og treningsstatus. Aktiveringen av HSP-responsen til trening er noe uklar, men Noble et al. (2008) hevder det er en generell konsensus om at flere stimuli er nødvendig, og at de hver for seg spiller en begrenset rolle. Det vil si at det ikke er noen aktiveringsmekanismer som vil dominere alene, fordi trening kan påvirke flere direkte eller indirekte aktiveringsmekanismer samtidig. En mulig aktiveringsmekanisme til økt HSP produksjon etter trening er oksidativt stress. Dette stresset oppstår som et resultat av produksjon av frie radikaler og andre reaktive forbindelser som biprodukter av cellenes energifrigjøring. Antioksidanter kan nøytralisere frie radikaler, og enkelte studier antyder som nevnt at antioksidanter kan begrense HSP-responsen etter trening. Frie radikaler og antioksidanter har vært et særdeles populært forskningsfelt de to siste tiårene, men deres komplekse interaksjon og funksjoner er fortsatt ikke fullstendig forstått (B. Halliwell, 2012a, 2012b).

I teorikapitlet vil HSP funksjon under normale forhold og stress beskrives, med en dypere gjennomgang av to av HSP; HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin. Deretter beskrives reguleringen av HSP-responsen og treningseffekter på HSP-responsen, etterfulgt av en gjennomgang av noen faktorer som kan påvirke HSP-responsen etter trening. Det vil være fokus på HSP-responsen etter styrketrening, og hvorvidt faktorer som kjønn og treningsstatus påvirker HSP-responsen. Frie radikaler og antioksidanter vil beskrives, etterfulgt av en gjennomgang av studier som har sett på effekter av antioksidanter på HSP-responsen etter en økt med utholdenhetstrening. Foreliggende studie fokuserer på funn hos mennesker, men enkelte forskningsmetoder (for eksempel "knockout" modeller) er ikke mulig å gjennomføre på mennesker. Slike metoder kan imidlertid gi dypere kunnskap om årsaksmekanismer, og resultater fra studier i gnagere er derfor inkludert der det ikke er tilgjengelig kunnskap fra humane studier.



## 2.1 Heat shock proteiner

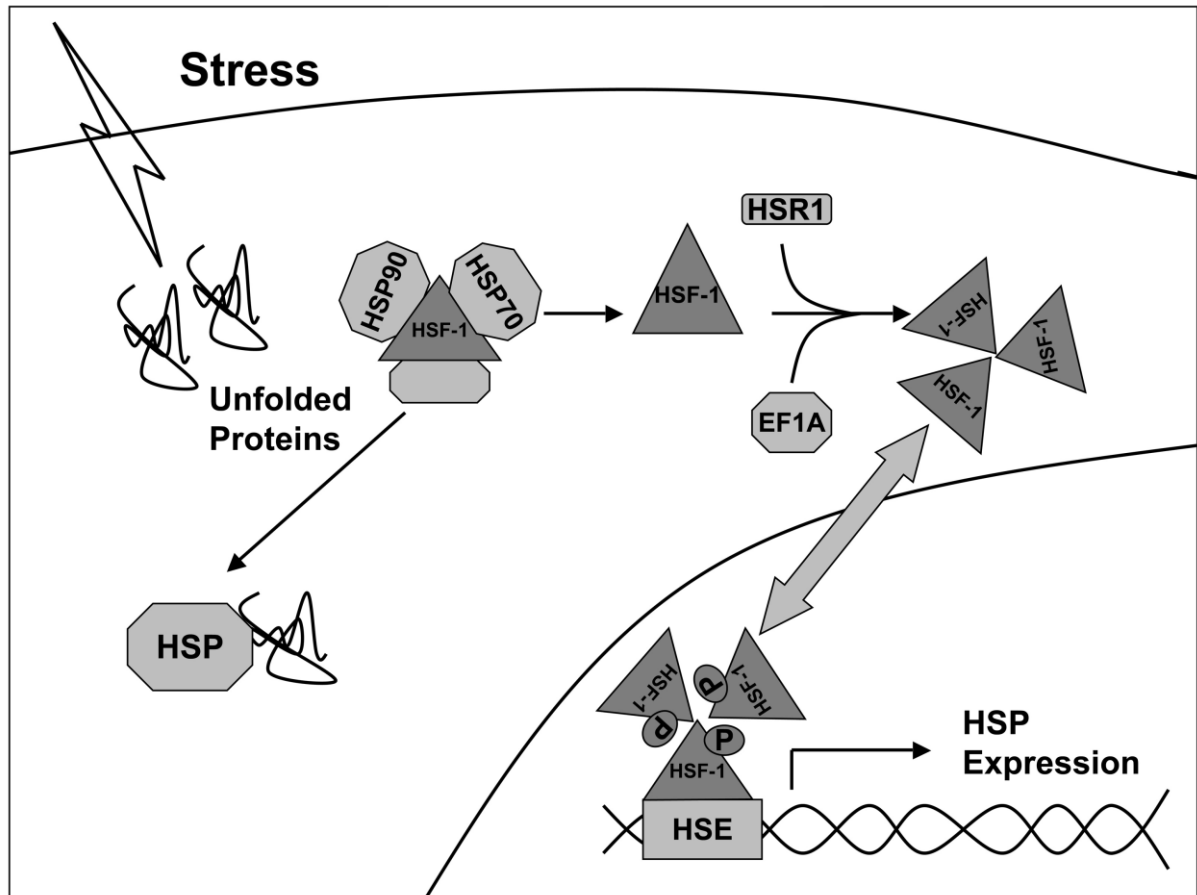
Ettersom eksponering til varme var det første stresset hvor HSP-responsen ble observert, oppsto termen "heat shock proteiner". Når det ble oppdaget at andre stresstyper også kunne initiere denne responsen ble termen stress proteiner tatt i bruk, etterfulgt av molekylær støttespiller når funksjoner i ustressede celler ble oppdaget. Rollen som molekylær støttespiller er felles for de fleste HSP og beskriver et protein som forenkler korrekt folding av polypeptider eller samling av oligomeriske strukturer, uten å være en direkte del av komplekset (Locke, 1997). HSP identifiseres gjerne ved deres molekylære masse (kilodalton, kDa) og grupperes deretter inn i familier med lik, eller tilnærmet lik, molekylærvekt (Morton, Kayani, et al., 2009). HSP med lav molekylvekt (8-27 kDa) blir ofte kategorisert som små HSP, mens de andre grupperes inn i familier på 40 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 90 kDa og 100kDa. Det fører til at forskjellige HSP i samme familie kan ha noe forskjellige molekylærvekt, cellulær lokalisering og funksjon (Noble, Milne, & Melling, 2008). Under normale cellulære betingelser (fravær av stress) og i stressfulle situasjoner fremmer de fleste HSP korrekt proteinfolding og transport ved å ta hånd om denaturerte (skadede) proteiner og nylig syntetiserte polypeptidkjeder (Lancaster & Febbraio, 2005; Welch, 1992) i: (Morton, Kayani, et al., 2009). Noen HSP ser imidlertid ut til å utvide funksjonene til å stabilisere og beskytte spesifikke cellestrukturer (se  $\alpha$ B-crystallin) (Feasson et al., 2002; Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2007), og regulere forskjellige signalmekanismer i cellene (se HSP70) (Noble et al., 2008). Oppsummert er de sentrale funksjonene til HSP å opprettholde eller gjenvinne cellulær homeostase ved å bistå med proteinfolding, forenkle reparasjon av skade, og gi beskyttelse mot skader som følge av cellulært stress.

### Regulering av HSP

HSP reguleres hovedsakelig av heat shock faktorer (HSF), hvor HSF1 er den viktigste stressresponderende transkripsjonsfaktoren. HSF1 er lokalisert i cytoplasma og i cellekjerner i ustressede celler, i en inaktiv tilstand som monomer bundet til HSP70 og HSP90 (Morimoto, 1993). Aktivering av HSF1 er avhengig av binding til heat shock elements (HSE) i cellekjernen, og HSP70 og HSP90 holder HSF1 inaktiv ved å oppta bindingssete for HSE.

Etter eksponering til stress frigjøres HSF1 ved at HSP70 og HSP90 separeres seg for å binde seg til nysyntetiserte eller feilfoldede proteiner. HSF1 danner deretter trimerer som lokaliseres til cellekjernen og kan aktivere transkripsjon av HSP-gener (Se figur 1).

Når cellulært stress avtar og nylig induerte HSP aggregerer i cellene vil HSP70 og HSP90 binde seg til HSF1 igjen. HSF1 vil dermed bli deaktivert via en autoregulatorisk feedbackloop (Morimoto, 1998).



Figur 1: Aktivering av HSF1 og produksjon av HSP. Stressindusert denaturering av proteiner frigjør HSF1 fra HSP70 og HSP90. Heat shock RNA og elongeringsfaktor 1 rekrutteres av HSF1 og HSF1 trimeriseres. HSF1 forflyttes deretter inn i cellekjernen, binder seg til HSE og fosforyleres, slik at gentranskripsjonen for HSP kan innledes. Figuren er hentet fra Stice & Knowlton (2004).

Som nevnt er mekanismene for den treningsrelaterte aktiveringen av HSP-responsen og den induksjonen av HSP fortsatt noe uklar. Generelt kan enhver hendelse som resulterer i feilfoldede proteiner, oksidativt stress eller annen metabolsk forstyrrelse (forskyvning i ionebalanse og opphopning av avfallsstoffer) aktivere HSP-responsen (Noble et al., 2008). Det er blitt foreslått at ved utholdenhetstrening (som ikke er kjent for å forårsake muskelskade) initieres HSP-responsen med redokssignalling (oksidering av muskelproteiner), mens ved trening som innebærer strukturelle og funksjonelle skader på muskler initieres HSP-responsen av mekanisk skade på proteiner strukturer (Morton, Kayani, et al., 2009). Redokssignalling kan aktivere HSF1 via oksidering av protein tioler (Huang, Zhang, Bae, & Liu, 1994).

## **$\alpha$ B-crystallin**

$\alpha$ B-crystallin blir kategorisert som et lite HSP (22 kDa) og tilhører en familie med krystalliner<sup>1</sup> som finnes i virveldyrs øyelinser, og i hjerte- og skjellemuskulatur. I skjellemuskulatur synes  $\alpha$ B-crystallin å være lokalisert ved I-båndene og M-linjen (Neufer, Ordway, & Williams, 1998) i: (Morton, Kayani, et al., 2009). Utover den generelle HSP-rollen som molekylær støttespiller er  $\alpha$ B-crystallin involvert i stabiliseringen av aktin filamenter (Mounier & Arrigo, 2002), og regulering av desmin filamenter som stabiliserer mellomskiver i Z-linjen (Atomi, Yamada, Strohmman, & Nonomura, 1991) i: (Morton, Kayani, et al., 2009). Hos mennesker er mutasjoner i  $\alpha$ B-crystallin genet forbundet med familiær desminrelatert myopati<sup>2</sup> (Vicart et al., 1998), og mus som mangler  $\alpha$ B-crystallin (knockout) har dårligere beskyttelse mot skade fra iskemireperfusjon<sup>3</sup> (Morrison, Whittaker, Klepper, Wawrousek, & Glembotski, 2004) i: (Morton, Kayani, et al., 2009). Sammen med HSP27 ser det ut til at  $\alpha$ B-Crystallin spiller en viktig rolle med remodellering av cytoskjelett og de kontraktile elementener etter skade, og øke toleransen til mekanisk stress (Feasson et al., 2002; Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2007).

## **Heat Shock Protein 70**

HSP70 familien består av 4 store isoformer, hvor Heat Shock Cognate 70 (HSC70 eller HSP73) og Heat Shock Protein 70 (HSP70 eller HSP72) er best beskrevet. I litteraturen brukes både betegnelsen HSP72 (hos rotter) og HSP70 (hos mennesker), selv om det er snakk om samme proteinmolekyl. I denne oppgaven presenteres HSP72 fra andre studier som HSP70 for å unngå forvirring. Utover rollen som molekylær støttespiller interagerer HSC70 og HSP70 med ulike signalveier i celler (Gabai & Sherman, 2002), mRNA stabilisering og degradering (Larolia, Cuesta, Brewer, & Schneider, 1999), og regulering av apoptose (Samali & Orrenius, 1998) i: (Morton, Kayani, et al., 2009). Signalveiene involverer blant annet NF- $\kappa$ B (Stice) og MAPK (ERK1/2, JNK og p38) (Zheng, Im, & Seo, 2006). NF- $\kappa$ B er et proteinkompleks som regulerer mange cellulære prosesser inkludert inflammasjon, vekst, stressrespons og apoptose blant annet (Kramer & Goodyear, 2007). NF- $\kappa$ B kan virke både for og mot disse cellulære prosessene avhengig av aktiveringsmønsteret, og aktivering av NF- $\kappa$ B kan derfor virke både cellebeskyttende

---

<sup>1</sup> Krystalliner: Vannløselige proteinstrukturer som består av 3 hovertyper;  $\alpha$ -(A og B),  $\beta$ -, og  $\gamma$ -crystallin.

<sup>2</sup> Desminrelaterte myopati: En alvorlig muskelsykdom som hindrer formeringen av proteinfilamenter og bidrar til tap av muskelmasse og funksjon.

<sup>3</sup> Iskemi reperfusjon: En metode hvor man introduserer korte perioder med iskemi, for å øke cellenes beskyttelsessystem mot den type stress.

og celleødeleggende (Stice & Knowlton, 2008). HSP70 kan svekke den pro-inflammatoriske aktiveringen NF- $\kappa$ B ved å hemme degradering av I $\kappa$ B komplekset (Voegeli, Wintink, Chen, & Currie, 2008) i: (Noble et al., 2008). MAPK signalveiene stimulerer til proteinsyntese og HSP70 kan stabilisere MKP-1 som hemmer disse signalveiene ved fosforylering. Selv om HSP70 er antatt å ha de samme funksjonene ved cellulært stress som i ustressede celler, er det forskning som kan tyde på at rollen til HSP70 kan variere med ulike typer stress. Etter muskelskadelige stresstyper er det observert forhøyet nivå av HSP70 i cytoskjelett og myofibriller etter forflytning fra cytosol (Paulsen et al., 2009). Dette antyder at HSP70, i likhet med små HSP, kan være involvert i remodellering av muskelstrukturer etter ødeleggelse.

### **Treningseffekter på HSP70 og $\alpha$ B-crystallin**

Mye av forskningen på HSP-responsen til styrketrening er gjort på treningsøkter med eksentrisk muskelarbeid som medfører omfattende skader på muskelstrukturer. Etter en økt med eksentrisk trening øker nivåene av små HSP og HSP70 betraktelig (Feasson et al., 2002; Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2007; Thompson, Clarkson, & Scordilis, 2002; Thompson, Maynard, Morales, & Scordilis, 2003; Thompson, Scordilis, Clarkson, & Lohrer, 2001; Vissing, Bayer, Overgaard, Schjerling, & Raastad, 2009). Når en slik treningsøkt gjentas er det observert forhøyede HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåer i cytoskjelett og myofibriller, til tross for redusert skade (Paulsen et al., 2009). En forklaring kan være at forhøyet HSP-nivå vedvarer i strukturene for å beskytter muskelen mot skade når treningsøkten gjentas. Forflytningen til/ økningen i myofibriller og cytoskjelett er ikke observert for HSP70 eller  $\alpha$ B-crystallin etter konsentrisk muskelarbeid (Vissing et al., 2009), som er mindre skadelig, og de totale nivåene av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin forble uforandret.

Basert på disse studiene ser det ut til at treningsformen er avgjørende for HSP-responsen, og at funksjonen til  $\alpha$ B-crystallin og HSP70 kan variere etter hvilken type stress som aktiverer responsen. Selv om eksentrisk muskelarbeid er en naturlig del av en bevegelsessyklus, benyttes maksimal belastning i eksentrisk fase sjeldent ved vanlig styrketrening. En økt med mindre skadelige isometriske muskelaksjoner kan imidlertid også øke HSP70-nivå (Tupling, Bombardier, Stewart, Vigna, & Aquiri, 2007), noe som tyder på at det er mulig å inducere HSP-responsen med tradisjonell styrketrening. Se tabell 1 for en oversikt over studier som har sett på effekten av en økt med styrketrening på HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåer i skjelettmuskulatur hos mennesker.

Etter en periode med styrketrening er det også observert forhøyet nivå av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin (Gjovaag & Dahl, 2006; Liu, Lormes, Wang, Reissnecker, & Steinacker, 2004; Paulsen et al., 2011). 11 uker med styrketrening økte HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåer i m. vastus lateralis (Paulsen et al., 2011), 5-8 uker med styrketrening på forskjellig intensitet og volum økte HSP70-nivå i m. triceps brachii (Gjovaag & Dahl, 2006), og 3 uker med styrketrening økte HSP70-nivå i m vastus lateralis (Liu et al., 2004). Det står i kontrast til en studie som fant redusert HSP70-nivå i m. biceps brachii etter 12 uker med konsentrisk styrketrening, og uforandret HSP70-nivå etter eksentrisk styrketrening (Gjovaag, Vikne, & Dahl, 2006). Dette tyder på at HSP-responsen til styrketrening påvirkes av flere faktorer enn treningsform og intensitet. Utenom faktorene som presenteres i de to neste avsnittene, er det observert at HSP-responsen også kan påvirkes av muskelfibertype (Tupling et al., 2007). Se tabell 2 for en oversikt over studier som har sett på HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåer i skjelettmuskulatur hos mennesker etter en periode med styrketrening.

Tabell 1: Oversikt over studier som har sett på HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivå i skjelettmuskulatur hos mennesker etter en styrkeøkt.

Studie	Treningsstatus	N	Treningstype	Intensitet/ varighet	Biopsivev	$\alpha$ B-crystallin	HSP70
Féasson et al. (2002)		♂ = 12	Løping nedover	-12 % helling i 30 min	<i>m. vastus lateralis</i>	↑	
Paulsen et al. (2007)	Utrente	♂ = 11	Eksentrisk økt	300 eksentriske repetisjoner	<i>m. vastus lateralis</i>	↑	↑
Paulsen et al. (2009)	Utrente	♀ = 7 ♂ = 17	Eksentrisk økt 1 Eksentrisk økt 2	4 x 5 eksentriske repetisjoner	<i>m. biceps brachii</i>	↑ ↑	↑ ↑
Thompson et al. (2001)	Utrente	♀ = 4 ♂ = 4	Eksentrisk økt	2 x 25 eksentriske repetisjoner med biceps curl	<i>m. biceps brachii</i>		↑
Thompson et al. (2002)	Utrente	♀ = 8 ♂ = 2	Eksentrisk økt	2 x 25 eksentriske repetisjoner med biceps curl	<i>m. biceps brachii</i>		↑
Thompson et al. (2003)	Utrente	♀ = 7 ♂ = 1	Eksentrisk økt	50 eksentriske muskelaksjoner	<i>m. biceps brachii</i>		↑
Tupling et al. (2007)	Utrente	♂ = 10	Isometrisk kneekstensjon	30 min (60 % av MVC) med 5 sek innsats og pause	<i>m. vastus lateralis</i>		↑
Vissing et al. (2009)	Utrente	♂ = 14	Eksentrisk økt 1 Eksentrisk økt 2 Konsentrisk økt	30 min med bench-stepping	<i>m. vastus lateralis</i>	↑ ↑ →	↑ ↑ →

Tabell 2: Oversikt over studier som har sett på HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivå i skjelettmuskulatur hos mennesker etter en styrketreningsperiode.

Gjovaag & Dahl (2006)	Utrente	♀ = 20 ♂ = 12	Styrketrening	5-8 uker	<i>m. triceps brachii</i>		↑
Gjovaag et al. (2006)	Trente	♂ = 8 ♂ = 7	Eksentrisk trening Konsentrisk trening	2-3 økter pr uke i 12 uker	<i>m. biceps brachii</i>		→ ↓
Liu et al. (2004)	Roere	♂ = 6 parret	Styrketrening + roing Utholdenhetstrening	144 min per dag i 3 uker 120 min per dag i 3 uker	<i>m. vastus lateralis</i>		↑ →
Paulsen et al. (2012)	Utrente	♂ = 15	Styrketrening	3 økter per uke i 11 uker	<i>m. vastus lateralis</i> <i>m. trapezius</i>	↑ →	↑ →

### **Effekter av treningsstatus på basale HSP-nivåer og HSP-responsen til trening**

Hos styrketrente forsøkspersoner er det observert redusert HSP70-nivå etter konsentrisk styrketrening hos trente utøvere (Gjovaag et al., 2006), mens det er observert forhøyet HSP70-nivå etter styrketrening hos utrente (Gjovaag & Dahl, 2006; Paulsen et al., 2011) og roere (Liu et al., 2004). Videre er det observert en negativ korrelasjon mellom basalt HSP70-nivå før og HSP70-responsen etter styrketrening (Gjovaag & Dahl, 2006). Basalt HSP-nivå er normalnivåer av HSP i cellene når de ikke er utsatt for stress. Paulsen et al. (2012) observert forhøyet HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivå i m. vastus lateralis etter styrketrening, men ikke i m. trapezius, som kan være relatert til at basalnivået var høyt i forhold til m. vastus lateralis. En studie har sammenlignet basalnivåene av forskjellige HSP hos utrente og utholdenhetstrente menn, og observert at trente hadde høyere basalnivåer av HSP60 og  $\alpha$ B-crystallin, men ikke HSP70 (Morton et al., 2008). Dette kan være relatert til at HSP70 har forskjellige roller ved forskjellig type stress. Det er mulig at det bare er en forbigående økning i HSP70-nivå etter utholdenhetstrening, mens adaptasjonene i HSP70-nivå kanskje er gjenværende for å beskytte muskelstrukturer etter mer skadelig trening. Noen studier finner også betydelig individuell variasjon i HSP70-responsen til trening, og at den delvis kan relateres til basalnivåene av HSP70 (Khassaf et al., 2001; Morton et al., 2006). Forsøkspersoner med høye basalnivåer før treningen viste svakere HSP-respons etter trening, mens forsøkspersoner med lavere nivåer viste større endringer.

Basert på disse studiene ser det ut til at de basale HSP-nivåene påvirkes av trening og at de kan variere mellom muskelgrupper. Når en stresstype som eksempelvis styrketrening blir vanlig ser det ut til at adaptasjonene i HSP-nivå blir gjenværende i form av høyere basalt HSP-nivå i muskelcellene, og at det medfører mindre HSP-respons til vanlig stress. Basale HSP nivåer og HSP-responsen til trening kan imidlertid påvirkes av flere faktorer enn treningsvaner og forskjellige muskler.

### **Kjønnsforskjeller i basale HSP-nivåer og HSP-responsen til trening**

Det er observert forhøyet HSP70-nivå etter en periode med styrketrening med et utvalg hvor kvinner var overrepresentert ( $\text{♀} = 20$   $\text{♂} = 12$ ) (Gjovaag & Dahl, 2006). Etter en periode med utholdenhetstrening ser det imidlertid ut til å være sterkere  $\alpha$ B-crystallin-respons hos menn enn hos kvinner (Morton, Holloway, et al., 2009). Det ble ikke funnet noen effekter av utholdenhetstreningen på HSP70-nivåer. Morton et al. (2009) har dessverre ikke analysert basalnivåene for kvinner og menn.

Studier på rotter har vist at kjønns spesifikke hormoner som østrogen kan påvirke basalt HSP-nivå (Bombardier, Vigna, Iqbal, Tiidus, & Tupling, 2009; Voss et al., 2003), og at østrogen (Paroo, Dipchand, & Noble, 2002) og testosteron (Milne, Thorp, Melling, & Noble, 2006) kan påvirke HSP-responsen etter en treningsøkt. Effektene av østrogen er mediert gjennom østrogenreseptoren, som har genomiske og ikke-genomiske effekter (Stice & Knowlton, 2008). Ikke-genomisk  $17\beta$ -estradiol<sup>4</sup> signalering, den mest aktive østrogenformen, kan aktivere NF $\kappa$ B og HSP-responsen, og øker cellulær stresstoleranse (Stice & Knowlton, 2008).  $17\beta$ -estradiol stimulerer også fosforyleringen av  $\alpha$ B-crystallin og HSP27 via p38 MAPK (Hsu et al., 2007), som kan være essensielt for de beskyttende effektene av de små HSP. Østrogenreseptoren befinner seg monomerisk i cytoplasma bundet til et multiproteinkompleks, som inkluderer HSP90 og HSP70. HSP90 binding til østrogenreseptoren holder den i en mottakelig tilstand for binding til  $17\beta$ -estradiol (Stice & Knowlton, 2008), men denne interaksjonen er kompleks ettersom HSP90 frigjøres fra østrogenreseptoren når den skal binde østrogenhormonet (Noble et al., 2008). Ubundet HSP90 kan som nevnt binde seg til HSF1, og dermed motvirke transkripsjon av HSP.

Milne et al. (2006) undersøkte effekten av 60 min løping på HSP70-responsen i hjertemuskel hos (intakte/ukastrerte) normale rotter og kastrerte rotter med eller uten testosterontilskudd ( $5\alpha$ -dihydrotestosteron<sup>5</sup>). Normale og supplementerte rotter økte HSP70 mRNA og protein etter treningsøkten, mens HSP70 nivåene hos kastrerte rotter uten tilskudd forble uforandret med mindre de ble utsatt for hypertermi. Dette tyder på at testosteron er viktig for HSP70-responsen til trening hos hannrotter, og at effekten av testosteron er spesifikk for treningsrelatert stress.

Paroo et al. (2002) undersøkte effekten av 60 min løping på HSP70-responsen i skjelettmuskel hos hann- og hunnrotter, samt ovariektomerte hunnrotter med placebo- eller østrogentilskudd. Hannrotter hadde større økning i nivåene av HSP70-mRNA og -protein enn normale hunnrotter etter treningen. Videre var økningen i nivåene av HSP70-mRNA og -protein etter treningsøkten også høyere hos ovariektomerte hunnrotter med placebo- enn østrogentilskudd, noe som tyder på at noe forskjellen i HSP-responsen mellom kjønn kan skyldes østrogen. Det ble ikke observert noen forskjeller i basale HSP70 nivåer mellom kjønnene.

---

<sup>4</sup>  $17\beta$ -estradiol signalering: Den metabolsk aktive østrogenformen

<sup>5</sup>  $5\alpha$ -dihydrotestosteron: Den metabolsk aktive testosteronformen



Interessant nok virker det imidlertid som en av årsakene til at østrogen kan svekke HSP-responsen, er at basalt HSP-nivå kan forhøyes av østrogen (Bombardier et al., 2009; Voss et al., 2003). Hunnrotter har betydelig høyere HSP70-nivå i hjerte enn hannrotter, men fjerning av ovariene reduserer HSP70-nivå i hjertemuskulaturen. Lignende funn er observert i m. soleus, hvor østrogentilskudd økte HSP70-nivå hos ovariektomerte hunnrotter uten ytterligere økning etter en treningsøkt (Bombardier et al., 2009).

Imidlertid viser studier at en treningsperiode kan indusere HSP-responsen i hjertemuskulaturen til hunnrotter (Chicco, et al., 2006; Demirel, et al., 1998, 2001; Taylor, et al., 1999; Thorp, et al., 2007) i: (Noble et al., 2008). Dette kan være relatert til at østrogennivåene vil variere over tid, og at HSP-responsen til trening derfor kan observeres når østrogennivåene er lave. Upubliserte data fra Milne & Noble (2008) har vist at HSP70-responsen til trening varierer med østrus-syklusen, og at HSP70-responsen etter trening er negativt korrelert med sirkulerende østrogennivåer rett før økten (Noble et al., 2008).

Oppsummert virker det som at kjønnsforskjeller i HSP-responsen kan skyldes en kombinasjon av østrogen og testosteron. Det ser ut til at testosteron er essensielt for HSP-responsen til trening hos hannrotter, mens østrogen kan øke basale HSP-nivåer som er forbundet med redusert HSP-respons hos hunnrotter.

### **Effekter av HSP på muskelvekst og muskelfunksjon**

I tillegg til å remodellere muskelceller etter skade, er det blitt foreslått at HSP også kan være involvert i remodelleringen muskelcellene ved muskelvekst (Huey, 2006).

Funksjonell overbelastning av muskler i rotters bakben (m. soleus og m. plantaris), som innebærer fjerning av en synergistisk muskel (m. gastrocnemius), førte til en HSP25-respons (HSP27 hos mennesker) som var relatert til hypertrofi (Huey, 2006). Dette antyder at HSP kan spille en rolle i remodelleringen av muskelceller under hypertrofi, men studier på mennesker observerer ikke noen sammenheng mellom hypertrofi (tverrsnittareal fra immunohistokjemi) og HSP-respons etter styrketrening (Paulsen et al., 2012).

Studier på mus antyder imidlertid at overproduksjon av HSP70 kan bevare muskelfunksjon ved å begrense tap av muskelmasse ved atrofierelatert sykdom (Gehrig et al., 2012), og gi raskere gjenvinning av muskelmasse og funksjon etter immobilisering (Miyabara et al., 2012). Miyabara et al. (2012) undersøkte effekten av 7

dager med immobilisering og påfølgende 7 dager med aktivitet på normale mus og genmanipulerte mus med overproduksjon av HSP70. Overproduksjon av HSP70 ga raskere gjenvinning av muskelstørrelse og funksjon etter en periode med immobilisering og påfølgende gjenervelse. Gehrig et al. (2012) undersøkte effekten av BGP-15 (farmakologisk indusering av HSP70) behandling på mus med muskeldystrofi. Behandlingen forbedret muskel struktur, muskelstyrke og kontraktile funksjon hos de dystrofiske musene. Dette er imidlertid kunstig manipulering av HSP70-nivåer ved patologiske tilstander, og ikke nødvendigvis overførbart til treningsrelatert HSP-respons og hypertrofi.

## **2.2 Oksidativt stress og reaktive nitrogen- og oksygenforbindelser (RONS)**

Oksidativt stress innebærer en ubalanse i det cellulære miljøet hvor inntredelse/produksjon av frie radikaler og andre reaktive forbindelser overgår kapasiteten til å nøytralisere dem. Energimetabolismen medfører en produksjon av frie radikaler og andre reaktive oksygen og nitrogenforbindelser (RONS). Dette er stort sett peroksid og nitrogenoksid, men de kan reagere med andre molekyler og danne en rekke former for reaktive oksygen og nitrogen radikaler (Halliwell & Gutteridge 2007) i: (Powers et al., 2011). RONS er prooksidanter med uparede elektroner i sitt ytterste skall, som gjør dem ustabile eller såkalt reaktive. De vil derfor kunne reagere med andre molekyler og oksidere dem. Oksidativt stress kan skade ødelegge viktige strukturelle eller funksjonelle komponenter i cellene, som lipidmembraner, lipoproteiner, signalmolekyler og RNA eller DNA (Blomhoff, 2004). Graden av oksidering balanseres av forholdet mellom RONS, antioksidanter og cellens forsvarsmekanismer. RONS kan produseres flere steder i muskelcellene, men produksjonssted kan variere med forskjellige treningsformer (Pattwell & Jackson, 2004). Patwell & Jackson (2004) mener utholdenhetstrening som øker aktiviteten i mitokondriene vil føre til frigjøring av store mengder hydrogenperoksid, mens styrketrening primært vil gi utslipp av superoksid og nitrogenoksid etter mekanisk drag i cellemembranen. Muskulær inaktivitet over tid øker produksjonen av RONS i mitokondriene betraktelig (Kavazis et al., 2009), og flere studier har konkludert at det oksidative stresset som oppstår ved inaktivitet bidrar til muskelatrofi (Powers, Kavazis, & DeRuisseau, 2005; Powers, Kavazis, & McClung, 2007). En del studier tyder imidlertid på at mitokondriene ikke er primærkilden for produksjon av RONS under trening (Adhihetty, Ljubcic, Menzies, & Hood, 2005; Di Meo & Venditti, 2001; Kavazis et al., 2009) i: (Powers et al., 2011), og

dermed at RONS produseres forskjellige steder ved kontraktil aktivitet og langvarig inaktivitet. Denne observasjonen er interessant ettersom RONS vil reagere med sine omgivelser, og effektene av RONS derfor kan variere med hvor de blir produsert. Andre mulige bidragsyttere til produksjon av RONS under kontraktil aktivitet er NADH oksidasene i sarkoplasmatiske retikulum, transverse tubuli, og sarkolemma, og nitrogenoksid syntaser (Powers et al., 2011). En sekundærkilde til RONS produksjon etter muskulær aktivitet er eventuelle inflammasjonsprosesser som oppstår i etterkant av aktiviteten (Koh, 2002).

Basert på disse studiene kan det se ut til at vedvarende produksjon av RONS fra enkelte cellulære komponenter kan bidra til atrofi, mens en forbigående produksjon av RONS fra andre cellulære komponenter er et nødvendig resultat av kontraktil aktivitet. Det nødvendige resultatet kan imidlertid være mer gunstig enn et nødvendig onde, og opprettholdelse en hvis grad av oksidativt stress i en periode kan ha viktige funksjoner i cellene.

### **Redokssensitive signalveier**

Fra det tidligere synspunktet om at RONS var skadelige og at deres funksjon burde motvirkes, ser det nå ut til at RONS aktiverer flere viktige signalveier for adaptasjoner til trening (Jackson et al., 2002; Powers et al., 2011). Dismutasjon av superoksid i celler produserer hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ), som er en svak, ikke-radikal, oksidant med lang halveringstid, som muliggjør diffusjon innad i og mellom celler (B. Halliwell, Gutteridge, J., 2007) i: (Powers et al., 2011).  $H_2O_2$  reagerer med mange forskjellige cellulære molekyler, og kan aktivere flere forskjellige signalveier (B. Halliwell, Gutteridge, J., 2007) i: (Powers et al., 2011). *In vitro* studier har vist at  $H_2O_2$  kan aktivere HSF1, og synes å være involvert i forlytningen av HSF til cellekjernen (Bijur et al., 1999; Jacquier-Sarlin & Polla, 1996). Nitrogenoksid er også kjent for å kunne aktivere forskjellige signalveier, og kan reagere med superoksid for å danne peroksyntritt. Peroksyntritt er en sterk oksidant som fører til tømning av protein tioler (Moylan & Reid, 2007) i: (Powers et al., 2011). Protein tioler er ansett som essensielt i de fleste, om ikke alle, redokssensitive signalmekanismer (Jackson et al., 2002), og oksidering av protein tioler kan være en av aktiveringsmekanismene for HSF1 (Huang et al., 1994). Flere transkripsjonsfaktorer virker å være regulert av forholdet mellom oksidering og redusering (redoksstatusen) etter trening (Jackson et al., 2002). Studier

tyder blant annet på at HSF1 (Ahn & Thiele, 2003), og NF- $\kappa$ B (Gomez-Cabrera et al., 2005) er redokssensitive.

### **2.3 Antioksidanter**

Antioksidanter er enhver substans som kan nøytralisere frie radikaler og dermed hindre eller begrense oksidering av andre substanser (B. Halliwell & Gutteridge, 1995). Det endogene antioksidantsystemet er kroppens egenproduserte antioksidanter og antioksidative enzymer, mens eksogene antioksidanter er de vi inntar gjennom kostholdet. Antioksidanter fungerer ved å la seg selv oksidere av RONS slik at andre viktige cellulære komponenter kan unngå oksidering. Resultatet blir et antioksidantradikal som er langt mindre reaktiv enn det opprinnelige radikalet (Blomhoff, 2005), og som kan omdannes til antioksidant igjen av eksempelvis endogene antioksidative enzymer (Packer, 1991). Dette er en kompleks trinnvis reaksjon som kan involvere en rekke antioksidative molekyler (Blomhoff, 2005). I lys av at RONS kan aktivere viktige signalveier til treningsadaptasjoner, er det reist bekymring om hvorvidt tilskudd med eksogene antioksidanter er hensiktsmessig (Gomez-Cabrera, Ristow, & Vina, 2012).

#### **Vitamin C og E**

De vanligste antioksidantene er vitamin C (askorbinsyre) og vitamin E ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\delta$ -, og  $\gamma$ - tokoferol og  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\delta$ -, og  $\gamma$ -tokotrienol) (Blomhoff, 2004), men det er mange flere antioksidanter i kostholdet vårt (Eksogene antioksidanter).

Vitamin E er et fettløselig vitamin som er mest kjent for sin evne til å motvirke oksidering av lipider ved å nøytralisere RONS (Schurks, Glynn, Rist, Tzourio, & Kurth, 2010). Mennesker absorberer alle former for vitamin E, men lagrer kun  $\alpha$ -tokoferol (Packer, Weber, & Rimbach, 2001).  $\alpha$ -tokoferol er lokalisert i cellemembraner (Atkinson, Harroun, Wassall, Stillwell, & Katsaras, 2010) hvor den beskytter mot oksidativ skade og fremmer cellulær homeostase (Howard, McNeil, & McNeil, 2011). Når  $\alpha$ -tokoferol har nøytralisert et fritt radikal og blitt omgjort til et tokoferylradikal, kan tokoferylradikalet omgjøres til funksjonell antioksidant igjen av endogene antioksidative enzymer (Packer, 1991), og vitamin C (Buettner, 1993).

Vitamin C er et vannløselig vitamin som befinner seg i cellens cytosol (Ji, 1995). Mennesker er det eneste pattedyret som ikke produserer vitamin C, og er dermed avhengig av inntak gjennom kostholdet for å bruke vitaminet (B. Halliwell, 2006).

Vitamin C kan nøytralisere de fleste RONS, inkludert  $O_2^-$ , OH,  $RO_2$  og ONOOH (B. Halliwell, 2006).

Selv om vitamin C og E har forskjellig cellulær lokalisering tyder eksperimentelle data på at beskyttelsen av lipider og lipidstrukturer er et samarbeid mellom antioksidantene (Buettner, 1993). Som nevnt er vitamin C kapabel til å resirkulere tokoferylradikalet, slik at det omformes til vitamin E igjen og kan motvirke oksidering (Buettner, 1993). Det betyr at vitamin E muligens kan redusere effekten av vitamin C, men også at vitamin E kan være avhengig av tilstedeværelsen av andre antioksidanter, som vitamin C, for å være en funksjonell antioksidant. Et resultat av det er at mye forskning på antioksidanter gjøres med en kombinasjon av vitamin C og E tilskudd.

### **Endogene antioksidanter og antioksidative enzymer**

I tillegg til de eksogene antioksidantene produserer cellene egne antioksidanter (glutation, urinsyre og bilirubin) og antioksidative enzymer (superoksid dismutase, glutation peroksidase og katalase). De endogene antioksidantsystemene oppjusteres som respons til en treningsøkt, og at inntak av eksogene antioksidanter kan inhibere denne responsen (Gomez-Cabrera et al., 2005; Khassaf et al., 2003).

### **Effekter av antioksidanter på HSP-responsen**

Som nevnt kan frie radikaler og deres derivater som produseres under trening aktivere HSF1 og dermed initiere en HSP-respons. Hvis antioksidantene nøytraliserer disse radikalene vil dette i teorien kunne påvirke HSP-responsen i negativ retning, forutsatt at frie radikaler og oksidativt stress er den dominerende aktiveringsmekanismen etter treningsrelatert stress.

Flere studier har undersøkt effekter av antioksidanttilskudd på HSP-responsen i skjelettmuskulatur etter en økt med utholdenhetstrening (Fischer et al., 2006; Jackson et al., 2004; Khassaf et al., 2003; Petersen et al., 2012). Khassaf et al (2003) undersøkte effekten av vitamin C tilskudd på HSP70-nivå i m. vastus lateralis etter 45 min sykling med et bein på 70% av  $VO_2$ peak hos 16 utrente menn. Forsøkspersonene ble randomisert til å innta 0,5 g vitamin C per dag, eller ingen tilskudd i 8 uker. Studien fant redusert HSP70-respons i gruppen som tok vitamin C tilskudd, men denne gruppen hadde forhøyet basalnivå av HSP70 før treningsøkten. Dermed kan den reduserte responsen kanskje forklares med økt HSP nivå i utgangspunktet som en direkte eller indirekte effekt av vitamin C tilskudd. Mekanismen bak økningen i HSP-nivå ved

vitamin C tilskudd er uklar, men forfatterene (Khassaf et al. 2003) fremhever at vitamin C også kan ha prooksidierende effekter under enkelte forhold.

Lignende funn ble også gjort av Jackson et al. (2004). 22 utrente menn ble randomisert til å innta vitamin E (400 mg RRR- $\alpha$ - tokoferol per dag),  $\beta$ -karoten (15 mg per dag), eller ingen tilskudd i 8 uker. HSP-nivå i m. vastus lateralis ble analysert 2 dager før og etter en treningsøkt, som besto av sykling med et ben på 70 % av  $VO_2$ peak. Antioksidanttilskuddene blokkerte HSP70-responsen som ble observert etter treningsøkten i kontrollgruppen, men det ble ikke funnet noen signifikante endringer i basalt HSP70-nivå før økten etter vitamin E tilskudd.

Petersen et al. (2011) undersøkte effekten av antioksidanten N-acetylcysteine (NAC) på HSP70 mRNA-nivå i m. vastus lateralis før og under en treningsøkt med 8 utholdenhetsrente menn. Treningsøkten ble gjort med 7 dagers mellomrom og besto av sykling i 45 min på 71 % av  $VO_2$ peak og deretter 92 % av  $VO_2$ peak til utmattelse. Forsøkspersonene ble gitt  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  N-acetylcysteine intravenøst i 15 min for å øke plasmakonsentrasjonen av N-acetylcysteine, etterfulgt av  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  frem til utmattelse. NAC infusjon tenderte til å redusere HSP70 mRNA (57 %) etter 45 minutter med sykling.

Fisher et al. (2006) undersøkte effekten av vitamin C og E tilskudd på HSP70 protein- og mRNA-nivå i m. vastus lateralis, og i blodet (serum), etter en treningsøkt på 21 fysisk aktive menn. Økten besto av 60 dynamiske kneekstensjoner per minutt i 3 timer. Forsøkspersonene ble randomisert til å innta vitamin C (500 mg askorbinsyre) og en E vitamin (400 iu RRR- $\alpha$ - tokoferol), vitamin C (500 mg askorbinsyre) og to E vitaminer (292 iu RRR- $\alpha$ - tokoferol og 130 iu RRR- $\gamma$ - tokoferol), eller placebopiller. I kontrollgruppen økte HSP70 mRNA-nivå i muskel og blod 3 timer etter økten, mens nivået av HSP70 protein i muskelen tenderte til å øke. Det ble ikke funnet noen signifikante økninger i gruppen som tok vitamin C og RRR- $\alpha$ - tokoferol, men det var heller ingen forskjell fra kontrollgruppen. Gruppen som tok vitamin C, RRR- $\alpha$ - tokoferol og RRR- $\gamma$ - tokoferol hadde imidlertid lavere HSP70 mRNA-nivå i muskel og blod sammenlignet med kontrollgruppen 3 timer etter økten. Dette tyder på at kombinasjonen av vitamin C og E hemmer HSP70-responsen etter en treningsøkt, og at isoformen  $\gamma$ - tokoferol kan være mer inhiberende enn  $\alpha$ - tokoferol.

Basert på disse studiene kan det se ut til at antioksidanter kan redusere eller blokkere HSP-responsen til en økt med utholdenhetstrening, men at forskjellige antioksidanter og isoformer kan ha forskjellige effekter. Det er mulig at vitamin C motvirker HSP responsen ved å forhåndsaktivere av stressforsvaret, men kombinasjonen av vitamin C og E ser imidlertid ut til å begrense økningen i HSP70 mRNA-nivå etter en treningsøkt.

### 3.0 Metode

Denne oppgaven var en del av SARA (Smartfish, Antioxidants, Recovery and Adaptations) -prosjektet som hadde til hensikt å undersøke effekten av antioksidanter (vitamin C og E), og Smartfish (restitusjonsdrikk), på adaptasjoner til styrketrening. Studien ble gjennomført i to perioder hvor den første var i vårsemesteret 2011, og andre i høstsemesteret 2011. SARA prosjektet var en randomisert, placebokontrollert, dobbeltblindet studie som ble gjennomført ved Norges idrettshøgskole. Studien var i henhold til standarder satt av Helsinkideklorasjonen og var godkjent av regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Sør-Øst-Norge.

### 3.1 Utvalg

Deltagerne i studien ble rekruttert fra Norges idrettshøgskole, Kringsjø studenthjem, og treningssentre i Oslo. Inklusjonskriterier for deltagelse var en alder mellom 18 og 45 år og treningserfaring med minst en styrkeøkt per uke de siste 6 månedene. Eksklusjonskriterier var sykdom eller skader i muskel-skjelettapparatet som hindrer gjennomføring av treningsprogrammet, bruk av kosttilskudd under intervensjonen, over 2 treningsøkter pr uke utenom treningsprogrammet, lav oppfølging av treningsprogrammet (<30 økter), allergi mot lokalbedøvelse (Xylocain), og overskridelse av inntaksrestriksjoner for antioksidantrike matvarer (f.eks. kaffe og juice) under studieforløpet. Alle deltagere ga skriftlig samtykke før studien, og det ble arrangert et informasjonsmøte i forkant av studien. Totalt ble 45 forsøkspersoner inkludert i studien og randomisert til placebo- eller C+E-vitamingruppe. Utvalget ble stratifisert på bakgrunn av kjønn og muskelstyrke (1 maksimal repetisjon) fra første styrketest for å sikre sammenlignbare grupper (Se tabell 3). 12 (30 %) forsøkspersoner ble ekskludert på grunn av sykdom eller skade (2), for mye trening (5), for lite trening (3) eller annet (2). Antropometriske data for forsøkspersonene som er inkludert i de endelige analysene ved er presentert i tabell 3.

Tabell 3: Antropometriske data for forsøkspersonene i placebo- og C+E-vitamingruppen (n=28). Av de 28 ble 7 fra placebo- (♀=2, ♂=5) og 6 fra C+E-vitamingruppen (♀=1, ♂=5) inkludert til analyser midtveis i intervensjonen.

Gruppe	N	Alder	Høyde (cm)	Vekt (kg)	Fettfri masse (kg)
Placebo	♀=5 ♂=7	23,9±2,8	175,4±8,3	72,2±13,7	61,6±13
Vitamin C+E	♀=5 ♂=11	26,1±5,9	175,3±7,4	75,2±12,2	61,2±9,6



I tillegg til placebo- og C+E-vitamingruppen, gjennomførte en tredje gruppe som inntok restitusjonsdrikken Smartfish intervensjonen ( $\text{♀}=5$   $\text{♂}=6$ ). Denne gruppen er i utgangspunktet ikke en del av denne oppgaven, men er inkludert i enkelte analyser.

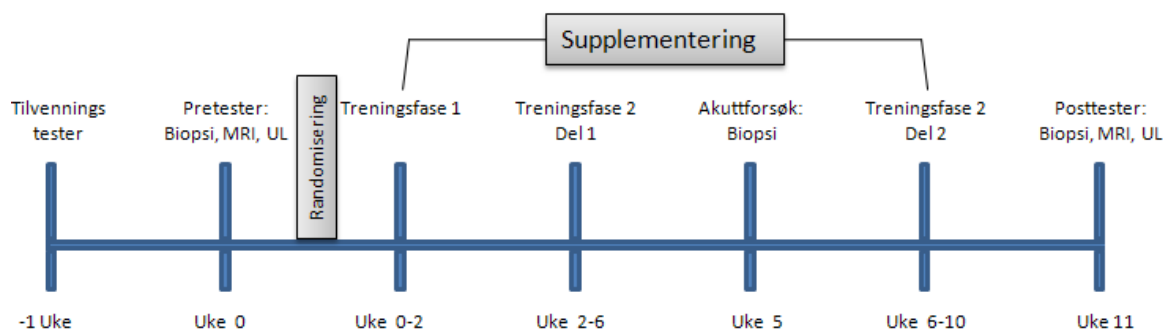
### 3.2 Supplementering:

Forsøkspersonene inntok 2 kapsler med vitamin C (250 mg per kapsel) og E ( $\alpha$ -tykoferylacetat (88 IE/ 58,8 mg per kapsel), eller placebo kapsler (cellulose og dikalsium fosfat) hver dag. Supplementene ble tatt senest 1 time før trening, og innen en time etter trening, eller morgen og kveld på dager uten trening. Ved trening utenfor treningsprogrammet ble forsøkspersonene også oppfordret til å innta kapsler før og etter treningsøkter. Den daglige dosen ble dermed 1000 mg vitamin C og 350 IE/ 235 mg vitamin E for gruppen som inntok vitamin C+E. Supplementene ble levert i nøytrale, hvite bokser, og kapslene hadde samme utseende slik at forsøkspersonene ikke kunne vite hvilket supplement de inntok. Testledere, og andre forskere som var ansvarlige for datainnsamlingen, visste ikke hva de ulike boksene inneholdt, eller hvilken gruppe forsøkspersonene tilhørte.

### 3.3 Treningsprogrammet

Forsøkspersonene gjennomførte et 10 ukers styrketreningsprogram, som hovedsakelig inndelt i to faser. Fasen 1 innebar 3-4 økter per uke i 2 uker med moderat belastning (80-90 % av 10-15 RM), og fase 2 innebar 4-5 økter per uke i 8 uker med tung belastning (6-11 RM). Fase 2 ble videre inndelt i et treningsprogram som forsøkspersonene fulgte i de første fire ukene (9-11 RM), etterfulgt av et nytt treningsprogram for de siste fire ukene (6-8 RM). Se figur 2 for en oversikt over tidsplanen i intervensjonen.

Treningsprogrammet hadde et lineært periodisert design, hvor både antall repetisjoner og pauselengder ble endret underveis i intervensjonen. Hovedhensikten med treningsprogrammet var å skape høyt metabolsk- og oksidativt stress, og samtidig stimulere til optimal muskelvekst. Se vedlegg 1 for en mer detaljert beskrivelse av øvelser, serier, repetisjoner og pauselengder i de forskjellige fasene. Forsøkspersonene fylte ut treningsdagbøker etter øktene slik at testledere kunne følge treningsutviklingen under studien. I dagbøkene krysset også forsøkspersonen av for inntak av supplement på treningsdager og treningsfrie dager. Midtveis i intervensjonen deltok 7 forsøkspersoner fra placebo- ( $\text{♀}=2$ ,  $\text{♂}=5$ ) og 6 fra C+E-vitamingruppen ( $\text{♀}=1$ ,  $\text{♂}=5$ ) i en tilleggsstudie (akutforsøket) som ga oss muligheten til å analysere biopsier. 7 forsøkspersoner fra Smartfishgruppen ( $\text{♀}=3$   $\text{♂}=4$ ) deltok også i denne tilleggsstudien.



Figur 2: Oversikt over tidsplanen i studien.

### 3.4 Estimering av muskelmasse

Muskeltykkelse og muskeltverrsnitt ble målt *in vivo* med 2D-ultral lyd og magnetresonanstomografi (MRI), mens muskelfiberareal og fibertypesammensetningen ble estimert *in vitro* ved hjelp av immunohistokjemi (se avsnitt 3.6). Alle målingene ble gjort på m. vastus lateralis før og etter treningsperioden.

#### Ultralyd - Estimering av muskeltykkelse

Ultralydmålingene ble gjort på NIH med en Philips HD11 XE (Royal Philips Electronics, Amsterdam, Nederland) og tilhørende programvare. Maskinen hadde en 50-mm lineær spekterprobe (5-12 MHz) som ble påført vinkelrett på venstre m. vastus lateralis med vannløselig gel (Dane-gel E2, Rohde products, Danmark). Målingene ble gjort ved å måle opp avstanden fra den overfladiske aponeurosen til den dype aponeurosen. Muskeltykkelsen som blir brukt i analysene er gjennomsnittet fra 3 målinger. Alle målingene ble utført av samme person med samme maskin.

#### MRI - Estimering av muskeltverrsnitt

Tverrsnittbildene av lårene ble generert med GE Signa 1.5 Tesla Echospeed (GE Medical Systems, Madison, Wisconsin, USA) på Curato Røntgen i Oslo. Det ble tatt ni snittbilder (5mm) av hvert lår, og avstanden mellom hvert snitt var 35,5 mm. Det nederste snittet ble tatt 35,5 mm over leddspalten i kneleddet. Snittet med det største tverrsnittarealet fra høyre m. vastus lateralis er benyttet i analysene. DICOM-analyseprogrammet OsiriX 3.9.3 (Pixmeo, Bernex, Sveits) ble benyttet til å måle muskeltverrsnittarealet fra MRI-bildene. Tverrsnittarealet ble kalkulert fra omkretsmålinger, som ble tegnet inn manuelt i analyseprogrammet.

### **3.5 Biopsitaking**

Forsøkspersonene instruert til å avstå fra fysisk aktivitet i minst 2, og maksimalt 4 dager, før biopsitaking. Under lokalanestesi (Xylocain) og sterile forhold ble biopsier tatt med en modifisert Bergstrøm metode i lengderetningen distalt fra m. vastus lateralis.

Biopsiene ble tatt før (høyreben), midtveis (venstreben), og etter treningsperioden (høyreben). Nålen (6mm) ble ført inn 3 ganger og ga et utbytte på ~150-300 mg vev. Post-biopsiene ble tatt 3 cm proksimalt fra pre biopsiene. Ca 50 mg muskelvev til homogenat ble fryst i isopentan, nedkjølt på tørris, og lagret i ultrafryser ved -80 °C for senere behandling og analyse. Vev til immunohistokjemiske analyser ble tilskåret rettvisklett med et barberblad og lagt i et stabiliserende lim (Tissue-tek, O.C.T. compound, Sakura, Nederland). Vevet ble deretter umiddelbart fryst i isopentan, som var forhåndsnedkjølt med flytende nitrogen (~ -190 °C), og lagret i ultrafryser ved -80 °C. Forsøkspersonene inntok tilskudd før midtveisbiopsien, men ikke før pre og post biopsien. Midtveisbiopsien ble tatt i forbindelse med akutforsøket 6 uker inn i intervensjonen. På grunn av forskningsinstitusjonens/ prosjektets ressurser og tilgjengelig tid for forsøkspersoner og testpersonell, ble det tatt midtveisbiopsier av 13 (placebo = 7, vitamin C+E = 6) av totalt 28 forsøkspersoner.

### **Homogenisering**

Muskelvev til elektroforese og western blot ble homogenisert på is. Ved homogeniseringen ble det brukt 1 ml T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo scientific, Rockford, IL, USA), 20 µl Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) og 20 µl EDTA (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) per 50 mg muskelvev. Hver prøve ble homogenisert 2 x 3-5 sekunder, eller til alt muskelvevet var løst opp. Prøvene lå 10 sekunder på is mellom hver runde med homogenisering. Etter homogeniseringen ble prøvene ristet svakt 30 minutter ved romtemperatur, og sentrifugert i 5 minutter på 1000g. Prøvene ble deretter alikvotert (~25µl) og lagt i fryser ved -80 °C.

### **3.6 Analyser av muskelvev**

#### **Totalprotein**

Total proteinkonsentrasjon i prøvene ble målt med RC DC Protein Assay kit fra BioRad (cat. no. 500-0121, Hercules, CA, USA), og med bovint  $\gamma$ -globulin som standardprotein (spekter; 0,125 til 1,5 mg•ml<sup>-1</sup>). RC DC protein-analysen er en kolorimetrisk analyse

for beregning av proteinkonsentrasjon og bygger på Lowry-metoden (Lowry et al., 1951). I denne reaksjonen reagerer peptidbindingene i proteiner med kobber under alkaliske forhold, og produserer kobberioner. Når Folin reagent tilsettes reduseres kobberionene, noe som gir en fargereaksjon fra gul til blå. Fargeintensiteten (grad av mørkhet) indikerer proteinkonsentrasjonen, som kan leses av med et fotometer og kalkuleres ut fra en standardkurve.

### **Elektroforese og western blot**

Prøvene ble forberedt ved å applisere dH<sub>2</sub>O, sample buffer og sample reducing agent (Invitrogen, Carlsbad, USA), og prøve i eget rør i henhold til utregningsmodell (vedlegg?) etter totalproteinmålingene. Deretter ble rørene satt på varmeblokk (70 °C) i 10 min. Denne prosessen reduserer proteinene slik at de får lik struktur, og kun molekylærvekten bestemmer vandringen under elektroforesen. Ferdigstøpte SDS\_PAGE geler (NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris) ble montert på elektroforesekammeret (Invitrogen XCell SureLock Midi-Cell). Indre kammer ble fylt med 175 ml running buffer og 435 µl antioksidant (Invitrogen, Carlsbad, USA) per gel, og ytre kammer med ~700 ml running buffer uten antioksidant. Proteinmarkør fra Gene-ON (Ludwigshafen, Tyskland) ble benyttet for å identifisere forskjellige molekylærvekter på membranen, og kontrollere vandring under elektroforesen. Elektroforesen ble kjørt på 200 Volt i 35-40 minutter (til proteinmarkør hadde vandret gjennom hele gelen). Ampere ble registrert ved start og mot slutten av elektroforese for å kontrollere jevn strømstyrke. Overføringen av proteinbåndene til en PVDF membran (iBlotGel Transfer Stacks PVDF, Regular, 0,2 µm, Invitrogen, Carlsbad) ble gjennomført i et tørr-blot system (iBlot Dry blotting system, Invitrogen, Carlsbad) på 20 volt i 7 minutter. Etter blotting ble membranene lagt i 5 % blokkeringsløsning (5g melkepulver per 100ml TBS-t<sup>6</sup>) over natt ved 4 °C.

Påfølgende dag ble membranene vasket i TBS-t, og inkubert i primærantistoff fortynnet i 1 % skummetmelkløsning (Se tabell 2) i 2 timer ved romtemperatur. Ved endt inkubering ble membranene vasket i TBS-t og TBS<sup>7</sup>, før inkubering i sekundærantistoff fortynnet i 1 % skummetmelkløsning (1g melkepulver per 100ml TBS-t) (Se tabell 2) i 1 timer ved romtemperatur.

---

<sup>6</sup> 10 % Tris buffered saline + 0,1 % Tween 20 + 90 % dH<sub>2</sub>O

<sup>7</sup> 10 % Tris buffered saline + 90% dH<sub>2</sub>O

Tabell 4: Primær- (1 og 2) og sekundærtstoff (3)

Antistoff	Opphav	Produsent	Art nr.	Lot nr.	Fortynning
<sup>1</sup> αB-crystallin	Mus, Monoklonalt	ENZO	SPA-222	9011032	1:4000
<sup>2</sup> HSP70	Mus, Monoklonalt	ENZO	SPA 810	8130816	1:4000
<sup>3</sup> Goat anti-mouse, horseradish peroxide linked IgG	Geit	Cell signalling	7076P2	22	1:30000

Etter inkubering med sekundærtstoff ble membranene vasket i TBS-t og TBS og inkubert med Chemiluminescent Substrate Supersignal West Dura (Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.) i 5 minutter. Proteinbåndene ble fremkalt med Kodak image station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), og analysert ved hjelp av programvaren Carestream molecular imaging (Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA).

Endringer i HSP-nivå er estimert som prosentvis endring i netintensiteten på proteinbåndene. Alle prøver ble applisert i duplikater for å bedre reliabiliteten, og endring i netintensitet er gjennomsnitt av relativ endring fra duplikatene. Analyser som viste for stor variasjon ble kjørt på nytt, og det ble da tatt gjennomsnitt av relativ endring i netintensitet fra 2 duplikater, med mindre variasjonen var på grunn av ødelagte bånd eller andre åpenbare feil. Netintensiter før treningsperioden ble normalisert ved å finne gjennomsnittsavviket for hver forsøksperson til deres respektive membrans gjennomsnittlig netintensitet. På grunn av forskjellig eksponeringstid og appliseringsmengde mellom membraner fikk vi ikke normalisert de mot det samme gjennomsnittet. Se vedlegg 2 for komplett laboratorieprosedyre.

### **Immunohistokjemi - Estimering av fiberareal og fibertypesammensetning**

Muskelvev, fryst i Tissue-tek (O.C.T. Compound, Sakura, Nederland), ble kuttet i 8 µm tykke snitt i en kryostat som holdt en temperatur på -22 °C (Leica, CM3050, Nussloch GmbH, Tyskland), og lagt på Superfrost Plus mikroskopglass (Menzel-Gläser, Brounschweig, Germany). Glassene med muskelsnittene ble deretter lagret i en ultrafryser (-80 °C) for senere analyse.

Glassene med muskelsnittene tinte i ~30 minutter før immunofluorescens prosedyren. Etter 15 minutter ble det tegnet en barriere rundt snittene med en lipidpenn for å fokusere antistoffdråpene direkte oppå snittene. Snittene ble deretter blokkert i 30 minutter av Bovine Serum Albumin (BSA). BSA ble ristet av glassene før påføring av primærantistoffene (SC71<sup>8</sup> og anti-dystrofin<sup>9</sup>). SC71 binder seg til myosin heavy chain II og merker dermed type 2 fibre, mens anti-dystrofin binder seg til dystrofin i cellemembranen, som kan brukes til å definere fiberarealet. Antistoffene ble fortynnet i BSA (SC71; 1:1000, Anti-Dystrofin; 1:500) før det ble påført snittene. Deretter ble glassene inkubert samtidig i 2 timer i fukt-kammer ved romtemperatur. Glassene ble vasket i PBS-t (phosphate buffered saline + 0,05 % Tween 20), før inklubering med sekundærantistoffene Alexa 488<sup>10</sup> og Alexa 594<sup>11</sup> (fortynning; 1:200) i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter ble glassene vasket i PBS-t, tørket, og pålagt Prolong Gold Antifade reagent (Invitrogen, California, USA) og dekkglass.

Snittene ble analysert i et lysmikroskop (Olympus BX61, Japan) med en fluoriserende lyskilde tilkoblet (EXFO, XI120PC-Q, Canada). Et digitalt kamera (Olympus DP72, Japan) var tilkoblet mikroskopet for å kunne ta bilder gjennom mikroskopet. Både kameraet og mikroskopet ble styrt av Cell<sup>^</sup>F-software (Olympus, Japan). To bilder på nøyaktig samme sted på snittene ble tatt med 4x forstørrelse, ett med Texas-red filter (dystrofin) og ett med FITS (SC-71). Bildene ble lagt oppå hverandre og behandlet med bildeprogramvaren TEMA (CheckVision, Hadsund, Danmark). TEMA analyserte arealet innenfor dystrofin-merkingen og skilte mellom lysintensiteten på SC-71-merkingen for å bestemme fibertype. Dataene fra TEMA var dermed muskelfibertypefordeling i prosent og muskelfiberareal i type I og type II fibre. TEMA filtrerer automatisk ut muskelfibre som ikke er hele, eller har unormal form. Fibre som var kuttet på skrå ble også ekskludert etter en subjektiv vurdering av bildet, ettersom fiberarealet til skråkuttete fibre blir feilaktig stort. Fiberarealet som presenteres i denne oppgaven er gjennomsnittet av økningen for begge fibertyper sammen.

---

<sup>8</sup> SC71: Monoklonalt antistoff fra mus som binder seg til myosin heavy chain II.

<sup>9</sup> Anti dystrofin: Polyklonalt antistoff fra kanin som binder seg til dystrofin (protein i cellemembranen).

<sup>10</sup> Alexa 488: Monoklonalt antistoff av mus.

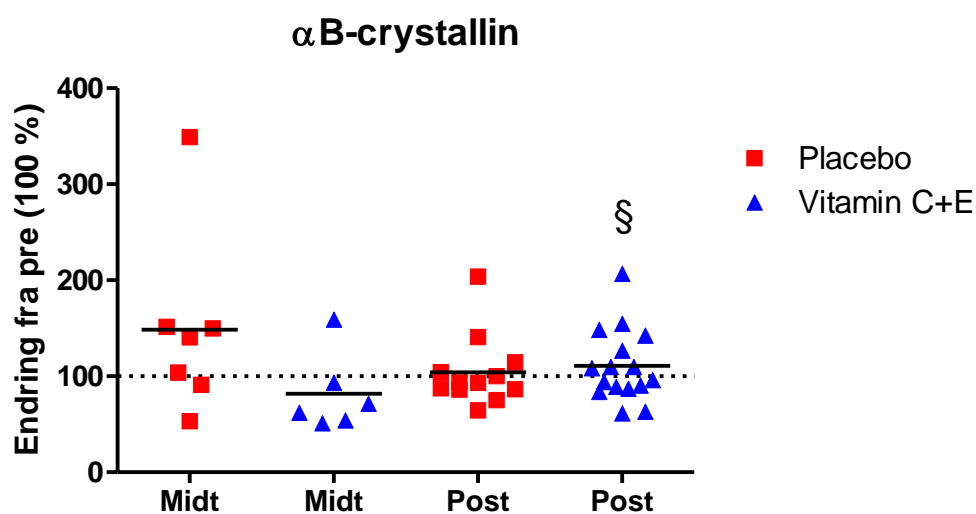
<sup>11</sup> Alexa 594: Polyklonalt antistoff av kanin.

### **3.8 Statistiske analyser**

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) ble brukt til de statistiske analysene. T-test ble benyttet til å teste statiske forskjeller, mens Pearsons korrelasjonstest ble benyttet til å teste statistiske sammenhenger. Endringer innad i gruppene ble analysert med paret t-test, mens endringer mellom gruppene ble analysert med uparet t-test. Smartfishgruppen er inkludert i analysene hvor gruppene er slått sammen eller gruppert for andre variabler enn tilskudd for å øke statistisk styrke. Signifikansnivået ble satt til  $P \leq 0,05$ . Dataene er presentert som gjennomsnittverdier  $\pm$  standardavvik.

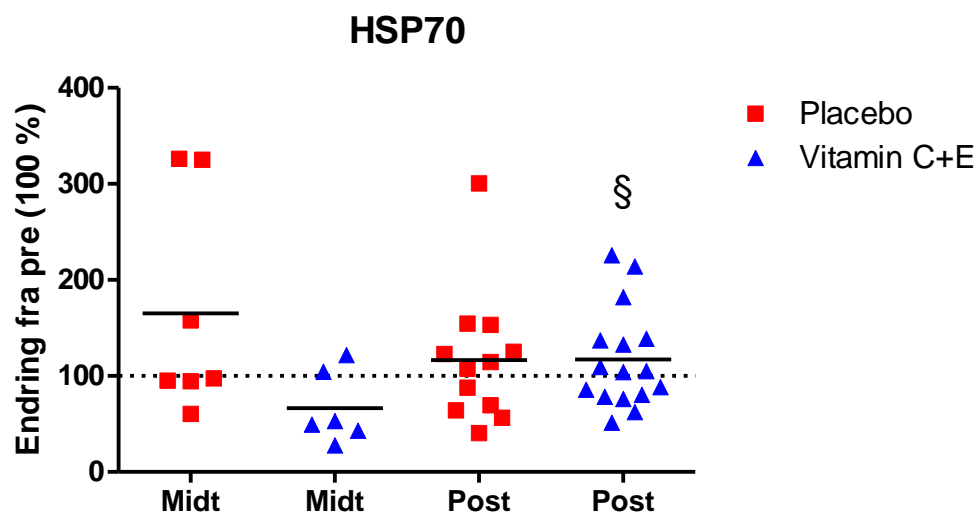
## 4.0 Resultater

Fra pre til post ble det ikke funnet noen signifikante effekter på endringer i nivåene av  $\alpha$ B-crystallin eller HSP70, hverken innad i-, eller mellom gruppene (Figur 3 og 4). Fra pre til midt var det tendenser til gruppeforskjeller på endring i HSP-nivå ( $\alpha$ B-crystallin;  $p=0,14$ , HSP70;  $p=0,07$ ) (Figur 3 og 4). Placebogruppen viste en svak tendens til økning (148 % av pre;  $p=0,23$ ) i  $\alpha$ B-crystallin-nivå fra pre til midt, mens C+E-gruppen viste en ikke signifikant nedgang (82 % av pre;  $p=0,33$ ) (Figur 3 og 4). Endringen i HSP70-nivået fra pre til midt viste en svak tendens til økning i placebogruppen (165 % av pre;  $p=0,18$ ), mens det var en tendens til nedgang i C+E-gruppen (67 % av pre;  $p=0,08$ ) (Figur 3 og 4). Fra midt til post viste C+E-gruppen en signifikant økning i  $\alpha$ B-crystallin- (141 % av midt;  $p=0,02$ ) og HSP70-nivå (185 % av midt;  $p=0,03$ ), mens placebogruppen forble uforandret/ tenderte svak til redusert  $\alpha$ B-crystallin- (91 % av midt;  $p=0,17$ ) og HSP70-nivå (98 % av midt;  $p=0,36$ ). Endringen i HSP-nivå fra midt til post var signifikant forskjellig mellom gruppene ( $\alpha$ B-crystallin;  $p=0,04$ , HSP70;  $p=0,02$ ).



Figur 3: Prosentvis endring i  $\alpha$ B-crystallin-nivå fra pre (100 %) til midt og post i placebo- og C+E-gruppen. § = signifikant forskjellig fra midt.

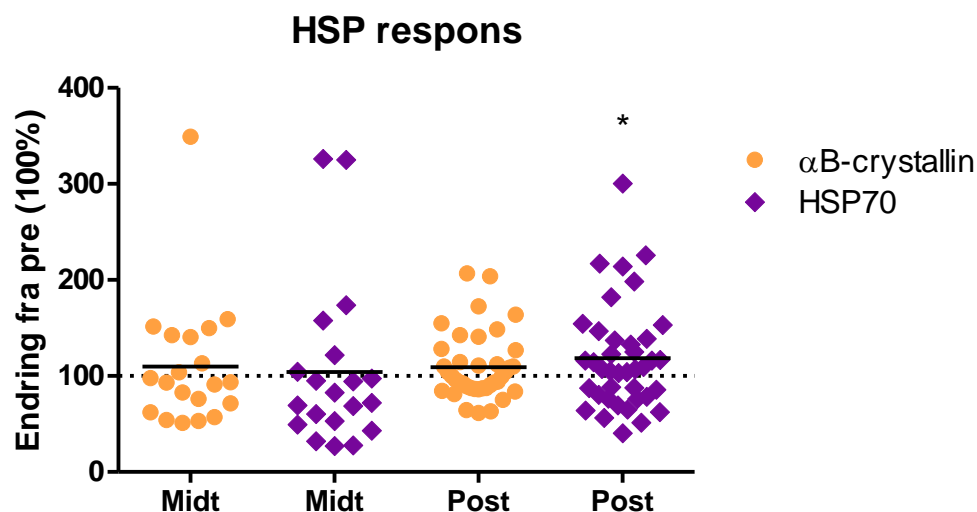




Figur 4: Prosentvis endring i HSP70-nivå fra pre (100 %) til midt og post i placebo- og C+E-gruppen. § = signifikant forskjellig fra midt.

En tredje gruppe, som inntok restitusjonsdrikken Smartfish (midt; ♀=3 ♂=4, post; ♀=5 ♂=6), er inkludert i analysene hvor gruppene er slått sammen (Figur 5 og 9) og gruppert for kjønn (Figur 6, 7 og 8).

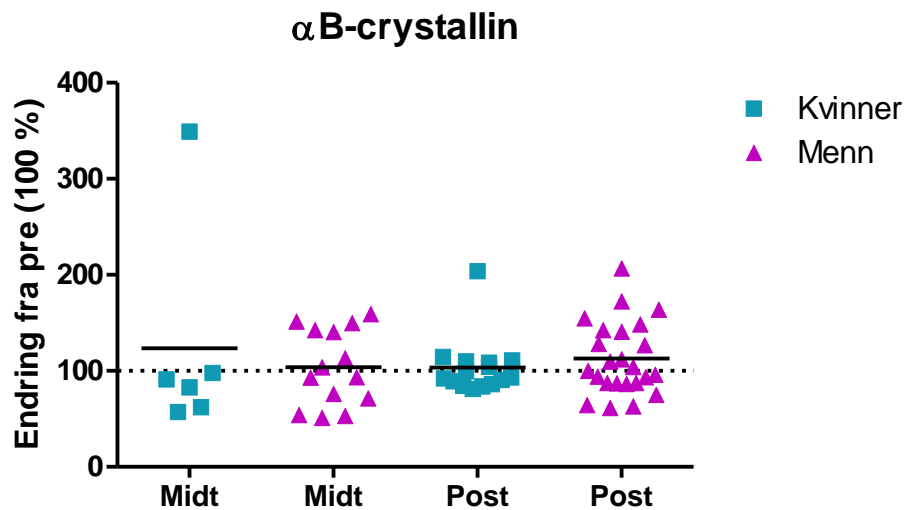
Når resultatene for placebo- og C+E-gruppen ble slått sammen med Smartfishgruppen (n=11) ble det funnet en tendens til økning i  $\alpha$ B-crystallin-nivå (109 % av pre;  $p=0,11$ ), og en signifikant økning i HSP70-nivå (119 % av pre;  $p=0,04$ ), fra pre til post (Figur 5).



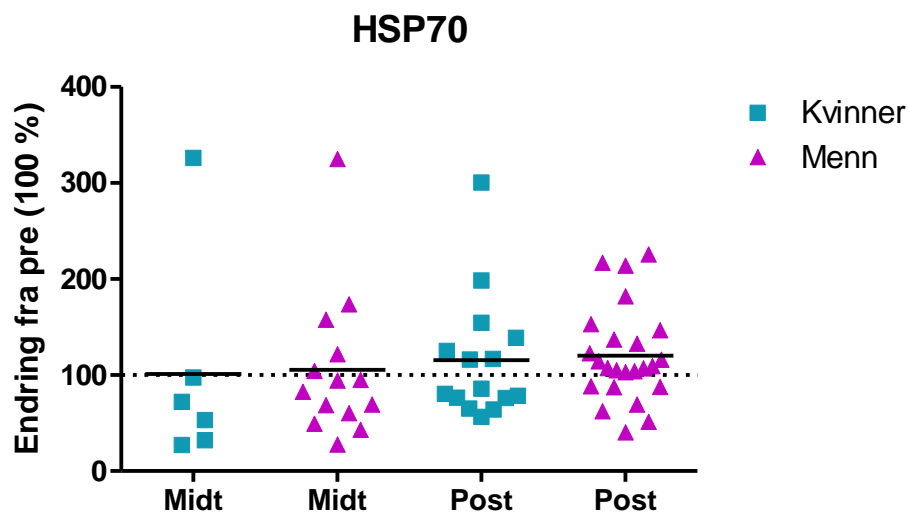
Figur 5: Prosentvis endring i  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivå fra pre (100 %) til midt (n=20) og post (n=39) for alle gruppene samlet, inkludert smartfishgruppen (midt; n=7 post; n=11). \* = Signifikant forskjellig fra pre.  $P \leq 0,05$ .

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller på endringer i HSP-nivå mellom kvinner og menn fra pre til midt eller post ( $p=0,4-0,9$ ) (Figur 6 og 7). Fra pre til post ble

det imidlertid funnet tendens til økning i HSP70- (120 % av pre,  $p=0,06$ ) og  $\alpha$ B-crystallin-nivå (113 % av pre;  $p=0,11$ ) hos menn. Disse tendensene ble ikke observert hos kvinner. Det var også tendenser til kjønnsforskjell i endring av HSP-nivå fra pre til midt ( $\alpha$ B-crystallin;  $p=0,19$ , HSP70;  $p=0,18$ ) og post ( $\alpha$ B-crystallin;  $p=0,12$ , HSP70;  $p=0,26$ ), ved ekskludering av en kvinne med spesielt stor HSP-respons.



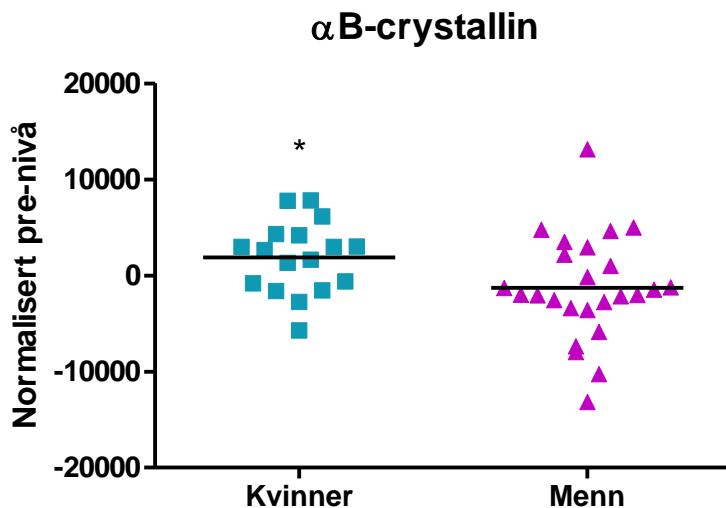
Figur 6: Prosentvis endring i  $\alpha$ B-crystallin-nivå fra pre (100 %) til midt ( $n=6♀14♂$ ) og post ( $n=15♀24♂$ ) for kvinner og menn.



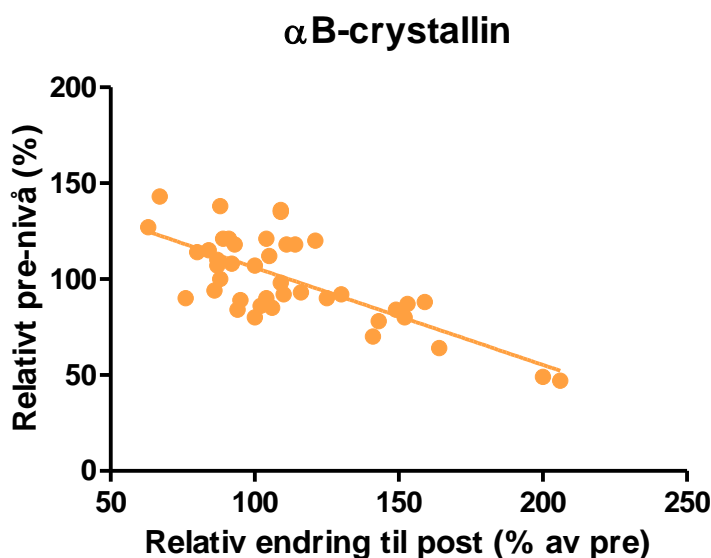
Figur 7: Prosentvis endring i HSP70-nivå fra pre (100 %) til midt ( $n=6♀14♂$ ) og post ( $n=15♀24♂$ ) for kvinner og menn.

For å normalisere  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre mellom forskjellige membraner ble det regnet ut en gjennomsnittlig nettintensitet for hver membran og deretter beregnet gjennomsnittavviket til hver forsøkspersons nettintensitet. Totalt ble 7 membraner med

5-7 forsøkspersoner per membran (2-4 ♂/♀) analysert. Kvinner hadde høyere  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre enn menn ( $p < 0,05$ ) (Figur 8), og  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre var negativt korrelert med endringen fra pre til post ( $r = -0,72$ ,  $p < 0,01$ ) (Figur 9).



Figur 8: Normalisert  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre for kvinner (n=17) og menn (n=25). 0 representerer gjennomsnittsnivået for de forskjellige membranene, mens verdiene representerer gjennomsnittsavviket. \* = Signifikant forskjellig fra menn.  $P \leq 0,05$ . Legg merke til at antall menn og kvinner er høyere enn i studien. Årsaken til det er at enkelte prøver er kjørt på nytt, og at det vil være mange feilkilder knyttet til å eliminere dem fra membranene.

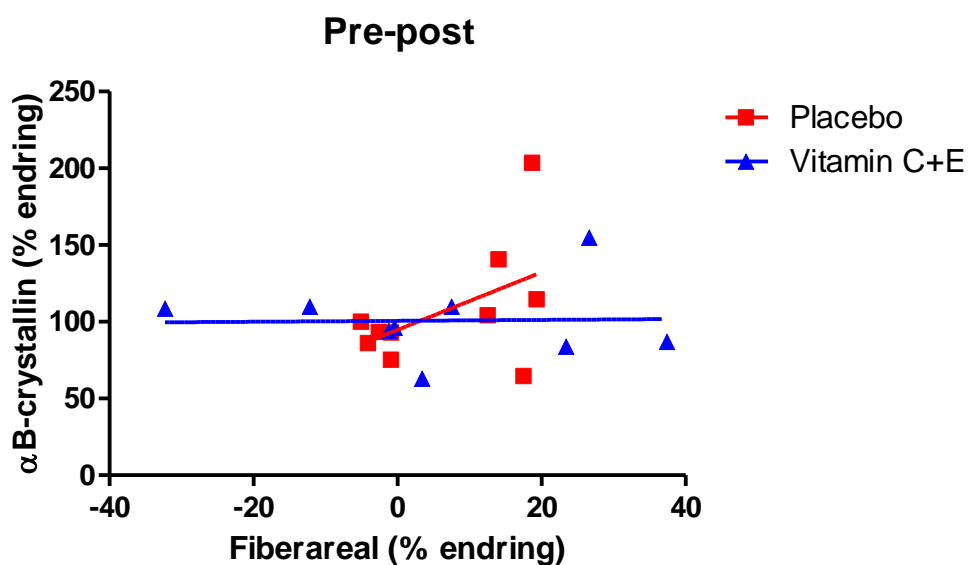


Figur 9: Korrelasjon mellom relativt  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre (% av gjennomsnitt på respektiv membran) og relativ endring til post (prosent av pre) ( $r = -0,72$ ,  $P \leq 0,01$ ). N=42 (Se figurtekst under figur 8 for forklaring).

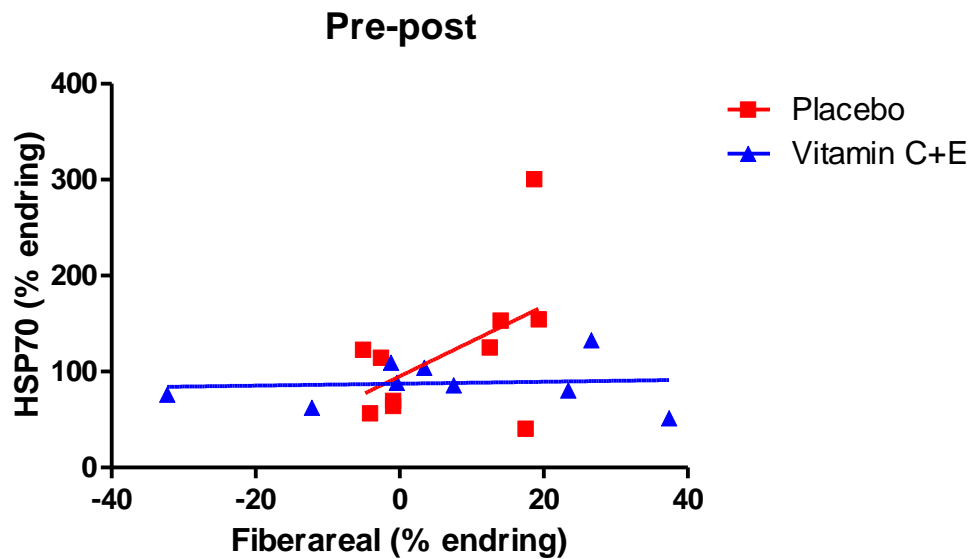
Det ble målt muskelvekst som relative endringer av fiberareal, muskeltykkelse og muskeltvernsnitsareal av m. vastus lateralis. Endring i m. vastus lateralis ble analysert

mot HSP-responsen til placebo- og C+E-gruppen fra pre til post. Se tabell 5 for relative endringer på de forskjellige parametrene for muskelvekst.

Det ble funnet en mulig korrelasjon (ikke signifikant;  $p > 0,05$ ) mellom prosentvis endring i HSP-nivå og muskelfiberareal i placebogruppen ( $\alpha$ B-crystallin;  $r = 0,49$ , HSP70;  $r = 0,50$ ) (Figur 10 og 11). I C+E-gruppen var det ingen korrelasjon mellom endring i HSP-nivå og muskelfiberareal ( $\alpha$ B-crystallin;  $r = 0,02$ , HSP70;  $r = 0,09$ ) (Figur 10 og 11).

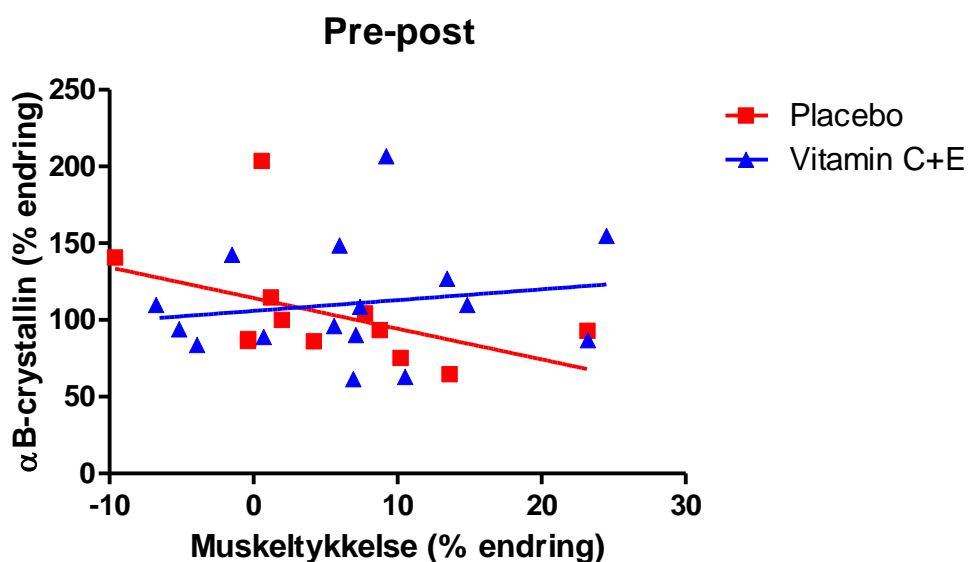


Figur 10: Korrelasjon mellom relative endringer i  $\alpha$ B-crystallin-nivå og muskelfiberareal fra pre til post i placebo- ( $r = 0,49$ ) og C+E-gruppen ( $r = 0,02$ ). Legg merke til at endring i  $\alpha$ B-crystallin-nivå presenteres som prosentvis økning fra 100, mens endring i fiberareal presenteres som prosentvis økning fra 0. 2 verdier fra placebo- og 7 fra C+E-gruppen er ekskludert pga. feil i de immunohistokjemiske analysene av fiberareal.

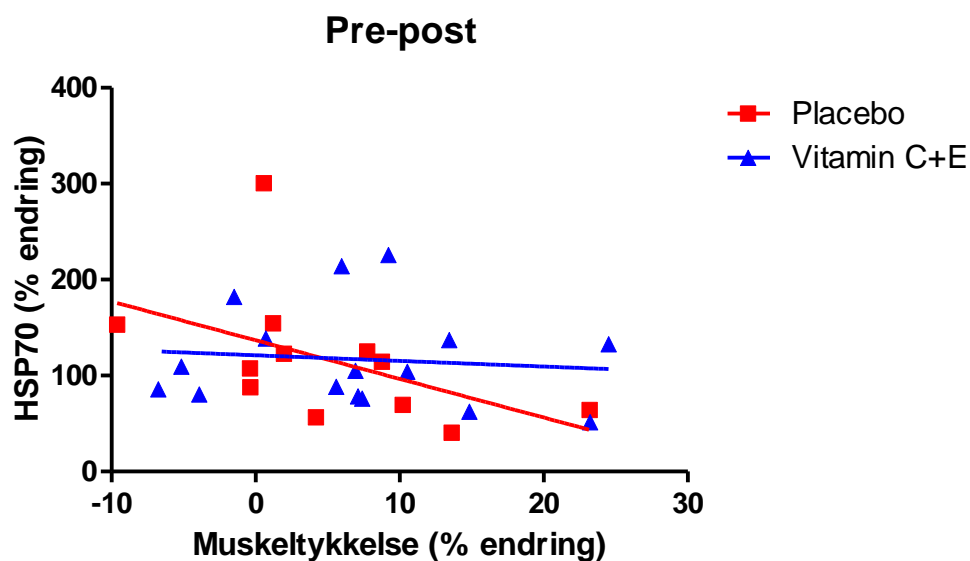


Figur 11: Korrelasjon mellom relative endringer i HSP70-nivå og muskelfiberareal fra pre til post i placebo- ( $r=0,50$ ) og C+E-gruppen ( $r=0,09$ ). Legg merke til at endring i HSP70-nivå presenteres som prosentvis økning fra 100, mens endring i fiberareal presenteres som prosentvis økning fra 0. 2 verdier fra placebo- og 7 fra C+E-gruppen er ekskludert pga. feil i de immunohistokjemiske analysene av fiberareal.

Videre ble det funnet en mulig negativ korrelasjon (ikke signifikant;  $p>0,05$ ) mellom prosentvis endring i HSP-nivå og muskeltykkelse (vastus lateralis) i placebogruppen ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=-0,45$ , HSP70;  $r=-0,49$ ) (Figur 12 og 13). I C+E-gruppen var det ingen korrelasjon mellom endring i HSP-nivå og muskeltykkelse seg ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=0,17$ , HSP70;  $r=0,10$ ) (Figur 12 og 13).



Figur 12: Korrelasjon mellom relative endringer i  $\alpha$ B-crystallin-nivå og muskeltykkelse fra pre til post i placebo- ( $r=0,45$ ) og C+E-gruppen ( $r=0,17$ ). Legg merke til at endring i  $\alpha$ B-crystallin-nivå presenteres som prosentvis økning fra 100, mens endring i muskeltykkelse presenteres som prosentvis økning fra 0.



Figur 13: Korrelasjon mellom relative endringer i HSP70-nivå og muskeltykkelse fra pre til post i placebo- ( $r=0,49$ ) og C+E-gruppen ( $r=0,10$ ). Legg merke til at endring i HSP70-nivå presenteres som prosentvis økning fra 100, mens endring i fiberareal presenteres som prosentvis økning fra 0.

Det ble ikke funnet noen signifikante korrelasjoner ( $p>0,05$ ) mellom prosentvis endring i HSP-nivå og endring i muskeltvernsnittareal i placebo- ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=0,22$ , HSP70;  $r=0,27$ ) eller C+E-gruppen ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=0,155$ , HSP70;  $r=0,021$ ) (data presenteres ikke med figur, se tabell 1 for prosentvis endring). Prosentandelen type 1 fibre ved pre korrelerte ikke med HSP-responsen fra pre til post ( $p>0,05$ ) i placebo- ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=-0,03$ , HSP70;  $r=-0,06$ ) eller C+E-gruppen ( $\alpha$ B-crystallin;  $r=0,19$ , HSP70;  $r=-0,04$ ). Relativt  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre korrelerte heller ikke med prosentandel type 1 fibre ved pre for alle gruppene samlet, inkludert Smartfishgruppen ( $p>0,05$ ;  $r=-0,25$ ).

Tabell 5: Prosentvis endring av muskelfiberareal (immunohistokjemi), muskeltykkelse (2D ultralyd) og muskeltvernsnittareal (MRI) i m. vastus lateralis fra pre til post, samt prosentandel type 1 fibre ved pre, i placebo- og C+E-gruppen. Dette er deskriptiv statistikk som utelukkende er brukt til korrelasjoner med endringer i HSP-nivå.

Gruppe	Muskelfiberareal	Muskeltykkelse	Muskeltvernsnitt	Type 1 fibre
Placebo	6,9 ( $\pm 10,3$ )	5,1 ( $\pm 8,4$ )	8,3 ( $\pm 9,0$ )	51 ( $\pm 13$ )
Vitamin C+E	13,0 ( $\pm 15,6$ )	7,0 ( $\pm 9,2$ )	9,3 ( $\pm 5,7$ )	46 ( $\pm 16$ )

## 5.0 Diskusjon

Hensikten med studien var å undersøke effekten av C+E-vitamintilskudd på  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivåene i m. vastus lateralis etter 5 og 10-12 uker med styrketrening. Det ble ikke funnet noen signifikante endringer i  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivå i noen av gruppene, eller mellom gruppene, fra før (pre) til midtveis (midt; 5 uker) eller etter (post; 10-12 uker) treningsperioden. Fra før til midtveis var det riktig nok en tendens til reduksjon i HSP70 nivåene i C+E-vitamingruppen, sammenlignet med placebogruppen. Fra midtveis økte  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivåene i C+E-vitamingruppen, og endringen var forskjellig fra placebogruppen. Etter treningsperioden var begge gruppene tilbake på et HSP-nivå som ikke var statistisk forskjellig fra utgangspunktet. Det ser derfor ut til at C+E-vitamintilskudd kan gi en forbigående reduksjon i HSP-nivåer under en styrketreningsperiode.

Når vi slår sammen placebo- og C+E-vitamingruppen og inkluderer Smartfishgruppen, var det en svak økning i HSP70- og en tendens for  $\alpha$ B-crystallin-nivå fra før til etter treningsperioden. Det ble videre observert tendenser til sterkere HSP-respons hos menn enn kvinner. Dette kan være relatert til at kvinner hadde noe høyere  $\alpha$ B-crystallin-nivå ved pre enn menn. Der ser også ut som at høye verdier før treningsperiodene forklarer en svak eller fraværende HSP-respons på treningsperioden. HSP-responsen så ikke ut til å være relatert til den observerte muskelveksten.

### 5.1 Antioksidanttilskudd og HSP-respons etter styrketrening

Resultatene kan antyde at C+E-vitamintilskudd forbigående reduserer HSP-responsen på trening. Økningen fra før til midtveis i placebogruppen og forskjellen mellom gruppene var imidlertid ikke signifikant forskjellige, og det var relativt stor variasjon i HSP-responsen, spesielt i placebogruppen. Betydelig variasjon i HSP-respons til trening har blitt observert tidligere i flere studier (Khassaf et al., 2001; Morton et al., 2006; Tupling et al., 2007). Fra før til midtveis i treningsperioden bidro enkelte forsøkspersoner, som demonstrerte stor økning, til mye av variasjonen og økningen i  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivå i placebogruppen (Figur 3 og 4). HSP-responsen fra før til midtveis ser derfor ut til å være preget av ekstremverdier i placebogruppen, mens et noe redusert  $\alpha$ B-crystallin-nivå (ikke signifikant) og tendensen til redusert HSP70-nivå i C+E-vitamingruppen viser mindre variasjon (Figur 3 og 4). Hvorvidt dette skyldes tilfeldig individuell variasjon i HSP-responsen, eller om det er en direkte effekt av C+E-

vitamintilskudd kan ikke besvares i denne studien. Fra midtveis til etter treningsperioden økte  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-nivåene i C+E-vitamingruppen, og endringen var signifikant forskjellig fra placebogrupper. Betydningen av denne forskjellen er imidlertid usikker, ettersom det ikke ble observert noen forskjeller på HSP-responsen innad i, eller mellom, gruppene fra før til etter treningsperioden. Det kan bety at C+E-vitamintilskudd i starten kan redusere HSP-nivåer hos styrketrente forsøkspersoner, men dette er en raskt forbigående effekt da nivåene er normalisert og ikke forskjellig fra placebogrupper etter 10-12 uker med styrketrening.

Studier med utholdenhetstrening antyder at tilskudd med store doser antioksidanter kan blokkere HSP-responsen etter en treningsøkt (Fischer et al., 2006; Jackson et al., 2004; Khassaf et al., 2003; Petersen et al., 2012). Imidlertid er det observert forhøyet basalnivå av HSP70 etter C-vitamintilskudd, noe som indikerer at systemet til å takle stress var forhåndsaktivert (Khassaf et al., 2003). Til kontrast førte ikke vitamin E tilskudd til forhøyet basalnivå av HSP70, men HSP70-responsen etter en økt med utholdenhetstrening ble likevel blokkert (Jackson et al., 2004). I våre forsøk synes det som nevnt ikke å være noen tegn til blokkert eller redusert HSP-respons til 10 uker med styrketrening, men etter 6 uker er det vanskelig å bedømme hva som egentlig skjer. En mulig forklaring på hvorfor antioksidanttilskudd kan redusere HSP-responsen etter en økt med utholdenhetstrening, men kanskje ikke etter styrketrening, kan være at det fysiologiske stresset ved utholdenhetstrening og styrketrening er forskjellig. Det vil si at den stressinduserte HSP-responsen kan styres av forskjellige aktiveringsmekanismer etter utholdenhetstrening og styrketrening. Morton et al. (2009) har foreslått at HSP-responsen kan initieres av redokssignallering (f. eks RONS) ved ikke-skadelig utholdenhetstrening, mens mekaniske skader på muskelproteiner og muskelstrukturer initierer HSP-responsen ved styrketrening og mer skadelige treningsformer.

Foreliggende studie kan ikke dokumentere denne påstanden, men om det er en inhibering av HSP70-responsen midtveis i C+E-vitamingruppen kan det muligens relateres til et høyere oksidativt stress innledningsvis i intervensjonen.

Treningsprogrammet var utformet med en gradvis overgang fra flere repetisjoner med moderat motstand og kortere pauselengder til færre repetisjoner med tyngre motstand og lengre pauser (se vedlegg 1). Startfasen var antageligvis derfor mer metabolsk krevende, noe som kan ha gitt høyere oksidativt stress, mens mekanisk stress kan ha vært mer dominerende mot slutten av treningsperioden. Det kan også forklare hvor C+E-



vitamingruppen økte nivåene av  $\alpha$ B-crystallin og HSP70 fra før til etter, men det forklarer imidlertid ikke tendensen til redusert HSP70-nivå fra før til midtveis i treningsperioden i denne gruppen.

I tillegg til tendensen til gruppeforskjell i HSP70-nivå etter 5 uker, var det også tendens til redusert HSP70-nivå innad i C+E-vitamingruppen. Det tyder på en direkte effekt av tilskudd på produksjonen av HSP uavhengig av trening ettersom HSP-nivåene bør forventes å være stabile når eksponering til stress (trening) er uendret. Det kan bety at C+E-vitamintilskudd forskyver redoksbalansen i ustressede celler, og at redokssignalering også er viktig for transkripsjon av HSP uavhengig av økt stress (mer/hardere trening). *In vitro* kan både C- og E-vitamin nøytralisere de fleste RONS (B. Halliwell, Gutteridge, J., 2007), som kan aktivere HSF1 (Bijur et al., 1999; Huang et al., 1994; Jacquier-Sarlin & Polla, 1996). Hvorfor denne tendensen ikke vedvarer, kan være relatert til at cellene tilvenner seg C+E-vitamintilskudd og eliminerer vitaminproduktene, eller at nivåene av endogene antioksidanter etter hvert reduseres. Studier har vist at den treningsrelaterte oppjusteringen av endogene antioksidanter kan svekkes av eksogene antioksidanttilskudd (Gomez-Cabrera et al., 2005; Khassaf et al., 2003).

Det er imidlertid viktig å påpeke at vi bare tok biopsi fra syv forsøkspersoner i placebo ( $\text{♀}=2$ ,  $\text{♂}=5$ ) og seks fra C+E-vitamingruppen ( $\text{♀}=1$ ,  $\text{♂}=5$ ), noe som kombinert med stor variasjon gir lav statistisk styrke og usikkerhet i resultatene. Det ville derfor vært interessant å vite HSP-nivåene til flere av forsøkspersonene midtveis i begge gruppene, for å få et mer oversiktlig bilde over tendensene i HSP-responsen som ble observert fra før til midtveis i treningsperioden.

## **5.2 Effekter av styrketrening på HSP-nivå og individuell variasjon i HSP-responsen**

Andre studier har rapportert forhøyede muskulære nivåer av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin etter en periode med styrketrening (Gjovaag & Dahl, 2006; Liu et al., 2004; Paulsen et al., 2012). En mulig forklaring på at vi ikke observerte noen klar økning i HSP70- og  $\alpha$ B-crystallin-nivåene kan være at forsøkspersonene i vår studie hadde erfaring med styrketrening. Ved inkludering av en tredje gruppe, som inntok restitusjonsdrikken Smartfish, observerte vi en tendens til økning i  $\alpha$ B-crystallin-nivå (109 % av før) og en signifikant økning i HSP70-nivå (119 % av før) etter treningsperioden. Mangelen på

signifikant økning fra før til etter treningsperioden i placebo- og C+E-vitamingruppen kan derfor være en type 2 feil, relatert til lavt antall forsøkspersoner og stor variasjon i HSP-responsen. På en annen side kunne sterkere statistiske tester blitt benyttet for å minimere sjansen for type 1 feil, men ettersom det er forskjellige antall verdier midtveis, i forhold til før og etter, var det ikke mulig å bruke tester som «repeated measures anova». Variasjonen i HSP-respons i den foreliggende studien kan være relatert til forskjellig grad av treningserfaring med styrketrening, ettersom inklusjonskriteriet var minst 1 økt per uke de siste 6 månedene. Det er nærliggende å tro at forsøkspersoner som eventuelt hadde trent 4-5 ganger per uke regelmessig, observerte lavere HSP-respons enn forsøkspersoner som for eksempel hadde trent bare 1 gang per uke regelmessig før intervensjonen. Årsaken til det er at bedre trente forsøkspersoner vil være vant til stresset fra trening, og flere studier viser at stressresponsen ved mer skadelige styrkeøkter (eksentrisk trening) er lavere når økten gjentas (Paulsen et al., 2009; Vissing et al., 2009). Dette blir gjerne omtalt som "the repeated bout effect".

### **5.3 Effekter av treningsstatus på HSP-respons og basale HSP-nivåer**

Sammenslåing av alle gruppene tyder på at 10-12 uker med tradisjonell styrketrening kan øke HSP70-nivå hos trente forsøkspersoner. Tidligere studier har observert en reduksjon i HSP70-nivå i m. biceps brachii etter styrketrening med veltrente utøvere (Gjovaag et al., 2006). Forskjellene kan være relatert til flere faktorer. En forklaring kan være at biopsiene er tatt fra forskjellige muskler, som kan ha forskjellige basale HSP nivåer (Paulsen et al., 2012). En annen forklaring kan være at treningserfaringen til styrketrente forsøkspersoner kan variere. Det er en mulighet at utvalget i vår studie hadde mindre treningserfaring, ettersom det ikke ble observert økning av HSP-nivå i Gjovaag et al. (2006). Noe forskjellig erfaring med styrketrening i vår studie kan derfor kanskje forklare noe av variasjonen i HSP-responsen, og dette støttes av den negative korrelasjonen mellom basalt  $\alpha$ B-crystallin-nivå før og prosentvis endring fra før til etter treningsperioden. Negativ korrelasjon mellom HSP70-nivå før og endringen etter styrketrening er observert tidligere (Gjovaag & Dahl, 2006). Det beviser riktignok ikke at de med høye preverdier hadde mer erfaring med styrketrening, men studier på utholdenhetstrente menn har vist at de uttrykker høyere basalnivå av  $\alpha$ B-crystallin enn utrente (Morton et al., 2008), og at trente ikke opplever samme HSP-respons etter en økt med utholdenhetstrening (Morton et al., 2008; Nething, Wang, Liu, Lormes, & Steinacker, 2004). I tillegg er det flere studier som finner forhøyet HSP-nivå etter en

periode med styrketrening (Gjovaag & Dahl, 2006; Liu et al., 2004; Paulsen et al., 2012), og redusert HSP-respons når en eksentrisk styrketreningsøkt gjentas (Paulsen et al., 2009; Vissing et al., 2009). Subjektive vurderinger av proteinbånd, virker også å støtte påstanden om at høye basale HSP nivåer kan gi lavere HSP-respons, mens lave basale nivåer kan gi større HSP-respons etter trening (Khassaf et al., 2001; Morton et al., 2006). Det ser ut til at høye basalnivåer av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin er relatert til mindre HSP-respons etter styrketrening. Å relatere basale HSP-nivåer før med endringer etter en treningsperiode medfører imidlertid noen potensielle feilkilder. Dersom verdien før eller etter blir kunstig høy eller lav vil den andre verdien gå i motsatt retning, og derfor styrke en negativ korrelasjon mellom verdiene. Prinsippet om at ekstreme verdier vil nærme seg gjennomsnittsverdiene når man foretar flere analyser på disse forsøkspersonene er kjent som «Regression towards the mean».

#### **5.4 Kjønnforskjeller i HSP-respons og basale HSP-nivåer**

Morton et al., (2009) observerte forhøyet  $\alpha$ B-crystallin-nivå etter en periode med utholdenhetstrening hos menn, men ikke hos kvinner. Vår studie gir ikke direkte grunnlag for å bekrefte om dette også gjelder for styrketrening, men det var en sterkere tendens til forhøyet nivå av HSP70 og  $\alpha$ B-crystallin fra før til etter treningsperioden hos menn enn hos kvinner. Tolkningen av resultatene kompliseres imidlertid av at en kvinne hadde spesielt stor respons i både  $\alpha$ B-crystallin- (midtvies; 349 % av før, etter; 204 % av før) og HSP70-nivå (midtveis; 326 % av før, etter; 301 % av før). Ved ekskludering av denne forsøkspersonen var det svake tendenser til forskjell i  $\alpha$ B-crystallin- og HSP70-respons mellom kvinner og menn fra før til midtveis og etter treningsperioden. Med unntak av denne forsøkspersonen var det eksempelvis ingen kvinner som observerte forhøyet  $\alpha$ B-crystallin-nivå fra før til etter (Figur 6). Dog er det en studie som har funnet forhøyet HSP70-nivå etter en styrketreningsperiode med en skjevfordeling av utvalget til kvinnelig fordel ( $\text{♀}$ =20,  $\text{♂}$ =12) (Gjovaag & Dahl, 2006). Dette viser at det er mulig å indusere HSP-responsen hos kvinner med styrketrening, men i motsetning til i den foreliggende studien var forsøkspersonene i studien til Gjovaag & Dahl (2006) utrente.

Studier på rotter har vist mindre HSP70-respons i skjelettmuskulatur etter en treningsøkt hos hunnrotter (Paroo et al., 2002), og at HSP70-responsen etter økten kan være relatert til kjønnshormoner som østrogen (Paroo et al., 2002) og testosteron (Milne et al., 2006). Testosteron ser ut til å være essensielt for den observerte HSP-responsen etter en

treningsøkt hos hannrotter (Milne et al., 2006), mens østrogen ser ut til å svekke responsen hos hunnrotter (Paroo et al., 2002). En treningsperiode kan imidlertid forhøye HSP70-nivå også hos hunnrotter (Chicco, et al., 2006; Demirel, et al., 1998, 2001; Taylor, et al., 1999; Thorp, et al., 2007) i: (Noble et al., 2008), og det kan være relatert til at østrogennivåene varierer. Upubliserte data fra Milne & Noble (2008) viser at østrogennivå før en treningsøkt har et inverst forhold til HSP70-nivå etter økten (Noble et al., 2008). De direkte mekanismene bak kjønnsforskjellene i HSP-responsen ser ikke ut til å være avdekket, men Noble et al. (2008) spekulerer i at testosteron kan forsterke det treningsrelaterte stresset, mens østrogen kan begrense det.

En mulig årsak til effektene av østrogen er at østrogentilskudd ser ut til å forhøye HSP70-nivåene i skjelettmuskulatur hos hunnrotter (Bombardier et al., 2009), og dermed svekke behovet for HSP-responsen. På lik linje fører fjerning av ovariene, som er den største kilden til østrogenproduksjon, til redusert HSP70-nivå i hjertet til hunnrotter (Voss et al., 2003). En eventuell kjønns spesifikk forskjell i HSP-responsen etter styrketrening kan derfor skyldes forskjellig utgangspunkt, og vi observerte høyere basalnivå av  $\alpha$ B-crystallin hos kvinner enn hos menn før treningsperioden.

Kjønnsforskjeller i HSP-respons til trening ser dermed ut til å kunne relateres til en kombinasjon av til testosteron og østrogen, mens forskjeller i basale HSP-nivåer kan være relatert til at østrogen stimulerer transkripsjon av HSP. Testosteronproduksjon ser ut til å være essensielt for HSP-responsen etter trening hos menn, mens østrogen kan være en medvirkende årsak til høyere basalnivåer av HSP og dermed redusert respons etter trening hos kvinner. Det er mulig at østrogen aktiverer cellebeskyttende systemer (F. eks. HSP og endogene antioksidanter), slik at det er et forhåndsaktivert system som møter stresset etter trening. Eventuelle forskjeller i HSP-responsen og basale  $\alpha$ B-crystallin-nivåer mellom kvinner og menn bør imidlertid tolkes med varsomhet ettersom utvalget er skjevfordelt (midt = 6♀ 14♂, post = 15♀, 24♂), og metoden for å normalisere  $\alpha$ B-crystallin-nivåer medfører potensielle feilkilder (se 5.6 metodekritikk).

## **5.5 Forhold mellom HSP-respons og muskelvekst og fibertypesammensetning**

Styrketrening øker muskelmasse og nivået av enkelte HSP. I tillegg til den antatte rollen i remodelleringsprosessen etter skader på muskelcellestrukturer (Paulsen et al., 2012), kan enkelte HSP også være en del av remodellering av muskelceller ved

hypertrofi (Huey, 2006). Relative endringer i HSP-nivåer syntes imidlertid ikke å være relatert til relative endringer i muskelmasse i vår studie, med unntak av en svak positiv korrelasjon med endring i fiberareal, og en svak negativ korrelasjon med endring i muskeltykkelse i placebogruppen fra før til etter treningsperioden. Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom relative endringer i HSP-nivå og muskeltvernsnittareal fra MRI, som er målemetoden med minst potensielle feilkilder i foreliggende studie. Ettersom eventuelle sammenhenger er svake i placebogruppen og fraværende i vitamin C+E-gruppen, ser det ikke ut til at det er noen direkte sammenheng mellom endring i  $\alpha$ B-crystallin og HSP70-nivå, og muskelvekst. Dette støttes også av en tidligere studie, som ikke fant noen sammenheng mellom HSP-responsen og muskelvekst etter styrketrening (Paulsen et al., 2011). Hvorfor HSP-responsen ikke synes å være relatert til muskelvekst kan være relatert til at bestemte HSP har forskjellige funksjoner, og at størrelsen på HSP-responsen ikke samsvarer med muskelvekst fordi økningen i HSP også er relatert til andre prosesser.

Hypertrofi etter overbelastning av muskler i rotters bakben kan imidlertid være relatert til HSP25-responsen (HSP27 hos mennesker), og antyder at HSP25 er en del av remodelleringsprosessen ved muskelvekst (Huey, 2006). Studier på mus har vist at overproduksjon av HSP70 medfører mindre tap av muskelmasse og funksjon ved muskelsykdommer (Gehrig et al., 2012), og gir raskere gjenvinning av muskelmasse og funksjon etter gjenervelse fra immobilisering (Miyabara et al., 2012). Interessant nok ser overproduksjon av HSP70 også ut til å redusere muskelmasse (McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). Det kan være relatert til at HSP70 stabiliserer MKP-1 (Zheng et al., 2006) som inhiberer viktige signalveier for proteinsyntese (ERK, JNK og p38) (Shi et al., 2009). Det bør presiseres at denne funksjonen til HSP70 er funnet i hjertemuskulatur, men det er observert at MKP-1 også har atrofiske effekter på skjelettmuskulatur (Shi et al., 2009). Overproduksjonen av HSP70 fremstilles med genmanipulasjon eller farmakologisk induksjon, og nivåene er derfor ikke sammenlignbare med HSP-responsen til trening. Etter en økt med styrketrening ser det derimot ut til at aktiveringen av ERK og JNK er relatert til HSP70-responsen, noe som antyder at de kanskje kan ha samme aktiveringsmekanisme (Thompson et al., 2003).

Basert på disse studiene ser det ikke ut til at HSP-responsen etter styrketrening er relatert til graden av muskelvekst hos mennesker, men hos gnagere ser det ut til at overproduksjon HSP70 har motstridende roller. Man kan kanskje tenke at HSP70 er

involvert i regulering av muskelvekst, slik at HSP70 kan beskytte mot både atrofi og ugunstig hypertrofi. En mulighet er at normale økninger i HSP70, som kan observeres etter styrketrening, kan sørge for kontrollert hypertrofi, mens overproduksjon av HSP70 kan stimulere til atrofi.

Det er også observert høyere økning av HSP70-nivå i type 1 fibre enn type 2 fibre etter en økt med styrketrening, uten noen forskjeller i basale HSP70-nivåer (Tupling et al., 2007). Vi har ikke målt HSP-nivå i de forskjellige fibertypene direkte, men fibertypesammensetningen før var ikke relatert til basalt  $\alpha$ B-crystallin-nivå eller HSP-responsen etter treningsperioden.

## 5.6 Metodekritikk

Western blot metoden for å analysere proteinnivå innebærer en del potensielle feilkilder. Det stiller en rekke krav til analysepersonens struktur og nøyaktighet. Små feil i applisering av prøve kan gi utslag i en relativt sensitiv analysemetode. Vi har applisert duplikater av alle prøver og kjørt prøver med stor variasjon på nytt. Det kontrollerer for appliseringsfeil i brønner på gel, men ikke for pipetteringsfeil i preparering av prøverørerne. Prøver som ble kjørt igjen syntes imidlertid å vise lik ( $\pm 20\%$ ) endring som forrige kjøring, noe som antyder at hele prosessen var relativt reliabel. Det er observert en god korrelasjon ( $r = 0,91$ ) mellom resultatene fra western blotting og ELISA (Voss et al., 2003), som er en mer sensitiv og lettere kvantifiserbar metode for estimering av HSP-nivå (Paulsen et al., 2012). Det tar imidlertid ikke bort viktigheten av å gjøre godt laboratoriearbeid i begge metodene for å få troverdige resultater. Vi kunne dessverre ikke normalisere intensiteten på proteinbåndene fra forskjellige membraner direkte på grunn av forskjellig eksponeringstid og appliseringsmengde. Derfor normaliserte vi båndintensitetene i forhold til gjennomsnittlig båndintensitet på deres respektive membran. Det gjør at sammenligningene ikke er basert på det samme gjennomsnittet, og resultatene bør derfor tolkes noe forsiktig. Ettersom det var fem til syv forsøkspersoner per membran og tre forskjellige grupper i studien, var det ikke mulig å analysere eventuelle forskjeller i basale HSP-nivåer mellom gruppene før treningsperioden. Dette gjelder imidlertid bare sammenligninger av båndintensiteter ved utgangspunktet, ettersom de andre analysene ble gjort på relative endringer, og samme forsøksperson ble kjørt på samme gel under like forhold.

Biopsitaking representerer et stress og en muskel ødeleggelse, og danner derfor også en potensiell feilkilde for analysering av HSP-nivåer. En studie har vist at flere muskelbiopsier kan bli tatt fra samme muskel uten å øke HSP70-nivået (Khassaf et al., 2001).

Dessverre var det betydelig frafall i denne studien (30 %), og dette reduserer den statistiske styrken til å finne eventuelle effekter av C+E-vitamintilskudd på HSP-responsen. Det førte også til en skjevfordeling i antall forsøkspersoner og kjønn mellom gruppene (Se tabell 1). En del av frafallet var relatert til skader utenom intervensjonen, noe som dessverre kan skje og ikke kan kontrolleres for. For mange treningsøkter utenom treningsprogrammet og for lav gjennomføring av treningsøkter i treningsprogrammet, førte også til ekskludering av forsøkspersoner. Akutforsøket som gav oss midtveisverdier for noen av forsøkspersonene, krevde en betydelig bruk av ressurser til biopsitaking og behandling av muskelprøver, blodprøvetakning, preparering og indusering av stabile isotoper, og assistanse ved treningsøkten. Derfor var det mindre kapasitet til å inkludere forsøkspersoner til akutforsøket midtveis i intervensjonen, samt mindre interesse blant forsøkspersonene for å delta i akutforsøket under en tidkrevende intervensjon.

## Konklusjon

Den foreliggende studien avdekker ingen tydelige effekter av C+E-vitamintilskudd på nivåene av  $\alpha$ B-crystallin og HSP70 i m. vastus lateralis ved styrketrening. Det ble imidlertid observert en tendens til en forbigående reduksjon i HSP70-nivå (og  $\alpha$ B-crystallin) i C+E-vitamingruppen etter 5 uker. Videre forskning må derfor gjøres for å avdekke hvorvidt effekten av antioksidanttilskudd på HSP-responsen er sterkest innledningsvis i en styrketreningsperiode. Den foreliggende studien støtter andre studier som har funnet økning i HSP70-nivå etter tradisjonell styrketrening (Gjovaag & Dahl, 2006; Paulsen et al., 2012), og viser videre at det er mulig å inducere en HSP70-respons hos godt styrketrente forsøkspersoner. Resultatene fra foreliggende studie støtter også studier som har funnet redusert HSP-respons etter en periode med styrketrening hos forsøkspersoner med høyt basalnivå (Gjovaag & Dahl, 2006). HSP-responsen til styrketrening synes å være sterke hos menn, og det kan være relatert til høyere basalverdier hos kvinner. Muskelvekst så ikke ut til å være relatert til HSP-responsen i denne studien.



## Referanser:

- Adhihetty, P. J., Ljubcic, V., Menzies, K. J., & Hood, D. A. (2005). Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289 (4): C994-C1001.
- Ahn, S. G., & Thiele, D. J. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev*, 17(4): 516-528.
- Atkinson, J., Harroun, T., Wassall, S. R., Stillwell, W., & Katsaras, J. (2010). The location and behavior of alpha-tocopherol in membranes. *Mol Nutr Food Res*, 54 (5): 641-651.
- Atomi, Y., Yamada, S., Strohman, R., & Nonomura, Y. (1991). Alpha B-crystallin in skeletal muscle: purification and localization. *J Biochem*, 110 (5): 812-822.
- Bijur, G. N., Davis, R. E., & Jope, R. S. (1999). Rapid activation of heat shock factor-1 DNA binding by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and modulation by glutathione in human neuroblastoma and Alzheimer's disease cybrid cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 71 (1): 69-77.
- Blomhoff, R. (2004). Antioksidanter og oksidativt stress. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 124 (12): 1643-1645.
- Blomhoff, R. (2005). Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 16 (1): 47-54.
- Bombardier, E., Vigna, C., Iqbal, S., Tiidus, P. M., & Tupling, A. R. (2009). Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus. *J Appl Physiol*, 106 (6): 2009-2015.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300 (2): 535-543.
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10(1-2), 125-140.
- Feasson, L., Stockholm, D., Freyssenet, D., Richard, I., Duguez, S., Beckmann, J. S., & Denis, C. (2002). Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*, 543 (Pt 1): 297-306.
- Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjoberg, L. B., Febraio, M.A., Pedersen, B. K. (2006). Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. *J Appl Physiol*, 100 (5): 1679-1687.
- Gabai, V. L., & Sherman, M. Y. (2002). Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol*, 92 (4): 1743-1748.

- Gehrig, S. M., van der Poel, C., Sayer, T. A., Schertzer, J. D., Henstridge, D. C., Church, J. E., . . . Lynch, G. S. (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature*, 484 (7394): 394-398.
- Gjovaag, T. F., & Dahl, H. A. (2006). Effect of training and detraining on the expression of heat shock proteins in m. triceps brachii of untrained males and females. *Eur J Appl Physiol*, 98 (3): 310-322.
- Gjovaag, T. F., Vikne, H., & Dahl, H. A. (2006). Effect of concentric or eccentric weight training on the expression of heat shock proteins in m. biceps brachii of very well trained males. *Eur J Appl Physiol*, 96 (4): 355-362.
- Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L., & Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567 (Pt 1): 113-120.
- Gomez-Cabrera, M. C., Ristow, M., & Vina, J. (2012). Antioxidant supplements in exercise: worse than useless? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302 (4): E476-477.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141 (2): 312-322.
- Halliwell, B. (2012a). The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 1365-2125.
- Halliwell, B. (2012b). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70 (5): 257-265.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18 (1): 125-126.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4 ed.). New York: Oxford University Press Inc.
- Howard, A. C., McNeil, A. K., & McNeil, P. L. (2011). Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat Commun*, 2: 597.
- Hsu, J. T., Hsieh, Y. C., Kan, W. H., Chen, J. G., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., . . . Chaudry, I. H. (2007). Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in estrogen-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292 (6): H2982-2987.
- Huang, L. E., Zhang, H., Bae, S. W., & Liu, A. Y. (1994). Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 269 (48): 30718-30725.
- Huey, K. A. (2006). Regulation of HSP25 expression and phosphorylation in functionally overloaded rat plantaris and soleus muscles. *J Appl Physiol*, 100 (2): 451-456.
- Jackson, M. J., Khassaf, M., Vasilaki, A., McArdle, F., & McArdle, A. (2004). Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Ann N Y Acad Sci*, 1031: 158-168.

- Jackson, M. J., Papa, S., Bolanos, J., Bruckdorfer, R., Carlsen, H., Elliott, R. M., . . . Astley, S. B. (2002). Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med*, 23 (1-3): 209-285.
- Jacquier-Sarlin, M. R., & Polla, B. S. (1996). Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin. *Biochem J*, 318 ( Pt 1): 187-193.
- Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 23: 135-166.
- Kavazis, A. N., Talbert, E. E., Smuder, A. J., Hudson, M. B., Nelson, W. B., & Powers, S. K. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med*, 46 (6): 842-850.
- Khassaf, M., Child, R. B., McArdle, A., Brodie, D. A., Esanu, C., & Jackson, M. J. (2001). Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol*, 90 (3): 1031-1035.
- Khassaf, M., McArdle, A., Esanu, C., Vasilaki, A., McArdle, F., Griffiths, R. D., . . . Jackson, M. J. (2003). Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*, 549 (Pt 2): 645-652.
- Koh, T. J. (2002). Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exerc Sport Sci Rev*, 30 (3): 117-121.
- Kramer, H. F., & Goodyear, L. J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 103 (1): 388-395.
- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005). Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. *Exerc Immunol Rev*, 11: 46-52.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., & Schneider, R. J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, 284 (5413): 499-502.
- Liu, Y., Lormes, W., Wang, L., Reissnecker, S., & Steinacker, J. M. (2004). Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol*, 91 (2-3): 330-335.
- Locke, M. (1997). The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exerc Sport Sci Rev*, 25, 105-136.
- McArdle, A., Dillmann, W. H., Mestrl, R., Faulkner, J. A., & Jackson, M. J. (2004). Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J*, 18 (2): 355-357.
- Milne, K. J., Thorp, D. B., Melling, C. W., & Noble, E. G. (2006). Castration inhibits exercise-induced accumulation of Hsp70 in male rodent hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290 (4): H1610-1616.

- Miyabara, E. H., Nascimento, T. L., Rodrigues, D. C., Moriscot, A. S., Davila, W. F., Aitmou, Y., . . . Mestril, R. (2012). Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. *Pflugers Arch*, 463 (5): 733-741.
- Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259 (5100): 1409-1410.
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, 12 (24): 3788-3796.
- Morrison, L. E., Whittaker, R. J., Klepper, R. E., Wawrousek, E. F., & Glembotski, C. C. (2004). Roles for alphaB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (3): H847-855.
- Morton, J. P., Holloway, K., Woods, P., Cable, N. T., Burniston, J., Evans, L., . . . McArdle, A. (2009). Exercise training-induced gender-specific heat shock protein adaptations in human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 39 (2): 230-233.
- Morton, J. P., Kayani, A. C., McArdle, A., & Drust, B. (2009). The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. [Review]. *Sports Med*, 39 (8): 643-662.
- Morton, J. P., MacLaren, D. P., Cable, N. T., Bongers, T., Griffiths, R. D., Campbell, I. T., . . . Drust, B. (2006). Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *J Appl Physiol*, 101 (1): 176-182.
- Morton, J. P., Maclaren, D. P., Cable, N. T., Campbell, I. T., Evans, L., Kayani, A. C., . . . Drust, B. (2008). Trained men display increased basal heat shock protein content of skeletal muscle. [Comparative Study]. *Med Sci Sports Exerc*, 40 (7): 1255-1262.
- Mounier, N., & Arrigo, A. P. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*, 7 (2): 167-176.
- Moylan, J. S., & Reid, M. B. (2007). Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*, 35 (4): 411-429.
- Nething, K., Wang, L., Liu, Y., Lormes, W., & Steinacker, J. M. (2004). Blunted HSP70 Response to Acute Exercise in Well-Trained Skeletal Muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36 (5): 318.
- Neufer, P. D., Ordway, G. A., & Williams, R. S. (1998). Transient regulation of c-fos, alpha B-crystallin, and hsp70 in muscle during recovery from contractile activity. *Am J Physiol*, 274 (2 Pt 1): C341-346.
- Noble, E. G., Milne, K. J., & Melling, C. W. (2008). Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33 (5): 1050-1065.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr*, 53 (4 Suppl): 1050S-1055S.

- Packer, L., Weber, S. U., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr*, 131 (2): 369S-373S.
- Paroo, Z., Dipchand, E. S., & Noble, E. G. (2002). Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282 (2): C245-251.
- Pattwell, D. M., & Jackson, M. J. (2004). Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 32 (1): 14-18.
- Paulsen, G., Hanssen, K. E., Ronnestad, B. R., Kvamme, N. H., Ugelstad, I., Kadi, F., & Raastad, T. (2012). Strength training elevates HSP27, HSP70 and alphaB-crystallin levels in musculus vastus lateralis and trapezius. *Eur J Appl Physiol*, 112 (5): 1773-1782.
- Paulsen, G., Lauritzen, F., Bayer, M. L., Kalhovde, J. M., Ugelstad, I., Owe, S. G., . . . Raastad, T. (2009). Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J Appl Physiol*, 107 (2): 570-582.
- Paulsen, G., Vissing, K., Kalhovde, J. M., Ugelstad, I., Bayer, M. L., Kadi, F., . . . Raastad, T. (2007). Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293 (2): R844-853.
- Peternej, T. T., & Coombes, J. S. (2011). Antioxidant Supplementation during Exercise Training: Beneficial or Detrimental? *Sports Med*. 41 (12):1043-69.
- Petersen, A. C., McKenna, M. J., Medved, I., Murphy, K. T., Brown, M. J., Della Gatta, P., & Cameron-Smith, D. (2012). Infusion with the antioxidant N-acetylcysteine attenuates early adaptive responses to exercise in human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 204 (3): 382-392.
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & DeRuisseau, K. C. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (2): R337-344.
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & McClung, J. M. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 102 (6): 2389-2397.
- Powers, S. K., Talbert, E. E., & Adhietty, P. J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*, 589 (Pt 9): 2129-2138.
- Samali, A., & Orrenius, S. (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 3 (4): 228-236.
- Schurks, M., Glynn, R. J., Rist, P. M., Tzourio, C., & Kurth, T. (2010). Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 341, c5702.
- Shi, H., Scheffler, J. M., Zeng, C., Pleitner, J. M., Hannon, K. M., Grant, A. L., & Gerrard, D. E. (2009). Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296 (5): C1040-1048.

- Stice, J. P., & Knowlton, A. A. (2008). Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. *Mol Med*, 14 (7-8): 517-527.
- Thompson, H. S., Clarkson, P. M., & Scordilis, S. P. (2002). The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol Scand*, 174 (1): 47-56.
- Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., & Scordilis, S. P. (2003). Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 178 (1): 61-72.
- Thompson, H. S., Scordilis, S. P., Clarkson, P. M., & Lohrer, W. A. (2001). A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 171 (2): 187-193.
- Tupling, A. R., Bombardier, E., Stewart, R. D., Vigna, C., & Aquilino, A. E. (2007). Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *J Appl Physiol*, 103 (6): 2105-2111.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M. C., Faure, A., . . . Fardeau, M. (1998). A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20 (1): 92-95.
- Vissing, K., Bayer, M. L., Overgaard, K., Schjerling, P., & Raastad, T. (2009). Heat shock protein translocation and expression response is attenuated in response to repeated eccentric exercise. *Acta Physiol (Oxf)*, 196 (3): 283-293.
- Voegeli, T. S., Wintink, A. J., Chen, Y., & Currie, R. W. (2008). Heat shock proteins 27 and 70 regulating angiotensin II-induced NF-kappaB: a possible connection to blood pressure control? *Appl Physiol Nutr Metab*, 33 (5): 1042-1049.
- Voss, M. R., Stallone, J. N., Li, M., Cornelussen, R. N., Knuefermann, P., & Knowlton, A. A. (2003). Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285 (2): H687-692.
- Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, 72 (4): 1063-1081.
- Zheng, Y., Im, C. N., & Seo, J. S. (2006). Inhibitory effect of Hsp70 on angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Exp Mol Med*, 38 (5): 509-518.

## 6.0 Vedlegg 1

### Treningsprogram fase 1: 3-4 økter per uke i 2 uker

Motstand økt 1			Motstand økt 2			Motstand 1RM-økt		
10-15 reps (80-90% av RM)			10-15 reps (80-90% av RM)			12(50%)+8(60%)+3-6(80%)+1-2(90%)+1(maks)+1(maks)+maks antall på 70%		
Pause (min) økt 1		Pause (min) økt 2		Pause (min) 1RM-økt				
1 (minimum 0.5, maks 2)		1 (minimum 0.5, maks 2)		3				
økt 1	Serier	Kommentar	økt 2	Serier	Kommentar	1RM-økt	Serier	Kommentar
Benkpress	2		Skråbenk	2		Benkpress	7	
			Pullover	2	Lett motstand (20 RM)			
Skulderpress m/hantler stående	2		Sidehev	2				
Triceps, pushdown	1+1+1	Begge armer + én og én arm						
Sittende roing, smalt tak	2							
Nedtrekk foran nakken, bredt tak	2					Nedtrekk foran nakken, bredt tak	7	
			Stående, foroverbøy roing, overtak	2				
			Biceps, Scott curl	1+1+1	Begge armer + én og én arm			
Knebøy	2					Knebøy	7	
			Beinpress	2				
Utfall, kun kroppsvekt	2 (4)	Ett og ett ben	Utfall, kun kroppsvekt	2 (4)	Ett og ett ben			
Kneekstensjon	1+1+1	Begge ben + ett og ett ben						
Hamstrings curl	1+1+1	Begge ben + ett og ett ben						
			Strake markløft	2	Lett motstand (20 RM)			
			Markløft	2	Lett motstand (20 RM)			
			Tåhev	2				
Bukøvelse ("rulla"/redcore)	2					Bukøvelse ("rulla"/redcore)	2	

**Retningslinjer for trening:**  
 5 min generell oppvarming (gange, løping, sykling e.l.).  
 Alltid 1 x oppvarmingsserie på 50-70% av treningsmotstand i hver øvelse.  
 10-15 reps med 80-90% innsats (altså, du kunne klart 1-2 reps til...)  
 Øvelsene skal gjøres i rolig tempo, men uten pause mellom reps: 3-4 sek per rep, dvs 30-40 sek pr serie med 10 reps; 45-60 sek med 15 reps.  
 Antall økter pr uke: 3-4 (1-3 dagers hvile mellom øktene). Antall økter totalt 6-8. Økt nr 7 skal være en 1RM-økt. Legg inn to hviledager før 1RM-økta  
 Det er en stor fordel om dere trener sammen med andre deltakere i studien.  
 1RM i benkpress og knebøy kan gjøres i smithmaskin eller med frivekter. NB: du kan ikke endre testprosedyren underveis...

## Treningsprogram fase 2 del 1: 4-6 økter per uke i 4 uker

ØKT 1			ØKT 2			ØKT 3			ØKT 4		
Motstand: 9-11RM			Motstand: 9-11RM			Motstand: 9-11RM			Motstand: 9-11RM		
Pause: 1 min			Pause: 1 min			Pause: 1 min			Pause: 1 min		
Øvelser økt 1	Serier	Kommentar	Øvelser økt 2	Serier	Kommentar	Øvelser økt 3	Serier	Kommentar	Øvelser økt 4	Serier	Kommentar
Benkpress	3		Knebøy	3		Skråbenk (ca 45 grader)	3		Markløft	3	ca 12RM
Flyes med hantler (decline)/cabel-kryss	3		Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 15RM)	Pullover	3	ca 12RM	Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 15RM)
Skulderpress m/hantler stående	3		Kneekstensjon	2+1+1	Begge ben + ett og ett ben	Sidehev	3		Beinpress	3	
Triceps, pushdown	2+1+1	Begge armer + én og én arm	Strake markløft	3	ca 12RM	Nedtrekk, smalt grep	3		Hamstrings curl	2+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Sittende roing, smalt grep	3		Tåhev	3		Stående, foroverbøy roing, overtak	3		Tåhev	3	
Nedtrekk foran nakken, bredt grep	3		Valgfri bukøvelse	3		Biceps, Scott curl	2+1+1	Begge armer + én og én arm	Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3					Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				

## Treningsprogram fase 2 del 2: 4-6 økter per uke i 4 uker

ØKT 1			ØKT 2			ØKT 3			ØKT 4		
Motstand: 6-8RM			Motstand: 6-8RM			Motstand: 6-8RM			Motstand: 6-8RM		
Pause: 1.5 min			Pause: 1.5 min			Pause: 1.5 min			Pause: 1.5 min		
Øvelser økt 1	Serier	Kommentar	Øvelser økt 2	Serier	Kommentar	Øvelser økt 3	Serier	Kommentar	Øvelser økt 4	Serier	Kommentar
Benkpress	3		Knebøy	3		Skråbenk (ca 45 grader)	3		Markløft	3	ca 10RM
Flyes med hantler (decline)/cabel-kryss	3		Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 10RM)	Pullover	4	ca 10RM	Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 10RM)
Skulderpress m/hantler stående	3		Kneekstensjon	3+1+1	Begge ben + ett og ett ben	Sidehev	3		Beinpress	4	
Triceps, pushdown	3+1+1	Begge armer + én og én arm	Strake markløft	4	ca 10RM	Nedtrekk, smalt grep	3		Hamstrings curl	3+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Nedtrekk foran nakken, bredt grep	4		Tåhev	3		Stående, foroverbøy roing, overtak	4		Tåhev	3	
Sittende roing, smalt grep	4		Valgfri bukøvelse	3		Biceps, Scott curl	3+1+1	Begge armer + én og én arm	Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3					Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				



## 7.0 Vedlegg 2

### Western blot og elektroforese: Protokoll

<b>Forberedelse til elektroforese</b>	
Tin prøvene på is	
Beregn og skriv ut proteinloading	Proteinkonsentrasjonen fra totalproteinmåling føres inn i "sample preparation mal" og volumene beregnes. Load 15 µg protein og 25 µL prøve i hver brønn.
Lag pippeteringsskjema	Prøver som skal sammenlignes må på samme gel, og duplikatgel skal ha samme oppsett
Merk rør	FPnr-1 (før), -m (midtveis), -2 (etter)
Sjekk evt. lag løsninger	<u>Mes SDS Running buffer</u> 750 mL til indre kammer: 10 mL running buffer + 190 mL vann + 500 µL antioxidant (antioxidant tilsettes rett før bruk). Sett i kjøleskap TBS-T: 200 mL TBS + 1800 mL dH <sub>2</sub> O + 2 mL tween
Sett på varmeblokk	70 °C
<b>Prøvefortynning</b>	
Fortynn prøvene	Tilsett prøve, vann, sample buffer og reducing agent i hht Sample Preparation mal
Inkuber prøvene	10 min ved 70 °C på varmeblokk
Miks og sentrifuger prøvene	
<b>Mens prøver inkuberes</b>	
Finn	2 geler (NuPage Novex bis-tris 4-12 %) Running buffer 200 + 500 mL Antioxidant Gen-ON (1 aliquot a 5 µL per gel) Pipetter: 5 µL, 30 µL og 500 µL
Monter geler	Klipp av plast og tørk av gelen
	Ta av tapen og fjern kammen ved å skyve oppover
	Skyll brønnene i running buffer og sett gelene i holderen med teksten vendt ut
	Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen
Fyll running buffer med antioksidant i <u>indre kammer</u>	Tilsett 435 µL antioxidant i 175 mL Running buffer og fyll indre kammer. Sjekk at kammeret ikke lekker.
	Skyll brønnen
Appliser prøvene og markør (gen-ON)	Markøren appliseres i ytterste brønn på begge sider av hver gel, med prøvene i mellom
Fyll Running buffer i <u>ytre kammer</u>	Tilsett ca 700 mL Running buffer (uten antioxidant) til merke på elektroforese kammer
Start elektroforese	Sett på lokket, monter ledningene, slå på og still inn volt. Start og ta tida: 200 V i ~35 min

<b>Mens elektroforesen kjører</b>	
Lag blokkeringsløsning	5 g melkepulver i 100ml TBS-T
Legg frem utstyr	Anode, katode, filterpapir, kniv, pinsett og boks med dH <sub>2</sub> O
Legg filterpapir i dH <sub>2</sub> O Pakk opp anode og katode	Merk membranen i anoden med en prikk oppe i venstre hjørne for gel1, og to for gel2
<b>Blotting</b>	
Etter elektroforese	Slå av, trekk ut ledningene, ta ut en gel av gangen
Løsne gel	Tørk av gelen
	Hold siden med skrift vendt ned, løsne platen med kniv på alle kanter
	Dra den øvre platen oppover mot brønnen
	Kutt av brønnene
Gjør gelen klar fro pakking	Legg membranen på gelen med prikk(er) oppe i venstre hjørne (siste brønn)
	Sett kniven i sporet og separer gel fra plate
	Trekk platen forsiktig oppover slik at gelen ligger på membranen og skjær vekk kanten
Pakke geler og membran	Anode Membran Gel Filterpapir Katode Svamp Bruk rulle for å fjerne luftbobler
Monter	Sett pakningen helt til høyre i blottmodulen i kammeret og sett svamp i lokket.
Blotting	Start blotmodulen på program p3 i 7 min
Gel2	Begynn samme prosess med gel2 når det gjenstår 3-4 minutter av blotmodulen
<b>Blokkering</b>	
Blokker i 5 % melkeløsning	Over natt på gyrorocker (svak risting) i kjøleskap
<b>Dag 2</b>	
Lag 1 % skummetmelk	1g skummetmelk + 100ml TBS-T
Vasking	Skyll 2x i TBS-T før 3 x 5min i TBS-T på gyrorocker (65)
Lag 1Ab løsning	2,5 µl 1Ab i 6ml 1 % skummetmelk
<b>Kutting</b>	
Kutting	Legg membranene på plate med proteinsiden opp. Del membranen ved blå markør for 55 kDa med en skalpell
Inkubering med 1Ab	Merk rørene med navn og antistoff, og inkuber i 2 timer på gyroroller (5)
Lag TBS	100 mL TBS + 900 mL dH <sub>2</sub> O

Vasking	15 min i TBS før 3x5 i TBS-T på gyrorocker (65)
Lag 1 % skummetmelk	1g skummetmelk + 100ml TBS-T
Lag 2Ab løsning	2µl 2Ab i 60ml 1 % skummetmelk
Vasking	15 min i TBS før 3x5 i TBS-T på gyrorocker (65)
Lag substratløsning	750ml A + 750ml B i eppendorfrør Mixes rett før bruk
Finn frem	Glassplater Pipette 1000ml
Klargjøring av membran	Legg membranen på glassplaten med proteinsiden opp (prikk oppe i venstre hjørne), legg på substrat og fordel det forsiktig utover med en plastpipette
	Inkuber i 5 min
Ta bilde	Åpne Kodak 1D
	File – new IS2000R capture
	Velg luminescence Sett tid og binning: αB-crystallin: 4x1 min HSP70: 3x5 min
	Trykk preview
	Legg membranene med proteinsiden ned
	Rull over med en glasspipette
	Trykk done
	Trykk expose