

**Torstein Dalen**

## **Effekten av to uker med høyfrekvent styrketrening med redusert blodstrøm på hypertrofisignalering**

Er hypertrofisignaleringen "resatt" ved andre treningsuke etter ti dagers pause fra treningsuke en?

**Masteroppgave i idrettsvitenskap**

Seksjon for fysisk prestasjonsevne  
Norges idrettshøgskole, 2014



## Sammendrag

**Innledning:** Styrketrening med delvis avstengt blodstrøm (okklusjonstrening) og lav motstand har vist seg å være en effektiv metode for å øke muskelstørrelse og muskelstyrke på relativt kort tid. En nylig studie har vist en stor økning i muskelfiberareal etter tre uker med høyfrekvent okklusjonstrening. Noe overraskende skjedde økningen allerede etter første uke og flatet ut de neste to treningsukene. Man kan spekulere om dette skyldes at de fysiologiske systemene er mettet av treningsstimulus. Vår studie bygger på samme protokoll og hovedhensikten var å undersøke om ti dagers hvile var tilstrekkelig for å ”resette” systemene for hypertrofisignalering etter fem dager med høy-frekvent okklusjonstrening. **Metode:** Det ble rekruttert ni forsøkspersoner som fullførte syv økter okklusjonstrening på fem dager. De hadde ti dager hvile før de på nytt gjennomførte syv økter på fem dager. Muskelbiopsier fra syv forskjellige tidspunkt før, under og etter intervensjonen ble brukt for å undersøke fosforylering av signalproteinene p70S6 kinase (p70S6K), p38 mitogen activated protein kinase gamma og alfa (p38MAPK $\gamma$ / p38MAPK $\alpha$ ) og eukaryotisk elongeringsfaktor 2 (eEF2). For å undersøke muskelvekst ble også fiberareal analysert fra biopsiene. Muskelstyrke ble testet ved en repetisjon maksimum (1 RM) og maksimalt dreiemoment ved 60 °/s i kneekstensjon. **Resultater:** p70S6K-fosforylering økte like mye etter første treningsøkt i treningsuke én og to. p38MAPK $\gamma$ -fosforylering økte etter første treningsøkt i uke én, men ikke i uke to. Fosforyleringen av p38MAPK $\gamma$  tenderte til å være forskjellig mellom ukene. p38MAPK $\alpha$  og eEF2 hadde ingen endring ved noen tidspunkt i intervensjonen. Fiberareal økte med 20 % for type I-fibre, mens fiberareal for type II-fibre ble ikke signifikant endret. Muskelstyrke målt som 1 RM og maksimalt dreiemoment ble ikke signifikant endret. **Diskusjon:** Fosforyleringen av p70S6K og p38MAPK $\gamma$  stemmer overens med tidligere studier, og responsen på treningsøkten var opprettholdt etter 10 dager med hvile for p70S6K, men kan ha vært forskjellig for p38MAPK $\gamma$ . Det kan riktignok skyldes forskjellig treningsstimulus fra treningsukene. Muskelveksten og styrkefremgangen var svakere enn forventet og ikke i samsvar med en tidligere studie der samme treningsprotokoll ble benyttet. **Konklusjon:** En hvileperiode på ti dager kan ha vært tilstrekkelig for å resette aktiveringen av p70S6K, mens p38MAPK $\gamma$  kan ha endret sin sensitivitet. Intervensjonen førte ikke til en markant muskelvekst eller økning i muskelstyrke. **Nøkkelord:** Okklusjonstrening, p70S6K, p38MAPK, eEF2, hypertrofisignalering.

# Innhold

<b>Sammendrag .....</b>	<b>3</b>
<b>Innhold .....</b>	<b>4</b>
<b>Forord.....</b>	<b>6</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Innledning .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Teori .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Okklusjonstrening.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Mekanismer for muskelvekst ved okklusjonstrening .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Muskelfiberrekruttering .....	16
2.2.2 Hormoner og systemiske vekstfaktorer.....	18
2.2.3 Lokale vekstfaktorer .....	19
2.2.4 Metabolsk stress.....	19
2.2.5 Satellittceller .....	20
2.2.6 Muskelsvelling.....	21
2.2.7 Andre faktorer.....	21
2.2.8 Oppsummering.....	22
<b>2.3 Muskelvekst .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Signalering .....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Hypertrofisignalering .....	25
2.4.2 p70S6K.....	30
2.4.3 eEF2 .....	32
2.4.4 p38MAPK .....	33
2.4.5 Oppsummering.....	35
<b>3. Metode.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Studiedesign .....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Utvalg.....	36
3.1.2 Treningsprotokoll.....	38
<b>3.2 Styrketester .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Isokinetisk kneekstensjon .....	40
3.2.2 1 RM kneekstensjon.....	41
<b>3.3 Akuttdagene.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Blodprøver .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Muskelbiopsier .....</b>	<b>43</b>
1.1.1 Homogenisering.....	43



<b>3.6 Muskelanalyser</b> .....	<b>44</b>
3.6.1 Kvantifisering av muskelfiberareal.....	44
3.6.2 Totalproteinmåling.....	44
3.6.3 Western-Blot.....	45
<b>3.7 Statistikk</b> .....	<b>47</b>
<b>4. Resultater</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Trening</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2 Blodanalyser</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3 Signalering</b> .....	<b>51</b>
4.3.1 p70S6K.....	51
4.3.2 eEF2 .....	51
4.3.3 p38MAPK .....	52
<b>4.4 Muskelvekst</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5 Muskelstyrke</b> .....	<b>55</b>
<b>5. Diskusjon</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1 Treningsresultater</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2 Signalering</b> .....	<b>58</b>
5.2.1 p70S6K.....	58
5.2.2 eEF2 .....	60
5.2.3 p38MAPK .....	61
<b>5.3 Muskelvekst</b> .....	<b>62</b>
<b>5.4 Muskelstyrke</b> .....	<b>65</b>
<b>5.5 Begrensninger</b> .....	<b>66</b>
<b>6. Konklusjon</b> .....	<b>67</b>
<b>7. Referanser</b> .....	<b>68</b>
<b>Tabelloversikt</b> .....	<b>77</b>
<b>Figuroversikt</b> .....	<b>78</b>
<b>Vedlegg</b> .....	<b>81</b>
Vedlegg 1: Informasjonsskriv .....	81
Vedlegg 2 – protokoll western-blot .....	90

## Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet i forbindelse med prosjektet «Okklusjon 3» ved Norges Idrettshøgskole høsten 2013.

Arbeidet med masteroppgaven har vært en tidkrevende og lærerik prosess jeg ikke ville vært foruten. Jeg vil fremheve samarbeidet med Amund Løvstad og Thomas Bjørnsen som ett av lyspunktene. Tusen takk for tålmodighet og presisjon gjennom hele intervensjon- og analysefasen.

Jeg vil takke veilederne mine Truls Raastad og Gøran Paulsen for god oppfølging gjennom hele prosjektet. Takk til Mathias Wernbom for lange og nøyaktige svar på alle kompliserte spørsmål jeg måtte ha kommet med. Takk til styrkerommet og alle mine treningskamerater ved NIH for gode diskusjoner og resultater. Takk til NIHI fotball for både gode og vonde opplevelser på fotballbanen. Jeg vil også takke Håvard Hamarsland, Hege Østgaard og Ingrid Ugelstad for god hjelp på laboratoriet. En spesiell takk rettes til Sigve Nyvik Aas og Anne Lene Nordengen for å ha delt frustrerende og lange dager på laboratoriet. Takk til klassekameratene mine gjennom årene på NIH for et bra klassemiljø og utfordrende diskusjoner. Takk til alle våre forsøkspersoner for både godt humør, bra innsats og ikke minst bidraget av muskelbiter. Takk til forsøksperson Mats som stilte opp med sin sedvanlige humor og fandanivoldskhet.

Takk til min kjæreste, Gina. Dette hadde vært mye vanskeligere uten ditt humør og din fantastiske støtte.

Denne oppgaven dedikeres til min tante, bestemor og spesielt mor for ubetalelig støtte gjennom alle år.

Det har vært fire uforglemmelige år på NIH, takk til alle involverte

Sognsvann, mai 2014

Torstein Dalen

## Forkortelser

<b>CK</b>	Kreatin kinase
<b>Defosforlyring</b>	Fjerning av en fosfatgruppe til et molekyl eller protein
<b>eEF2</b>	Eukaryotisk translasjon-elongeringsfaktor 2
<b>ERK1/2</b>	Ekstracellulær signal-regulert kinase 1 og 2
<b>Fosforlyring</b>	Addering av en fosfatgruppe til et molekyl eller protein
<b>FT</b>	Fast twitch
<b>FSR</b>	Fractional synthetic rate, målemetode for proteinsyntese
<b>GH</b>	Veksthormon
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia inducible factor 1- alfa
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>IGF-1</b>	Insulin lik vekstfaktor 1
<b>Isokinetisk</b>	Konstant bevegelse
<b>JNK</b>	c-jun N-terminal kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen aktivert protein kinase
<b>MFA</b>	Muskelfiberareal
<b>MPB</b>	Muskelproteinnedbrytning
<b>MPS</b>	Muskelproteinsyntese
<b>MR</b>	Magnetresonans
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonucleic syre
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>Nedreguleringsfaktorer</b>	Alle signaler som enten fremmer proteinnedbrytning og/eller inhiberer hypertrofisignaler.
<b>NO</b>	Nitrogenoksid
<b>pI</b>	Uorganisk fosfat
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>Rapamycin</b>	mTOR-inhibitor
<b>RM</b>	Repetition maksimum
<b>rpS6</b>	Ribosomal protein S6
<b>ST</b>	Slow twitch
<b>Treningsvolum</b>	Antall repetisjoner ganger treningsmotstand.
<b>UL</b>	Ultralyd

# 1. Innledning

Okklusjonstrening har sin opprinnelse fra Japan og ble introdusert av den japanske legen Yoshiaki Sato på 1960-tallet. Sato fikk ideen om trening med redusert blodtilførsel da han satt i en ukomfortabel posisjon på en religiøs seremoni og fikk klemt av blodtilførsel til leggene. Han merket seg den spesielle følelsen av muskelsvellingen og mente at denne minnet om svellingen han hadde oppnådd med styrketrening. Etter mye prøving og feiling på seg selv utviklet han konseptet ”kaatsu training” (kaatsu betyr økt trykk på japansk)(Sato, 2005). Shinohara et al. (1998) var de første til å beskrive denne treningsmetoden i et engelskspråklig vitenskapelig tidsskrift (Shinohara, Kouzaki, Yoshihisa, & Fukunaga, 1998); og metoden har siden fått økende oppmerksomhet fra forskningsgrupper i vestlige land. Okklusjonstrening er også omtalt som “kaatsu training”, “blood flow restricted resistance exercise (BFRRE)”, “vascular restriction resistance exercise (VRRE)”, “strength training with vascular occlusion” og “iskemisk styrketrening”. I denne oppgaven vil treningsmetoden i hovedsak bli omtalt som okklusjonstrening.

Styrketrening har mange fordeler, men det kreves at man trener relativt regelmessig, og at man yter en viss innsats (American College of Sports Medicine, 2009). Trening med tung motstand vil være en belastning for alle strukturer som er involvert. I tillegg til muskelvevet vil også sener, bein og ledd bli stimulert. Siden det er slik vevet utvikler seg er tung belastning meget gunstig for friske personer. Hos personer som av forskjellige grunner ikke tåler belastningen ved tradisjonell tung styrketrening, eksempelvis ved skader på distale ledd; kan okklusjonstrening være et bra alternativ (Wernbom, Augustsson, & Raastad, 2008).

Okklusjonstrening har vist seg meget effektivt i en rekke populasjoner. Det er vist å øke muskelmasse, muskelstyrke og proteinsyntese for godt trente idrettsutøvere (Takarada, Sato, & Ishii, 2002b), eldre (Yokokawa, Hongo, Urayama, Nishimura, & Kai, 2008), personer i rehabilitering etter fremre korsbåndoperasjon (Ohta et al., 2003) og i den mest studerte populasjonen, utrente yngre personer (Fujita, Brechue, Kurita, & Sato, 2008; Takarada et al., 2002). Okklusjonstrening er vist å kunne gi minst like gode resultater på muskelvekst og styrke som tradisjonell styrketrening ved bruk av riktig protokoll. En av fordelene med okklusjonstrening er at det krever liten restitusjonstid og kan derfor utføres med en mye høyere frekvens enn tradisjonell styrketrening (Wernbom et al. 2008). Noe som sannsynligvis er grunnen til at man kan oppnå samme effekt som lengre perioder med tradisjonell styrketrening (10-12 uker) på relativt kort

tid (1-3 uker)(tabell 2.1). I en studie fra 2012 viste Nielsen et al. en stor økning i muskelfiberareal, muskelstyrke og satellittcelleaktivering etter tre uker med høyfrekvent okklusjonstrening. Forsøkspersonene trente i tre uker og gjennomførte henholdsvis syv, åtte og ni økter per uke. Fiberarealet økte med 38 % for begge fibertypene etter første treningsuke. Etter andre treningsuke var endringen fra baseline 35 % (type I) og 37 % (type II); mens økningen var 31 % (type I) og 32 % (type II) ti dager etter intervensjonen. Økningen i fiberareal ble fulgt av en økning i maksimal voluntær kraft (MVC) med 7 % målt fem dager etter og med 11 % målt ti dager etter intervensjonen. I tillegg til dette var hovedfunnene i studien en stor økning i antall satellittceller og cellekjerne allerede etter syv økter. Hypertrofisignalering ble imidlertid ikke undersøkt i studien. Det som er verd å merke seg med denne studien er at all økning i fiberareal, cellekjerne og satellittceller kom etter den første treningsuke (Nielsen et al., 2012). Grunnen til avflatningen etter første treningsuke kan være at de fysiologiske systemene som tar imot stimulus fra muskelarbeid har blitt ”mettet”. Siden muskelveksten Nielsen et al. (2012) observerte tilsynelatende kom som et resultat av de fem første dagene med trening, kan man spekulere i hvorvidt dette kan være en slags oppstartseffekt. Hvis dette er tilfelle ville det vært interessant å undersøke om effekten kan oppnås flere ganger i samme intervensjon ved å legge inne en hvileperiode etter første treningsuke. Hvis dette er en riktig antakelse, vil en slik type protokoll gjøre at man kan få bedre resultater da man kan addere effektene av oppstartene; i stedet for å trene i flere uker og kun få resultat fra den første.

Hypertrofisignalering er et system som knytter stimulus man oppnår fra trening til fysiologiske hendelser i muskelcellene. De viktigste elementene i dette systemet kalles signalproteiner og er organisert delvis hierarkisk der de viktigste proteinene ligger oppstrøms og tar imot stimuli, før de videreformidler dette nedstrøms og tilslutt påvirker hastigheten på syntesen av muskelproteiner. Vi har undersøkt tre av de antatt viktigste signalproteinene ved okklusjonstrening for å kunne finne ut hvordan disse aktiveres i en periode med okklusjonstrening. p70S6K, eEF2 og p38MAPK er alle etablerte markører for hypertrofisignalering, og ville kunne gi oss et bilde av grad av hypertrofisignalering ved vår protokoll. Vår studie bygger på samme protokoll som Nielsen et al. (2010) hadde i sin første treningsuke, og hovedhensikten vår var å undersøke om ti dagers hvile er tilstrekkelig for å ”resette” systemene for hypertrofisignalering etter fem dager med daglig okklusjonstrening.

Min problemstilling er:

*Vil ti dager hvile etter en fem dagers periode med høyfrekvent okklusjonstrening være tilstrekkelig for å "resette" signaleringssystemene for hypertrofi i muskelen?*

Jeg stiller følgende hypoteser,

*H<sub>0</sub> Det vil være en like stor aktivering (fosforyleringsgrad) av signalproteinene p70S6K, eEF2, p38MAPK $\gamma$  og p38MAPK $\alpha$  ved oppstart av treningsuke to, som ved oppstart i uke én.*

*H<sub>1</sub> Det vil være forskjellig aktivering (fosforyleringsgrad) av signalproteinene p70S6K, eEF2, p38MAPK $\gamma$  og p38MAPK $\alpha$  ved oppstart av treningsuke to, sammenlignet med oppstart i uke én.*

## 2. Teori

### 2.1 Okklusjonstrening

Okklusjonstrening har vist seg å være en effektiv treningsmetode for å oppnå hypertrofi og øke muskelstyrke (tabell 2.1). Det er imidlertid store metodiske forskjeller i hvordan treningen har blitt utført i studiene som har undersøkt okklusjonstrening. Det er forskjell i hvilket trykk som har blitt benyttet i mansjettene, der de fleste studier har brukt et trykk mellom 160-240 mmHg (Wernbom et al., 2008). Loenneke et al. (2013) foreslår at trykket bør være høyt nok til å stoppe venøs blodstrøm, men lavt nok til å tillate delvis arteriell tilstrømming av blod. I en oversiktsartikkel fra 2008 blir 90-110 mmHg (ved bruk av bred mansjett) foreslått som tilstrekkelig for å delvis avstenge blodstrømmen og påvirke muskelutholdenheten (Wernbom et al., 2008). Mansjettbredde er av stor viktighet og kan i stor grad kompensere for et lavere trykk. Det er rapportert samme prosentvis avstenging av arteriell blodstrøm med tynnere mansjetter med høyt trykk (160-200 mmHg) som bredere mansjetter med lavere trykk (90-100 mmHg). De fleste studiene fra japanske grupper har benyttet smale mansjetter med rundt 33-50 mm bredde, mens vestlige studier for det meste har benyttet bredere mansjetter opp mot 150 mm i bredde (Loenneke et al., 2013). Bredere mansjetter ser også ut til å være tryggere siden trykket fordeles utover et større område (Graham, Breault, McEwen, & McGraw, 1993). Vi har brukt en 150 mm bred mansjett med 135 mm brede trykksoner og et med et trykk på 90 mmHg for kvinner og 100 mmHg for menn. Dette resulterte i en gjennomsnittlig reduksjon i arteriell blodstrøm på 67 % (data ikke vist).

Okklusjonstrening utføres normalt med en motstand på 20-50 % av 1 RM, men har blitt studert med motstand opp mot 80 % av 1 RM. Den vanligste formen for okklusjonstrening er uansett med lav motstand og omtales som "low-load occlusion training". I denne oppgaven har jeg hatt fokus på studier som har undersøkt okklusjonstrening for underkroppen og spesielt *m.quadriceps*. Okklusjonstrening har vist seg meget effektivt for overkroppsmuskler også (se Wernbom et al., 2008); men vil ikke bli omtalt i denne oppgaven.

**Tabell 2.1:** Oversikt over studier som har undersøkt okklusjonstrening på muskelvekst og/eller muskelstyrke.

Studie	Kjønn (alder)	N	Treningsstatus	Metode	Motstand (% av 1 RM)	Sett x reps	P	Treningsfrekvens	Styrkeøkning (% 1 RM)	Muskelvekst (%CSA) (målemetode)
Shinohara et al. (1998)	♂, 23,2 (variasjons-bredde 19-29 år)	5	Utrente	Isometrisk kneestensjon. 3 min med 2 s kontraksjon og 3 s pause. 80 mm bred cuff som holdte >250 mmHg gjennom hele økten. (OK)	40 % av MVC	1x36	-	3 dager per uke i fire uker To ganger i uken i åtte uker.	OK: ↑ 26 % (MVC) K: Ingen endring	-
Takarada et al. (2002)	♂, 25,7±0,7 år	17	Profesjonelle rugbyspillere. En styrketrent gruppe og en kontrollgruppe uten erfaring fra styrketrening.	Kneestensjon. 33 mm bred cuff som holdte ~196 mmHg gjennom hele treningsøkten. Okklusjonsgruppe (OK) (n=6) Treningsgruppe gjorde samme trening, men uten okklusjon (TK) (n=6). Kontrollgruppe (K) trente kun rugby (n=5).	50 %	4x failure	30 s		OK: ↑ 14,3% Isokinetisk kneestensjon TK og K: ingen endring	OK: ↑ 12,6 % CSA lær (MR) TK og K: ingen endring



Studie	Kjønn (alder)	N	Treningsstatus	Metode	Motstand (% av 1 RM)	Sett x reps	P	Treningsfrekvens	Styrkeøkning (% 1 RM)	Muskelvekst (% CSA) (målemetode)
Takarada et al. (2004)	♂, 21,8±7,3 år	18	Utrente	Kneekstensjon. 90 mm bred cuff som holdte ~218 mmHg gjennom hele treningsøkten. Okklusjonsgruppe (OK) (n=6) Kontroll trening (KT) matchet antallet repetisjoner som OK, men uten okklusjon (n=6). Kontroll okklusjon (K) trente ikke, men fikk påført okklusjon. (n=6)	20 %	5x failure		To ganger i uken i åtte uker. KO: okklusjon 10 min to ganger i uken i åtte uker.	OK: ↑ 9,2 % Isokinetisk kneekstensjon KT: ingen endring K: ingen endring	OK: ↑ 10,3 % CSA Lår (MR) KT: ingen endring K: ingen endring
Abe et al. (2005a)	♂, ikke rapportert	15	Friddrettsutøvere	Knebøy+leg curl Startet første dag med 160 mmHG, økte med 20 mmHG hver dag til de nådde ~240 mmHG. Kaatsu-cuff (Antatt å være 33 mm bred) trykk opprettholdt gjennom hele økten. Okklusjonsgruppe (OK) (n=9) Kontrollgruppe matchet antallet repetisjoner som OK, men uten okklusjon (K) (n=6)	20 %	3x15 per øvelse	30 s	To ganger per dag i åtte dager	OK: ↑ 10 % Beinpress K: Ingen endring	OK: ↑ 4-5 % CSA lår (UL) K: Ingen endring

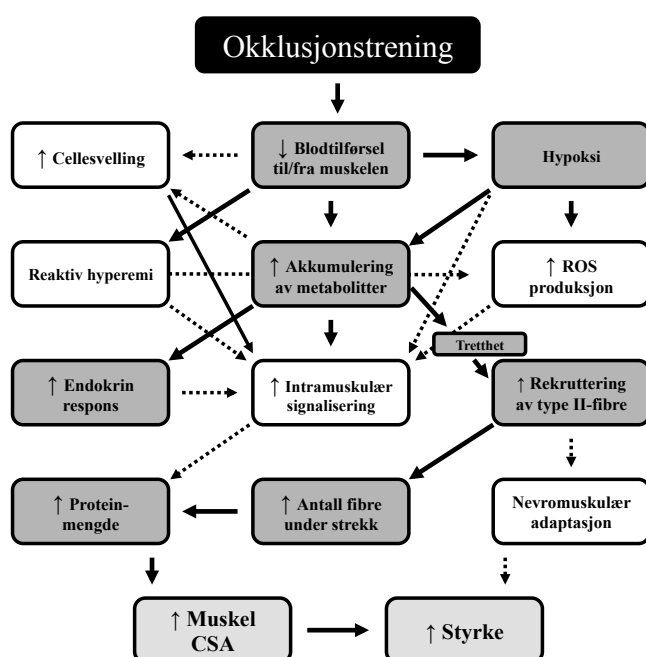
Studie	Kjønn (alder)	N	Treningsstatus	Metode	Motstand (% av 1 RM)	Sett x reps	P	Treningsfrekvens	Styrkeøkning (% 1 RM)	Muskelvekst (%CSA) (målemetode)
Abe et al. (2005b)	♂, 23,6±6,5 år	16	Aktive, men ikke styrketrente.	Knebøy og leg curl. Startet første dag med 160 mmHG, økte med 20 mmHG hver dag til de nådde ~240 mmHg. Kaatsu-cuff (Antatt å være 33 mm bred); trykk oppretthold gjennom hele økten.	20 %	3x15 per øvelse	30 s	To ganger per dag, seks dager i uken i to uker.	OK: ↑ 17 % knebøy, ↑ 23 % leg curl	OK: ↑ 7-8 % CSA lær (UL)
Kubo et al. (2006)	♂, 25±2 år	9	Aktive, men ikke styrketrente	Okklusjonsgruppe (OK) (n=9). Kontrollgruppe matchet antallet repetisjoner som OK, men uten okklusjon (K) (n=7). Kneekstensjon. Kaatsu-cuff (Antatt å være 33 mm bred) Gradvis økning av trykk gjennom treningsperioden.	20 %	4x4 (1.=25, 2.=18, 3.=15, 4.=12)	30 s	Tre økter per uke i tolv uker.	K: ↑ 9 % knebøy, ↑ 2 % leg curl	K: Ingen endring OK: ↑ 5,9 % TS: ↑ 7,9 % (MR)
(Fujita et al. 2008)	♂, 21,7±3 år	16	Aktive, men ikke styrketrente.	Ett bein trente okklusjonstrening (OK) det andre trente tradisjonell tung stryketrening (TS) Kneekstensjon Kaatsu-cuff (ikke rapportert bredde) som ble startet første dag med 160 mmHG, økte med 20 mmHG hver dag til de nådde ~220 mmHg. Ble ikke sluppet opp under treningsøktene.	20 %	3x15 per øvelse	30 s	To ganger per dag i seks dager	OK: ↑ 6,7 % kneekstensjon	OK: ↑ 3,5 % CSA lær (UL) K: Ingen endring
				Okklusjonsgruppe (OK) (n=9) Kontrollgruppe gjorde samme trening, men uten okklusjon (K) (n=7)						

Studie	Kjønn (alder)	N	Treningsstatus	Metode	Motstand (% av 1 RM)	Sett x reps	P	Treningsfrekvens	Styrkeøkning (% 1 RM)	Muskelvekst (% CSA) (målemetode)
Nielsen et al. (2012)	♂, 22,48±7,3 år	18	Ikke styrketrente	Kneekstensjon, 180 mm bred cuff som holdte ~100 mmHg under hele økten. Okklusjonsgruppe (OK) Kontroll trening (K) e matchet antallet repetisjoner som OK, men uten okklusjon	20 %	4x failure	30 s	Tre uker med henholdsvis syv, åtte og ni økter per uke.	OK: ↑ 10,6 % Isometrisk kneekstensjon K: Ingen endring	OK: ↑ 31,7 % (MFA) K: Ingen endring (26,9 % økning midtveis i intervensjonen)
Yasuda et al. (2013)	♂/♀, 69,5±6,6 år (n=19)	21	Ufrente eldre	Kneekstensjon og beinpress. Okklusjonsgruppe (OK) 50 mm kaatsu-cuff som holdte et trykk på ~270 mmHg gjennom hele økten. Kontrollgruppe som ikke trente (K).	20 % kneekstensjon, 30 % beinpress	4x4 (1.=30, 2.=20, 3.=15, 4.=10)	30 s	To ganger i uken i tolv uker.	OK: ↑ 26,1 % kneekstensjon, ↑ 33,4 % beinpress K: ingen endring	OK: ↑ 8 % m. quadriceps, ↑ 6,5 % adduktorgruppen, ↑ 4 % m. gluteus maximus (MR). K: ingen endring

*Inklusjonskriterier: trening for m.quadriceps og noenlunde lik protokoll som vårt forsøk. N– antall forsøkspersoner, P– pause lengde, MVC– maksimal voluntær kontraksjon, MR– magnetresonans, UL– ultralyd, CSA– muskel-tverrsnittsareal, MFA – muskelfiberareal.*

## 2.2 Mekanismer for muskelvekst ved okklusjonstrening

Selv om vi nå vet at okklusjonstrening kan skape muskelvekst (tabell 1.1) er ikke mekanismene fullstendig kartlagt (Wernbom et al., 2008). I litteraturen er det nevnt en rekke forskjellige potensielle mekanismer og årsaker for muskelveksten man ser i forbindelse med okklusjonstrening (figur 2.1); og jeg vil i dette kapitlet forsøke å gi et overblikk over de antatt viktigste. Det er riktignok rimelig å anta at effekten man ser ved okklusjonstrening skjer som en samlet effekt av flere mekanismer, heller enn å være avhengig av én spesiell mekanisme (Loenneke, Wilson, & Wilson, 2010).



**Figur 2.1** Forenklet oversikt over de antatt viktigste mekanismene til hvorfor okklusjonstrening skaper muskelvekst og styrkeøkning; og det tenkte samspillet mellom disse. Modifisert etter Scott, Slattery, Sculley, & Dascombe (2014). Sannsynlige mekanismer er i mørkegrå bokser og mulige mekanismer som krever mer forskning er i lysegrå bokser. Tykke linjer representerer en etablert link mellom boksene, mens stripet linje representerer en mulig link.

### 2.2.1 Muskelfiberrekruttering

Rekruttering av muskelfibre blir normalt bestemt av størrelsesprinsippet som dikterer at mindre motoriske enheter med trege (slow-twitch, ST) og utholdende fibre blir aktivert ved lavest kraftkrav. Når kravet for kraft eller effekt øker må de større og raskere enhetene (fast-twitch, FT) bidra gradvis (Hennemann, Somjen, & Carpenter, 1965).

Aktivering av FT ser ut til å være en avgjørende faktor for å skape muskelvekst (Pope, Willardson, & Schoenfeld, 2013), og normalt forventer man at motstanden må være høy (>70-80 % av 1 RM) for å kunne rekruttere FT i stor grad. I senere tid har man observert at terskelen for å rekruttere FT senkes under utmattende arbeid (Houtman, Stegeman, Van Dijk, & Zwarts, 2003); og dette er også observert ved utmattende okklusjonstrening. Okklusjonstrening kan ha høy FT-rekruttering, selv om den ytre belastningen er lav (Krustrup, Söderlund, Relu, Ferguson, & Bangsbo, 2009; Suga et al., 2012; Takada, Okita, Suga, Omokawa, Morita, Horiuchi, Kadoguchi, Takahashi, Hirabayashi, Yokota, Kinugawa, & Tsutsui, 2012a; Takarada, Takazawa, et al., 2000b). I protokoller med flere serier og kort pause (under ett minutt) mellom seriene har denne effekten blitt observert mot slutten av første serie og fra starten av de påfølgende seriene (Krustrup et al., 2009). Takarada et al. (2000a) viste en 80 % høyere EMG-aktivitet når forsøkspersonene utførte en øvelse med okklusjon, sammenlignet med samme øvelse uten okklusjon. Dette forklarte forfatterne med et surt og oksygenfattig intramuskulært miljø som krever større aktivering for å kunne oppnå samme kraft; noe som kan oversettes til at det er utviklet betydelig grad av muskulær tretthet. I et annet forsøk viste Takarada et al. (2000b) at EMG-aktiviteten i *m.biceps brachii* ved lav-intensiv okklusjonstrening ved 40 % av 1 RM var nesten like stor som ved tradisjonell styrketrening ved 80 % av 1 RM. Det er ikke kun er kraft og hastighet som bestemmer fiberrekrutteringen, men også oksygentilgjengelighet og metabolsk status (tretthet) i fibre når arbeidet pågår over tid (Moritani, Muro, & Nagata, 1986). En raskere utvikling av tretthet ville kunne være med på å forklare den høye aktiveringen ved okklusjonstrening. Suga et al. (2009) fant derimot ikke en like høy rekruttering av FT-fibre ved lav-intensiv (20 % av 1 RM) okklusjonstrening sammenlignet med tradisjonell styrketrening (65 % av 1 RM). Denne studien er også i kontrast til de fleste andre studier på området ved at de registrerte mindre endringer metabolsk stress. Forfatterne selv foreslo at dette kunne skyldes en forskjell i protokoll og at treningen utført ved plantarfleksjon involverer *m. soleus* som er en muskel dominert av ST-fibre. En nylig studie rapporterte en betydelig overvekt av ST-fibre blant fibre som hadde lave glykogenlagre etter en økt med okklusjonstrening; noe som taler for at ST-fibre hadde gjort en større del av jobben (Cumming, Paulsen, Wernbom, Ugelstad, & Raastad, 2014). Trening til utmattelse vil uansett (med eller uten okklusjon) føre til maksimal aktivering av begge fibertyper til slutt; ved at alle fibre må bidra for at muskelen skal kunne skape kraft. Okklusjonstrening

skaper imidlertid raskere trøtthet og gir tilnærmet ingen restitusjon i pausene, og er derfor en praktisk måte for raskt å rekruttere type II-fibre når man arbeider med lav motstand. Okklusjonstrening har derfor en høy fiberaktivering fra begge fibertyper og dette ser ut til å være en årsak til muskelveksten man ser ved denne typen trening (Meyer, 2006). Okklusjonstrening ser ut til å øke fiberarealet i type I-fibre i større grad enn tradisjonell styrketrening (Nielsen et al., 2012); som tyder på at type I-fibrene bidrar i stor grad ved okklusjonstrening. Dette kan bety at okklusjonstrening skaper en mer virkningsfull signalering fra type I-fibre sammenlignet med tradisjonell tung styrketrening; noe som ville kunne gi forskjellig utslag for hypertrofisignaleringen og muskelvekst.

### **2.2.2 Hormoner og systemiske vekstfaktorer**

Flere studier har vist to til tre ganger så stor økning i veksthormon ved okklusjonstrening sammenlignet med tradisjonell styrketrening (Abe et al., 2005b; Takarada, Nakamura, et al., 2000a; Takarada, Tsuruta, & Ishii, 2004; Viru, Jansson, Viru, & Sundberg, 1998). Andre studier har vist en stor økning i veksthormon (GH) ved okklusjonstrening, men ikke forskjellig fra grupper som trente tradisjonell styrketrening (Tanimoto, Madarame, & Ishii, 2005). Konsentrasjonen av laktat (La) og andre metabolitter øker ved okklusjonstrening, noe som gjør at pH-konsentrasjonen går ned, og muskelmiljøet blir surt (Takarada et al., 2000a). Surt intramuskulært miljø har vist å stimulere gruppe-III og gruppe-IV afferente nervefibre gjennom intramuskulære metaboreseptorer (Victor & Seals, 1989). Denne signalveien er tidligere vist å kunne regulere sekresjonen av veksthormon fra hypofysen (Gosselink et al., 1998).

Effekten av veksthormon på muskelvekst er imidlertid usikker; de fleste studier finner ingen god sammenheng mellom økning i veksthormon og hypertrofi ved trening. En potensiell effekt av veksthormon kan imidlertid bli oppnådd via insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Takarada et al., 2004). Effektene av IGF-1 vil bli drøftet i neste underkapittel. Det antas at systemiske faktorer er mindre viktige enn lokale faktorer hva gjelder påvirkning av muskelvekst, men de systemiske faktorene kan ha en forsterkende effekt på de lokale faktorene (Wernbom et al., 2008). Studier som viser økning i muskelvekst eller muskelstyrke i kroppsdeler som ikke har hatt okklusjon under okklusjonstrening taler for at det finnes systemiske effekter (Cook, Kilduff, &

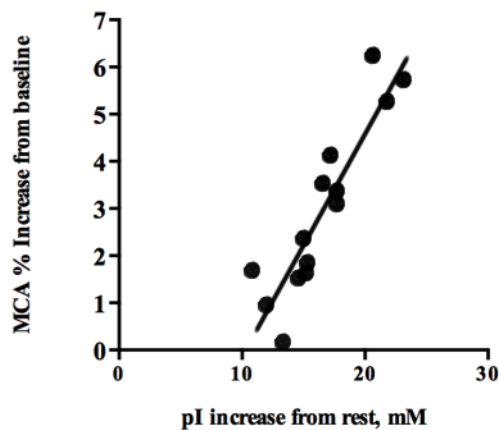
Beaven, 2014). Dette er imidlertid usikkert og det behøves mer forskning i årene som kommer for å undersøke om dette faktisk er tilfelle.

### **2.2.3 Lokale vekstfaktorer**

I etterkant av styrketrening skjer det en lokal oppregulering av vekstfaktorer i muskelgruppene som har blitt belastet. Disse lokale vekstfaktorer er generelt ansett som både viktigere og bedre dokumentert for effektene man ser på muskelvekst, sammenlignet med de systemiske vekstfaktorene. Tilgjengeligheten på IGF-I, mechano growth factor (MGF, en spleiset variant av IGF-1) og myostatin ser ut til å være en av flere sentrale regulatoriske prosesser i muskelvekst grunnet trening (Rennie, Wackerhage, Spangenburg, & Booth, 2004). Det er foreløpig to studier som har undersøkt IGF-1/MGF i muskel etter okklusjonstrening. Drummond et al. (2008) fant ingen endring i IGF-1- og MGF-mRNA tre timer etter okklusjonstrening. Dette støttes av Manini et al. (2011) som viste ingen endring i IGF-1-mRNA åtte timer etter okklusjonstrening. Flere studier har undersøkt IGF-1-konsentrasjon i blod ved okklusjonstrening (Abe et al., 2005b; Takano et al., 2005), men disse studiene forteller oss lite om den faktiske lokale påvirkningen. Studier på lokale vekstfaktorer i muskel er noe som burde satses på i årene som kommer. IGF-1/MGF har også en viktig rolle i hypertrofisignaleringen; som vil bli gjennomgått i kapittel 2.4.1.

### **2.2.4 Metabolsk stress**

Det metabolske stresset ved okklusjonstrening ser ut til å være signifikant. Betydelig nedgang i kreatinfosfat (CP)-konsentrasjon (Krustrup et al., 2009; Takada, Okita, Suga, Omokawa, Morita, Horiuchi, Kadoguchi, Takahashi, Hirabayashi, Yokota, Kinugawa, & Tsutsui 2012b), nedgang i intramuskulær pH (Suga et al., 2009; Takada et al., 2012a; 2012b), økning i uorganisk fosfat (Pi) (Takada et al., 2012a) og økning av plasmalaktat (Fujita et al., 2008) bekrefter det økte metabolske stresset når treningen foregår med okklusjon. Det er foreslått at det metabolske stresset er større ved okklusjonstrening sammenlignet med tradisjonell styrketrening (Pope et al., 2013), selv om ikke alle studier observerer det (Suga et al., 2009; muligens fordi protokollen inneholdte kun en serie). Takada et al. (2012a) viste en korrelasjon mellom økning i muskelmasse og metabolsk stress målt som endring i uorganisk fosfat (figur 2.2) og intramuskulær pH.



**Figur 2.2:** Korrelasjon ( $r=0,88$ ;  $P=0,001$ ) mellom økning i tverrsnittsareal og økning i uorgansisk fosfat (pI). Målingene av pI ble gjort i hvile og hvert 30. sekund gjennom treningsprotokollen som varte i to minutter CSA ble målt med MR etter to og fire uker med okklusjonstrening. Modifisert etter Takada et al. (2012a).

I en oversiktsartikkel fra 2014 blir de potensielle effektene av metabolsk stress summert til å være større aktivering av FT-fibre, økt hormonrespons, økt intramuskulær signalering og økt intramuskulær svelling ved okklusjonstrening (Scott et al., 2014).

### 2.2.5 Satellittceller

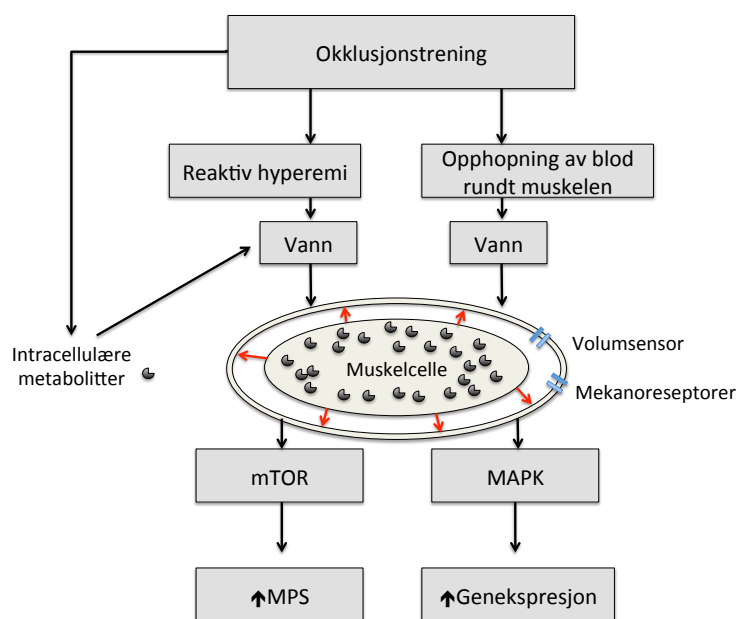
Responsen satellittceller har til en periode med okklusjonstrening har per dags dato kun blitt undersøkt i én intervensjon (Nielsen et al., 2012). Der fant forfatterne en stor aktivering av satellittceller med påfølgende addering av cellekjerner til muskelcellene. Tidligere studier med tradisjonell styrketrening har etablert at addering av cellekjerner i musklene er avgjørende for vedvarende muskelvekst (Petrella, Kim, Mayhew, Cross, & Bamman, 2008), og kan derfor være en viktig komponent i muskelveksten man ser ved okklusjonstrening. Drummond et al. (2008) så en økning i m-RNA (mRNA) til signalveier som assosieres med satellittcelleaktivering (cyclin D1, MyoD og myogenin) etter en økt med okklusjonstrening; og foreslår dette kan være nok til å aktivere satellittcellene ved okklusjonstrening. Wernbom et al. (2013) fant en økning i satellittceller per fiber én, 24 og 48 timer etter okklusjonstrening. Økningen var riktignok lik i kontrollbein som trente en matchet treningsøkt uten okklusjon.

Satellittcellenes rolle i muskelvekst vil bli tatt opp i kapittel 2.3.



## 2.2.6 Muskelsvelling

At muskelcellen sveller akutt etter okklusjonstrening kan være en stimulus til muskelvekst i seg selv (Haussinger, 1996), og er den eneste mekanismen som går igjen i alle studier som viser effekt av okklusjonstrening (Loenneke, Fahs, Rossow, Abe, & Bemben, 2012). Muskelsvelling kan skje ved at opphopningen av blod sørger for en endring i konsentrasjonsgradient av vann, som da vil trekke inn i muskelcellene ved passiv diffusjon (Frigeri, Nicchia, Balena, Nico, & Svelto, 2004). Loenneke et al. (2012) foreslår at en økning i intramuskulær konsentrasjon av metabolitter også vil få muskelcellen til å trekke inn vann slik at den oppnår ekvilibrium i osmotisk gradient med utsiden. Når cellen tar inn vann og øker størrelse vil en volum-sensor i cellemembranen plukke opp disse stimuli og aktivere signalveier videre (figur 2.3). Dette kan føre til en aktivering av både mammalian target of rapamycin (mTOR)- og mitogen activated protein kinase (MAPK)-signalering (Haussinger, 1996). Detaljer om hypertrofisignalering vil bli gjennomgått i kapittel 2.4.1.



**Figur 2.3:** Den foreslåtte linken mellom muskelsvelling og muskelvekst modifisert etter Haussinger (1996) og Loenneke et al. (2012).

## 2.2.7 Andre faktorer

I litteraturen er det nevnt en rekke forskjellige potensielle mekanismer og årsaker til muskelveksten man ser ved okklusjonstrening; av de som ikke har fått et eget underkapittel er heat shock proteiner (HSP) og myostatin de som har blitt undersøkt

mest. Kawada & Ishii, (2005) fant en assosiasjon mellom muskelvekst og HSP-72-mengde i rottemuskel etter et forsøk med kontinuerlig okklusjon (Kawada & Ishii, 2005). Siden HSP er assosiert med å kunne hindre nedreguleringsfaktorer<sup>1</sup> (Dodd, Hain, & Judge, 2009), foreslår forfatterne HSP-respons som en mulig mekanisme bak muskelveksten ved okklusjonstrening. I en nylig studie fant Cumming et al. (2014) en meget rask aktivering (translokering til cytoskjelett) av HSP-27 og  $\alpha$ B-crystallin i bein som trente okklusjonstrening, sammenlignet med kontrollbeinet som trente en matchet protokoll uten okklusjon. HSP70 ble også aktivert, men viste en noe tregere respons. HSP70 økte i totalmengde for beinet som trente okklusjonstrening, men ikke for kontrollbeinet. En annen interessant observasjon i denne studien var at HSP-responsen var mye tydeligere i type I-fibre enn i type II-fibre. Myostatin er et protein som er negativt for muskelvekst, og kan blant annet hemme økning av proteinsyntesehastighet gjennom inhibering av Akt-signalering. Manini et al. (2011) rapporterte ingen endring i myostatin-mRNA-ekspresjon åtte timer etter en økt med okklusjonstrening. Drummond et al. (2008) viste imidlertid en reduksjon i myostatin-mRNA åtte timer etter en økt med okklusjonstrening; noe som vil virke positivt for muskelveksten.

### 2.2.8 Oppsummering

Mange faktorer kan påvirke muskelveksten og mange mekanismer kan påvirke disse faktorene. Det samme gjelder for muskelvekst ved okklusjonstrening og jeg har her presentert en rekke potensielle mekanismer. Selv om enkelte mekanismer er viktigere enn andre, er det sannsynlig at alle utfører en viss påvirkning. De fleste av disse mekanismene må imidlertid gjennom enda ett steg før de faktisk kan gjøre en reell påvirkning på muskelveksten. Dette steget kalles celledesignalering, og er cellenes måte å kommunisere med hverandre og med omverden.

---

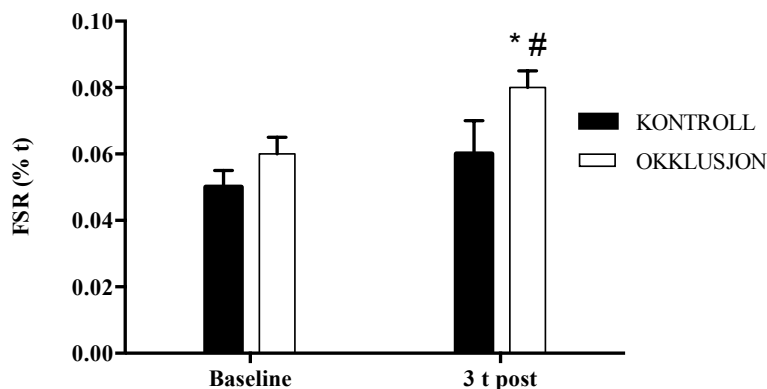
<sup>1</sup> Alle signaler som fremmer proteinnedbrytning og/eller inhiberer hypertrofisignaler.

## 2.3 Muskelvekst

For å oppnå muskelvekst må hastigheten på proteinsyntesen (MPS) overgå hastigheten til proteinnedbrytingen (MPB) over tid. Ettersom muskelveksten avgjøres av regnestykket proteinsyntese minus proteinnedbrytning, er det disse to faktorene som må påvirkes. Mitt hovedfokus i denne oppgaven vil omhandle påvirkning av syntesen. Hastigheten på syntesen blir i hovedsak påvirket av to ytre faktorer, muskelarbeid og ernæring; denne oppgaven vil kun omtale muskelarbeid. Styrketrening kan stimulere til muskelvekst ved mekaniske, metabolske og hormonelle prosesser (American College of Sports Medicine, 2009). Dette skjer enten ved et mekanisk drag i muskulaturen og/eller et metabolsk stress i muskelfibrene. Styrketrening leder til en rekke reaksjoner som til slutt påvirker genekspresjonen og hastigheten på proteinsyntesen. Muskelvekst skjer hovedsakelig gjennom en lokal økning i proteinmengde som til slutt sørger for en volumøkning i enkeltfibre. For at vi skal øke betydelig i muskelmasse, er det også viktig at antallet cellekjerener i muskelfibrene øker i takt med den voksende fiberen (Petrella et al., 2008). Cellekjernene innehar hele produksjonsmaskineriet for ribosomalt RNA (rRNA) og mRNA som er avgjørende for proteinsyntesen. Det er derfor viktig å opprettholde forholdet cellekjerener/fiberstørrelse (kjernedomene). Det ser riktignok ut som at muskelfibre kan oppnå noe hypertrofi uten at cellekjerneantallet endres (Kadi et al., 2004), men for vedvarende og betydelig muskelvekst må antall kjerner økes slik at kjernedomenet holdes relativt konstant (Petrella et al., 2008). Hastigheten på produksjonen av proteiner i muskelcellene kan reguleres i fire hovedsteg: før transkripsjonen, under transkripsjonen, ved translasjonen og etter translasjonen. Styrketrening kan påvirke DNA-strukturene og gjøre genene som koder for muskelproteiner mer tilgjengelige, og derfor enklere å lage mRNA av (Ehlert, Simon, & Moser, 2013). Etter at genene har blitt lokalisert må de bli oversatt til mRNA. Styrketrening påvirker dette ved å regulere transkripsjonsfaktorene som initierer hele transkripsjonsprosessen (Booth, Tseng, Flück, & Carson, 1998). Nå som cellen har en økt mengde mRNA, må disse avleses og omgjøres til ferdige proteiner. Dette betyr at translasjonsaktiviteten må økes for å få en funksjonell økning i proteinmengde. Trening kan påvirke translasjonen i alle sine steg og kan i tillegg øke antallet ribosomer (Hannan, Brandenburger, & Jenkins, 2003). Okklusjonstrening er vist å kunne øke hastigheten på proteinsyntesen (figur 2.4)(Fujita et al., 2007; Gundermann et al., 2012; 2014); presumtvt gjennom disse stegene.

Etter translasjonen må det nylagde proteinet transporteres til lokalisasjonen der

det skal fungere uten å bli nedbrutt. Styrketrening kan påvirke hastigheten på nedbrytningen ved å hemme nedbrytningsfaktorene som blant annet styrer ubiquitinerings, som gjør at proteiner blir merket for nedbryting. Hastigheten på nedbrytningen går opp etter en styrketreningsøkt, men i mindre grad enn syntesen; som er grunnen til at man øker i muskelmasse som følge av styrketrening over tid. Dette gjør at endring i proteinnedbrytning tradisjonelt er sett på som mindre utslagsgivende enn endring i proteinsyntese (Kumar, Atherton, et al., 2009a; Rennie et al., 2004); noe som også har vist seg å være tilfellet ved okklusjonstrening (Gundermann et al., 2014).



**Figur 2.4:** Endring i hastighet på proteinsyntesen før og etter okklusjonstrening eller kontrolltrening som var matchet uten okklusjon. \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ). #signifikant forskjellig fra kontrollbein ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Gundermann et al. (2014).

Regulering av både proteinsyntesen og nedbrytningen gjennom disse stegene er kontrollert av signalveier som plukker opp stimuli og sender signaler videre gjennom et system basert på fosforylering (Bolster, Kimball, & Jefferson, 2003).

## 2.4 Signalering

For at celler skal kunne endre seg til nye krav og forandringer er de avhengige av å kunne oversette stimuli til fysiske prosesser. For at muskelcellene skal vokse må de kunne tolke de signalene som kommer fra muskelarbeid og ernæringsstatus, og omdanne disse til fysiologiske adaptasjoner. Typiske signaler fra muskelarbeid er mekanisk og metabolsk stress, og stimuli fra vekstfaktorer som GH og IGF-1 (Coffey & Hawley, 2007; Miyazaki & Esser, 2009). Hormoner kan feste seg til reseptorproteiner i cellemembranen som ligger i kontakt med både innsiden og utsiden av cellen. Etter at stimuli har truffet/aktivert reseptorproteinet, vil signalet bli omgjort og sendt videre til signalmolekyler på innsiden av cellen. Signalmolekylene er proteiner som blir aktivert eller inaktivert av fosforylering<sup>2</sup> og defosforylering<sup>3</sup>. Molekylene som står for fosforyleringen kalles proteinkinaser og de som står for defosforyleringen kalles proteinfosfataser. Mange av signalmolekylene er i seg selv proteinkinaser som vil fosforylere neste signalmolekyl i rekken, når det først selv har blitt fosforylert (Alberts et al., 2010). Disse intramuskulære signalmolekylene jobber på en stafettlignende måte, helt til det treffer riktig effektorprotein som kan utføre oppdraget til signalet.

Mekanisk stress blir tolket av cellene gjennom mekanoreseptorer og andre signaler som kommer fra strukturer som er involvert i kraftoverføringen. En annen måte mekanisk stress kan føre til cellulære tilpasninger er gjennom frisetting av vekstfaktorer ved strekking av muskelcellen. Metabolsk stress stimulerer ofte gjennom endringer i konsentrasjon av molekyler som har vært involvert i energiprosesser som vil påvirke signalveier (se kapittel 2.4.1).

### 2.4.1 Hypertrofisignalering

Med hypertrofisignalering menes alle signaler som positivt endrer proteinsyntesen. For å øke hastigheten på syntesen må hypertrofisignalene overgå signalene som inhiberer de samme prosessene. Dette fungerer som en kontinuerlig dragkamp mellom signalene, der en overvekt av den ene gruppen vil avgjøre hastigheten på proteinsyntesen.

Transkripsjonen, mRNA-stabilitet, initiering, elongering og terminering av translasjonen er antakelig noen av de viktigste stegene som kan påvirkes av hypertrofisignalering.

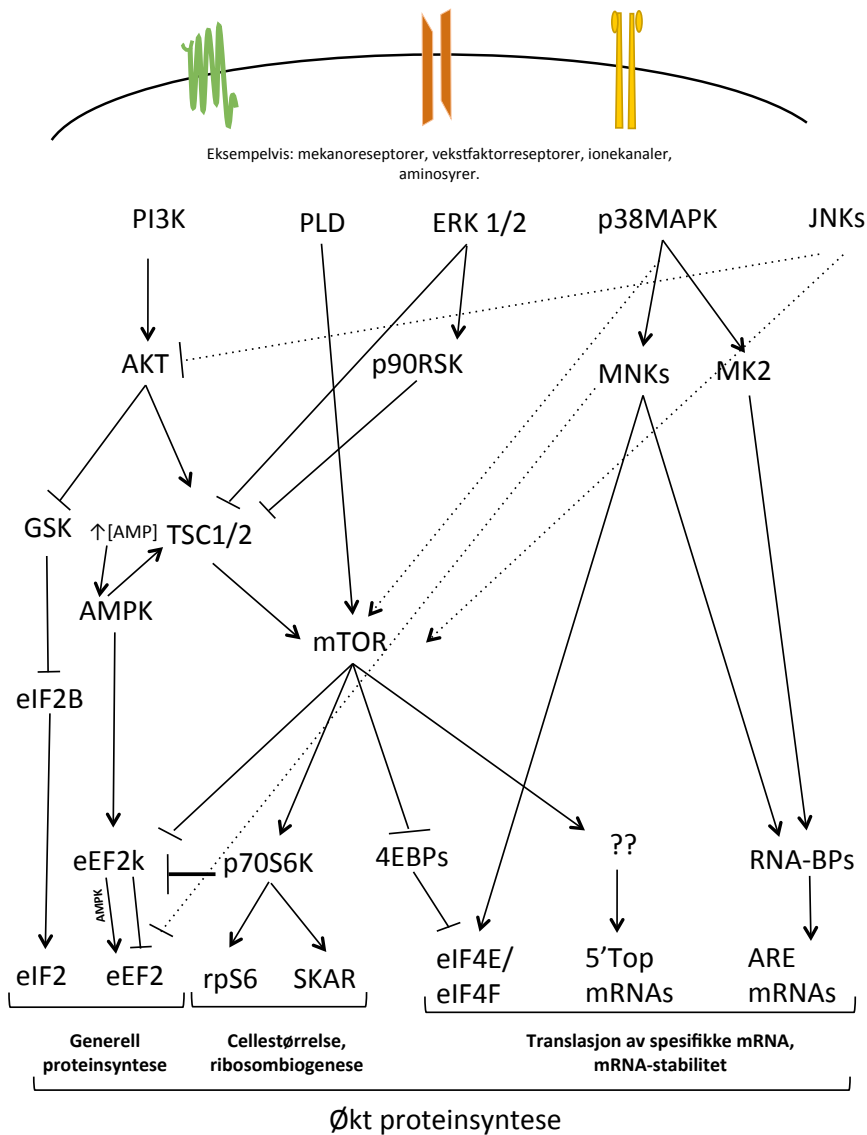
mTOR ser ut til å være den viktigste komponenten

---

<sup>2</sup> Addering av en fosfatgruppe til et molekyl eller protein.

<sup>3</sup> Fjerning av en fosfatgruppe fra et molekyl eller protein.

i hypertrofisignaleringen, og er foreslått å være dirigenten i orkesteret av signalveier som påvirker proteinsyntesen (Foster & Fingar, 2010; Proud, 2007). mTOR oppdager og integrerer forskjellige ekstra- og intracellulære signaler som enten promoterer anabole hendelser eller inhiberer katabole prosesser (figur 2.6)(Foster & Fingar, 2010). mTOR tolker signaler fra vekstfaktorer, mekaniske stimuli, energistatus og andre stressfaktorer (for eksempel hypoksi); og kan derfor aktiveres gjennom flere forskjellige signalveier (Foster & Fingar, 2010). En av disse signalveiene er phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt-veien. Etter aktivering vil PI3K fosforylere Akt, som fosforylerer mTOR, som igjen vil fosforylere sine nedstrøms effektorer (Bodine et al., 2001). I et forsøk med IGF-1-stimulert hypertrofi på cellekultur, ble både Akt- og mTOR-signalering blokkert da de inhiberte PI3K (ved bruk av inhibitor LY294002); dette førte også til et totalt fravær av hypertrofi (Rommel, Bodine, Clarke, & Rossman, 2001). Dette taler for at PI3K/Akt-veien ligger oppstrøms for mTOR, og at mTOR er avhengig av denne signalveien ved hypertrofi stimulert fra IGF-1. PI3K/Akt-veien ser også ut til å kunne aktivere mTOR gjennom tilgjengelighet av næringsstoffer (Peyrollier, Hajduch, Blair, & Hyde, 2000). Det er vist større Akt-aktivering når et gitt arbeid utføres med okklusjon sammenlignet med uten (Fry et al., 2010). Senere studier har imidlertid vist mTOR-aktivering ved trening, selv når PI3K/Akt-signalveien er blokkert; og dermed vist at denne veien sannsynligvis ikke er den viktigste aktiveringsmekanismen til mTOR ved mekanisk arbeid (Goodman et al., 2010; Hornberger, Sukhija, & Chien, 2006; Miyazaki, McCarthy, Fedele, & Esser, 2011). Hornberger et al. (2006) foreslår phospholipase D (PLD) som den primære aktiveringsmekanismen ved mekanisk arbeid. Siden PLD og sine isoformer befinner seg i strukturer som er involvert i kraftoverføring ved mekanisk arbeid; virker dette som en meget sannsynlig forklaring. PLD katalyserer hydrolysen av et fosfodiesterbånd av forsfatdylcholine og lager phosphatidic acid (PA) og choline; PA kan feste seg til FRB-setet på mTOR og sørge for fosforylering fra mTOR til sine nedstrøms effektorer (Jenkins & Frohman, 2005). Det ser også ut som mTOR kan bli aktivert av MAPK-relaterte proteiner som p38MAPK (figur 2.5) (Cully, Genevet, Warne, & Treins, 2010; Zheng et al., 2011)(se kapittel 2.4.4).



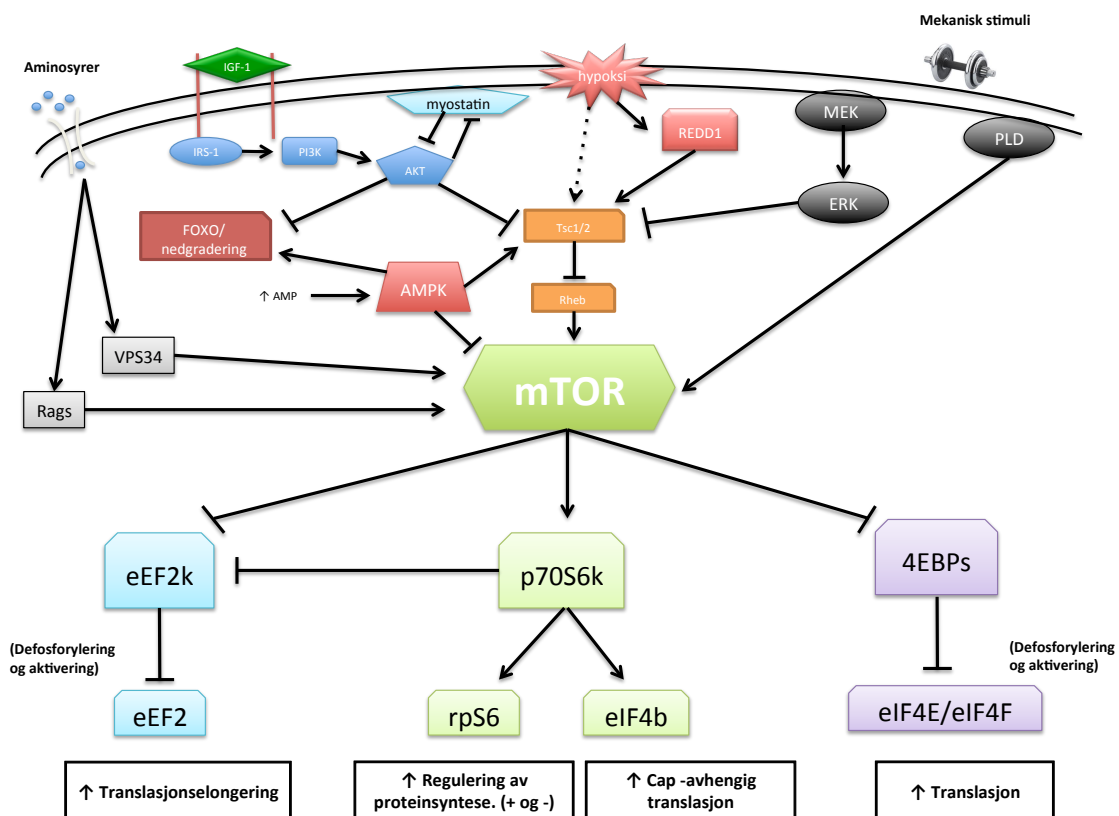
**Figur 2.5:** En forenklet oversikt over hypertrofisignaleringen. Modifisert etter Proud, (2007). Pil betyr at det er etablert en aktivering mellom proteinene. Butt pil betyr at det er etablert en inhibisjon mellom proteinene. Stripet linje betyr at det er foreslått en sammenheng, men har ikke konsensus NB: inhibisjon/defosforylering av eEF2k/eEF2 og 4EBPs/eIF4E/eIF4F er positivt for proteinsyntesen.

mTOR kan også bli regulert av hypoksi<sup>4</sup> (Liu et al., 2006). Brugarolas et al. (2004) viste at tuberous sclerosis complex (TSC) 1 og 2 sammen med REDD1<sup>5</sup> og Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) kan inhibere mTOR under hypoksi. Senere studier har vist

<sup>4</sup> Oksygenmangel.

<sup>5</sup> Signalprotein aktivert av hypoksi og annet stress. Negativ regulator av proteinsyntesen.

at inhibisjonen også kan være uavhengig denne signalveien, men heller gjennom cellenes metabolisme (Arsham, Howell, & Simon, 2003). HIF-1 $\alpha$  har imidlertid flere roller, og kan påvirke motsatt utfall ved å ligge nedstrøms for mTOR og påvirke syntesen positivt (Lunde et al., 2011). Dette taler for en regulatorisk rolle for HIF-1 $\alpha$  på hypertrofisignaleren under hypoksiske forhold (Liu et al., 2006). HIF-1 $\alpha$  er vist å kunne bli aktivert ved utholdenhetstrening med okklusjon (utført i oksygenkammer, 15-20 % reduksjon av arteriell blodstrøm), men ikke i større grad enn kontrollbein som gjorde samme protokoll uten okklusjon (Ameln et al., 2005). I en studie på rotter med kronisk okklusjons så Kawada & Ishii (2008) en tendens til økning av HIF-1 $\alpha$ . Drummond et al. (2008) viste derimot en nedgang av HIF-1 $\alpha$ -mRNA tre timer etter en økt med okklusjonstrening, med lik respons for kontrollgruppe som trente en matchet økt uten okklusjon.



**Figur 2.6:** Overblikk over de viktigste signalveiene opp- og nedstrøms for mTOR. Modifisert etter (Hornberger et al., 2006; Proud, 2007; Laplante & Sabatini, 2009; Liu et al., 2006; Miyazaki et al., 2011). Pil betyr at det er etablert en aktivering mellom proteinene. Butt pil betyr at det er etablert en inhibisjon mellom proteinene. Stripet linje betyr at det er foreslått en sammenheng, men har ikke konsensus.



Aktivering av mTOR ser ut til å være både tilstrekkelig og nødvendig for økning av proteinsyntesen i skjelettmuskulatur (Bodine et al., 2001; Goodman et al., 2010; 2011; Hornberger et al., 2006). mTOR påvirker muskelvekst gjennom sine nedstrøms effektorer; der de mest studerte er p70S6K, eEF2 og 4EBP (Proud, 2007). Effektene av fosforylering av p70S6K og eEF2 vil bli diskutert nærmere i de neste to underkapittel. mTOR ser ut til å være av stor betydning for muskelveksten man ser ved okklusjonstrening. En rekke studier har funnet økt fosforylering av mTOR ved okklusjonstrening (Fry et al., 2010; Gundermann et al., 2012; 2014); mens andre finner ingen endring i fosforylering (Fujita et al., 2007; Wernbom et al., 2013). Studiene som ikke ser en økt fosforylering av mTOR finner imidlertid en stor økning i p70S6K, noe som tyder på at mTOR i all sannsynlighet har vært aktiv.

Mitogen activated protein kinase-familien (MAPK) er en annen viktig hovedsignalvei for muskelvekst. MAPK-familien videreformidler et stort antall ekstracellulære signaler, og sørger for at celler kan tilpasse seg det fysiske og kjemiske miljøet rundt seg (Risco & Cuenda, 2012). MAPK-familien består av flere proteiner, der de mest studerte er p38MAPK, ekstracellulær reseptor kinase 1/2 (ERK 1/2) og jun NH<sub>2</sub> terminal kinase (JNK)(Krishna & Narang, 2008). MAPK-familien inneholder tre sekvensielle proteinkinaser som fosforylerer hverandre, en MAPK, en MAPK kinase (MAPKK) og en MAPK kinase kinase (MAPKKK)(Cargnello & Roux, 2011).

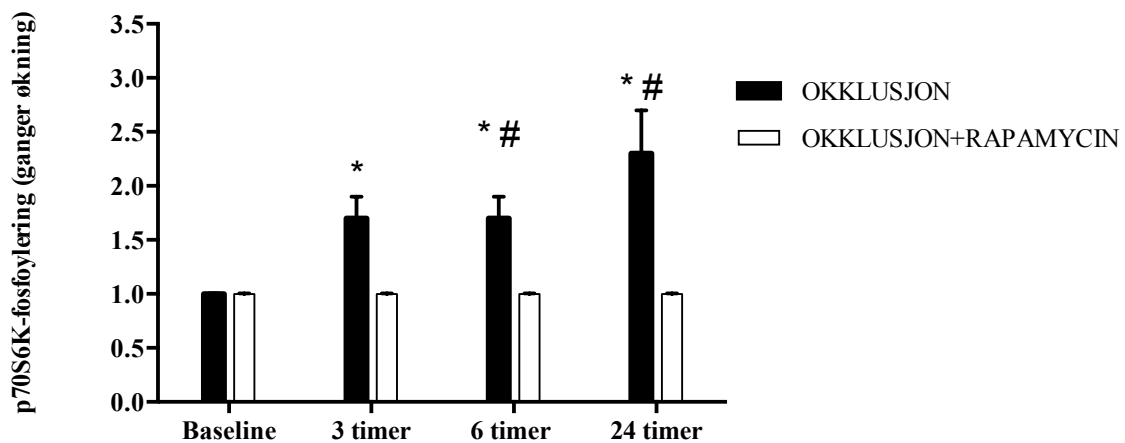
ERK1/2 tolker et stort antall ekstracellulære signaler som stressreaksjoner og vekstfaktorer (Pearson et al., 2001). ERK fosforylerer p90RSK (Richards, Dreisbach, Murphy, & Blenis, 2001) og MNK1/2 som de viktigste effektorene sine (Proud, 2007). Fry et al. (2010) fant en økning i fosforylering av ERK1/2 en time etter okklusjonstrening, noe som var signifikant forskjellig fra kontrollgruppe som gjorde matchet trening uten okklusjon. JNK blir aktivert av en rekke forskjellige eksterne stimuli som cytokiner, vekstfaktorer og stimulering fra enkelte g-protein-koblet reseptorer (GPCR)(Weston & Davis, 2007). Etter aktivering gjennomgår JNK translokasjon til nukleus der det kan påvirke transkripsjonsfaktorer og andre nukleære komponenter (Krishna & Narang, 2008). Det finnes flere andre hovedsignalveier for økning av proteinsyntesehastighet; Ca<sup>2+</sup> calmodulin-avhengig kinase/ calcineurin-veien er ett eksempel på dette. Videre vil inhibisjon av samtlige signalveier for nedbrytning virke positivt for akkumuleringen av proteiner. Nedreguleringsfaktorer kan øke nedbrytningen og samtidig hemme syntesen; det er til dags dato kun undersøkt proteinnedbrytning i én studie med okklusjonstrening.

Gundermann et al. (2014) viste ingen endring i nedbrytningshastighet seks eller 24 timer etter en økt med okklusjonstrening. Drummond et al. (2008) viste en nedgang i mRNA-ekspressjonen av nedreguleringsfaktorene myostatin og REDD1 etter okklusjonstrening. Manini et al. (2011) fant en nedregulering av mRNA til fork head box protein O (FOXO), atrogen1 og muscle ring finger box1 (MuRF1), som alle fasiliterer nedbrytning (Manini et al., 2011). Fry et al. (2010) fant derimot ingen forskjell i fosforylering av REDD1 og AMPK. Litteraturen er foreløpig begrenset når det gjelder forskning på nedreguleringsfaktorer ved okklusjonstrening, og er derfor noe det bør satses på i årene som kommer.

#### **2.4.2 p70S6K**

p70S6K-signalering spiller en prominent rolle i kontrollen av celledyrking og er et av de viktigste signalproteinene nedstrøms for mTOR (Hornberger et al., 2006). Det er generelt akseptert at p70S6K aktiveres i hovedsak av mTOR (Laplanche & Sabatini, 2009), men i enkeltstudier har p70S6K blitt fosforylert selv ved en hemming av mTOR gjennom en spesifikk inhibitor (Torin1) (Liu, Vertommen, Rider, & Lai, 2013). Fosforylering av p70S6K øker i etterkant av tradisjonell styrketrening (Kumar, Selby, et al., 2009b; Ogasawara et al., 2013; Terzis et al., 2008), og når sitt høyeste punkt etter ca. tre timer (Ogasawara et al., 2013); økningen er vist opptil seks timer etter trening, men er normalt tilbake til baseline etter 24 timer. Selv om det finnes studier som ikke har observert endring (Coffey & Hawley, 2007), virker det meget trolig at p70S6K fosforylering øker i forbindelse med tradisjonell styrketrening. Studier har vist korrelasjon mellom fosforylering av p70S6K og økning i proteinsyntese etter én økt med tradisjonell styrketrening (Dreyer et al., 2008; 2006; Terzis et al., 2008). Denne økningen i proteinsyntese resulterte også i hypertrofi, som også korrelerte med fosforylering av p70S6K (Terzis et al., 2008). p70S6K er derfor foreslått å kunne ha en rolle som akutt markør for muskelvekst ved styrketrening. p70S6K blir aktivert av mTOR og blir derfor fosforylert gjennom de samme signalveiene. p70S6K blir dermed hovedsakelig aktivert gjennom vekstfaktorer, næringsstatus og mekanisk stimuli (Glass, 2005; Goodman et al., 2011; Hornberger et al., 2006). p70S6K virker gjennom sine nedstrøms effektorer der ribosomal protein S6 (rpS6), elongeringsinitieringsfaktor 4B (eIF4B) og eEF2 kinase (eEF2k) ser ut til å være de viktigste (Ruvinsky & Meyuhas, 2006). p70S6K fosforylerer eIF4B (Holz, Ballif, Gygi, & Blenis, 2005) som etter fosforylering assosierer seg med translasjons-preinitierings-

komplekset og danner par med elongerings-initieringsfaktor 4A (eIF4A) (Rogers, Richter, Lima, & Merrick, 2001). Dette beskriver en rolle for p70S6K i translasjonsinitieringen. p70S6K kan også påvirke elongeringssteget i translasjonen gjennom fosforylering av eEF2k (se kapittel 2.4.3) (Pende et al., 2004; Wang et al., 2001). p70S6K fosforylerer også rpS6 (Ruvinsky & Meyuhas, 2006), som ser ut til å ha en inhiberende rolle for translasjonen, dette for å kunne finkoordinere proteinproduksjonen (Ruvinsky et al., 2005).



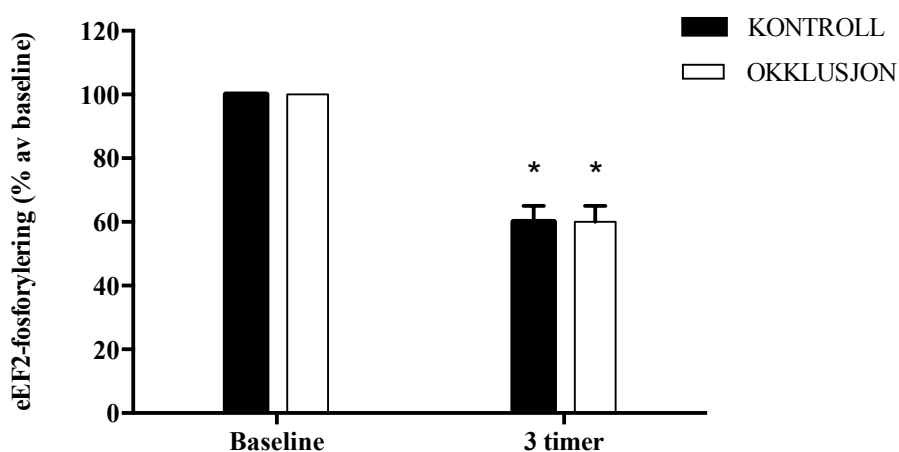
**Figur 2.7:** Økning i p70S6K-fosforylering. \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ). #signifikant forskjell mellom gruppene ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Gundermann et al. (2014).

Flere studier har undersøkt fosforylering av p70S6K ved okklusjonstrening. Wernbom et al. (2013) fant en signifikant økning én og 24 timer etter økten; men ingen endring 48 timer etter (Wernbom et al., 2013). Fujita et al. (2007) så en signifikant økning tre timer etter økt. Den samme økningen så man i en gruppe av eldre menn, som også hadde økt fosforylering én og tre timer etter økten med okklusjonstrening (Fry et al., 2010). Gundermann et al. (2012) fant ikke endring i fosforylering etter én time, men fant en økning tre timer etter økten (Gundermann et al., 2012). I en studie fra 2014 viste Gundermann et al. økning i fosforylering tre, seks og 24 timer etter okklusjonstrening (figur 2.7). Den ene gruppen inntok mTOR-inhibitoren rapamycin, mens den andre fungerte som en normal kontrollgruppe. Kontrollgruppen hadde signifikant økning i både mTOR og p70S6K ved tre, seks og 24 timer etter økt, mens rapamycingruppen hadde ingen endring ved noen tidspunkt. Inhiberingen av mTOR-p70S6K-veien førte til totalt fravær av økning i proteinsyntese i rapamycingruppen, mens kontrollgruppen

opplevde en økning på 42 % etter en time og 69 % 24 timer etter treningsøkten, sammenlignbart med økningen sett ved tradisjonell styrketrening (Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997). Dette beskriver en sentral rolle for mTOR i effektene vi observerer etter okklusjonstrening.

### 2.4.3 eEF2

eEF2 må være defosforylert for at elongeringssteget i translasjonen skal kunne skje. Translokasjon av transport RNA (tRNA) fra A-setet til P-setet i ribosomet krever at eEF2 ikke er bundet til ribosomet, som igjen krever at det defosforyleres (Carlberg & Nilsson, 1990; Ryazanov & Davydova, 1989). I motsetning til de fleste andre signalproteinene i hypertrofisignaleringen er eEF2 derfor positiv for proteinsyntesen når det er defosforylert. eEF2 er også uvanlig fordi det er styrt av en meget spesifikk kinase som bestemmer i hvor stor grad den er fosforylert (Proud & Browne, 2002). eEF2 blir defosforylert ved fosforylering (inhibering) av eEF2k, slik at nøkkelen til kontroll over eEF2 ligger i fosforylering av eEF2k. eEF2k ligger nedstrøms for mTOR-p70S6K, men blir også påvirket av MAPK/RSK-veiene. Wang et al. (2001) viste at eEF2k blir inhibert av p70S6K og p90RSK1. Mens Knebel et al. (2001) viste en inhibering av eEF2k av p38MAPK $\delta$  (også kalt stress-aktivert protein kinase 4, SAPK4). Samme gruppe har også vist en inhibering av eEF2k som følge av tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ )-aktivering (Knebel, Haydon, Morrice, & Cohen, 2002). Samlet viser disse funnene at eEF2k ligger sentral i to av hovedsignalrutene for hypertrofi, og er regulert av mange forskjellige ytre stimuli som påvirker muskelvekst.



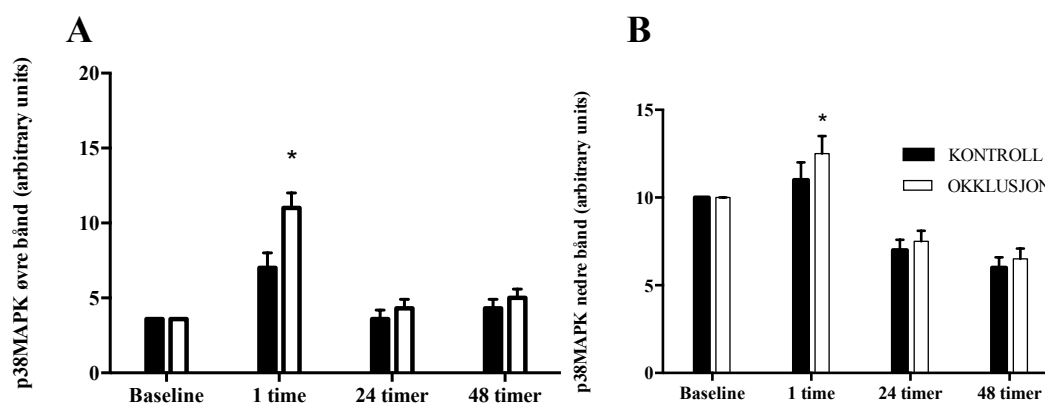
**Figur 2.8:** Endring i eEF2-fosforylering etter okklusjonstrening. \*signifikant forskjell fra baseline ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Fujita et al. (2007).

De fleste studier finner en redusert fosforylering av eEF2 som følge av en tradisjonell styrketreningsøkt (Apro, Wang, Ponten, Blomstrand, & Sahlin, 2013), men ikke alle finner forskjell (Walker et al., 2013). Det interessante med studien til Walker et al. (2013) er at de finner ingen respons i eEF2 på tross av en økt fosforylering av både mTOR-p70S6K-veien og av ERK1/2; noe som tyder på en tredje hovedsignalvei for eEF2. Ved okklusjonstrening har eEF2-respons blitt undersøkt i fire studier, den ene (Fujita et al., 2007) fant en defosforylering av eEF2 tre timer etter okklusjonstrening (figur 2.8). Kontrollgruppen som trente en matchet treningsøkt uten okklusjon fikk riktignok den samme effekten (ibid.). Wernbom et al. 2013 viste ingen forskjell i eEF2-fosforylering én time etter okklusjonstrening og heller ikke Fry et al. (2010) eller Gundermann et al. (2012) fant noen endring i eEF2-fosforylering én og tre timer etter en økt med okklusjonstrening.

#### **2.4.4 p38MAPK**

p38MAPK er et protein i MAPK-familien og anses som en av de viktigste signalproteinene i mange forskjellige typer celler. Aktivering av p38MAPK øker størrelsen på enkelte typer celler i menneskekroppen, og inhibering av p38MAPK reduserer størrelsen i de samme cellene (Cully et al., 2010). Dette gjør p38MAPK til et interessant protein å undersøke i forbindelse med okklusjonstrening. p38MAPK består av fire forskjellige isoformer, alfa, beta, gamma (også kjent som SAPK3) og delta (også kjent som SAPK4). Disse har relativ lik struktur, men kan ha forskjellige (og motsatte) oppgaver (Boppart, Asp, & Wojtaszewski, 2000). I litteraturen er det dessverre få som oppgir hvilken isoform de har undersøkt, men heller omtaler samtlige som p38MAPK eller bruker antistoff som merker samtlige isoformer samtidig. Siden p38MAPK blir aktivert av en rekke forskjellige typer stimuli, kan det påvirke mange forskjellige prosesser i cellen (Cargnello & Roux, 2011). Stress i cellemiljø, inflammatoriske cytokiner, oksidativt stress, UV-stråling, hypoksi, interleukin-1 (IL-1) og TNF- $\alpha$  blir alle nevnt som mulige oppstrøms regulatorer for p38MAPK (Cargnello & Roux, 2011). Forsøk på rottemuskel har vist en økning av p38MAPK-fosforylering ved mekanisk stress (Wretman et al., 2001), som er en av de viktigste stimuli ved muskelarbeid. p38MAPK $\gamma$  er foreslått å være en viktig regulator for metabolske adaptasjoner i skjelettmuskel (Pogozelski et al., 2009); og er i forbindelse med dette aktivert etter utholdenhetsaktivitet (Boppart et al., 2000). Den er også foreslått å kontrollere størrelsen på ST-fibre (Foster, Tidball, & Wang, 2012). p38MAPK $\alpha$  er vist i

de samme studiene å ikke bli fosforylert ved utholdenhetstrening (Foster et al., 2012; Pogozelski et al., 2009). Den ser heller ut til å ha en koordinerende rolle for samtlige isoformer, og kan blant annet hemme p38MAPK $\gamma$  når den blir fosforylert (Qi et al., 2007). Denne egenskapen innehar riktignok også p38MAPK $\gamma$ , som kan inhibere p38MAPK $\alpha$ ; men kun gjennom høy mRNA-konsentrasjon i samme celle, og ikke gjennom fosforylering (ibid.). Ved aktivering gjennomgår p38MAPK translokasjon fra cytosol til nukleus der det i større grad kan påvirke DNA og transkripsjonen; det er riktignok motstridende funn om hvor stor del av p38MAPK dette gjelder (Krishna & Narang, 2008). p38MAPK virker gjennom sine nedstrøms kinaser, der de viktigste ser ut til å være MK2 og MK3. MK2 er vist å kunne stabilisere mRNA etter transkripsjon (Dean, Sully, Clark, & Saklatvala, 2004; Winzen et al., 1999), noe som vil fasilitere økning i proteinsyntesehastighet. MK2 og MK3 har vist å kunne hemme fosforyleringen av eEF2 som igjen vil øke translasjonshastigheten (kapittel 2.4.3). Det ser ut som det er nødvendig med et minimumsnivå av p38MAPK-aktivitet for at mTOR skal kunne aktiveres av vekstfaktorer (Cully et al., 2010). p38MAPK er også vist å kunne aktivere mTOR-p70S6K gjennom aktivering av hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(Zheng et al., 2011). Oppsummert ser det ut som p38MAPK kan kontrollere celledørrelse via to forskjellige hovedmekanismer, mTOR og MK2 (Cully et al., 2010). p38MAPK ser ut til å kunne påvirke proteinsyntesen ved remodulering av kromatin, økt transkripsjon, stabilisering av mRNA og økt translasjon (Cully et al., 2010; Krishna & Narang, 2008; Proud, 2007).



**Figur 2.9:** Økning i p38MAPK øvre bånd (antatt å være p38MAPK $\gamma$ ; A) og p38MAPK nedre bånd (antatt å være p38MAPK $\alpha$ ; B) \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ) Modifisert etter Wernbom et al. (2013).

p38MAPK-fosforylering øker ved tradisjonell styrketrening. Franchi et al. (2014) viste en økning i p38MAPK-fosforylering (isoform ikke beskrevet) akutt etter en økt med ren eksentrisk styrketrening; men ikke ved kun konsentrisk styrketrening. Hulmi et al. (2010) viste en økning i p38MAPK $\alpha$ -fosforylering ved både maksimal (15x1 RM) og mer tradisjonell styrketrening (5x10 RM). p38MAPK $\gamma$  viste i samme studie en økning ved den tradisjonelle protokollen, men ikke etter den maksimale. p38MAPK har i forbindelse med okklusjonstrening kun blitt undersøkt ved ett tilfelle. Wernbom et al. (2013) observerte en signifikant økning av fosforylering for både øvre og nedre bånd en time etter trening, men ingen endring ved verken 24 eller 48 timer (figur 2.9). Øvre bånd er antatt å være gamma, mens det nedre er antatt å være alfa (Mathias Wernbom, personlig kommunikasjon, 2014). Ozaki et al. (2014) fant en økning i p38MAPK (isoform ikke nevnt) tre timer etter gange med okklusjon (Ozaki et al., 2014). Selv om ikke p38MAPK er direkte målt i flere studier ved okklusjonstrening, har flere undersøkt dens effektor Mnk1. I en studie fra 2012 fant Gundermann et al. en økning av Mnk1-fosforylering tre timer etter en økt med okklusjonstrening. Mens Fry et al. (2010) så en signifikant økning én og tre timer etter okklusjonstrening i en gruppe eldre menn.

#### **2.4.5 Oppsummering**

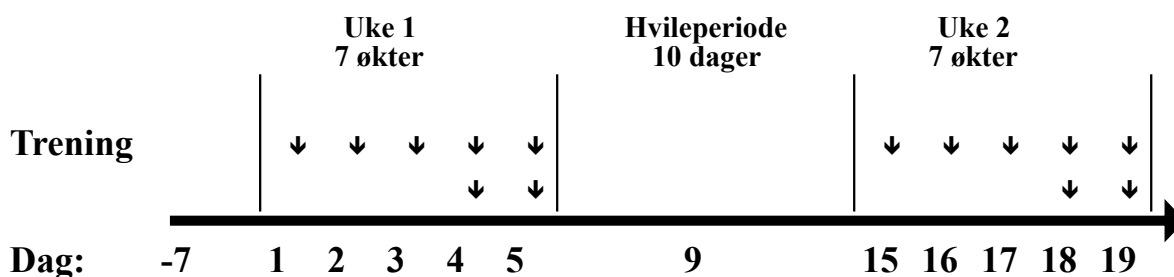
Det er tydelig at okklusjonstrening aktiverer hypertrofisignalering og muligens i samme grad som tradisjonell styrketrening. Aktiveringen av hovedveiene mTOR og MAPK kan være en av de viktigste mekanismene for muskelvekst ved okklusjonstrening. Det begynner å bli etablert at både mTOR og MAPK kan aktiveres av denne typen trening; og det kan tyde på at det kreves en aktivering av begge disse hovedveiene for optimal stimulus og muskelvekst. For å se på signaleringen i første og andre treningsuke har vi i denne studien undersøkt fosforylering av eEF2, p70S6K og p38MAPK $\gamma$ /p38MAPK $\alpha$ . Signalering er imidlertid ett av de første stegene fra muskelarbeid til muskelvekst og en lang rekke prosesser kan påvirke sluttresultatet i etterkant.

### 3. Metode

Datainnsamlingen til denne masteroppgaven var en del av prosjektet «Okklusjon 3» som ble gjennomført ved Norges Idrettshøgskole høsten 2013.

#### 3.1 Studiedesign

I forkant av treningsperiodene gjennomførte forsøkspersonene tilvenning og pretester. Etter en ukes pause startet første treningsperiode der de trente syv økter i løpet av fem dager (figur 3.1). Deretter fulgte en ti dager lang hvileperiode før de igjen gjennomførte syv økter fordelt på fem dager. Samtlige forsøkspersoner som fullførte deltok på alle 14 treningsøktene.



Figur 3.1: Tidsoversikt over treningsøktene i intervensjonen.

##### 3.1.1 Utvalg

Til sammen tolv forsøkspersoner (tabell 3.2) meldte seg frivillig til studien. Tre forsøkspersoner trakk seg i løpet av intervensjonsperioden. Forsøkspersonene som trakk seg oppga smerte i forbindelse med biopsitakning og ekstrem stølhet i etterkant av trening som grunn. Disse er ikke inkludert i datagrunnlaget. For å kunne delta i studien måtte forsøkspersonene oppfylle inklusjonskriteriene (tabell 3.1). En forsøksperson (FP 10) er ekskludert fra tallmaterialet for analyser av fosforylering, CK og myoglobin. Dette på grunn av høye CK-verdier i forkant av akutt dag 1 (figur 4.4) som antyder på at forsøkspersonen har gjort et anstrengende arbeid dagene i forveien. Dette kan påvirke signaleringen og ville ikke vært representativt.



**Tabell 3.1:** Inklusjons –og eksklusjonskriterier for deltagelse i studien

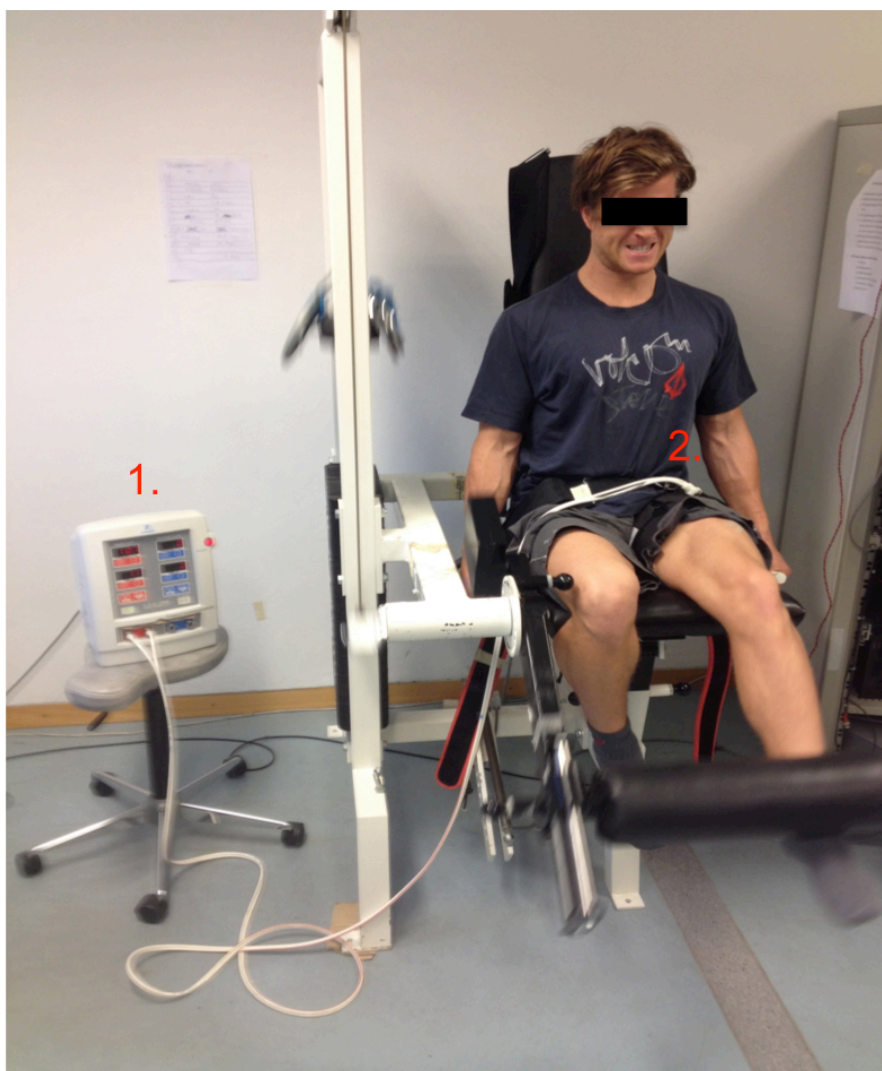
• Inklusjonskriterier	• Eksklusjonskriterier
<ul style="list-style-type: none"><li>- Menn og kvinner mellom 20 og 35 år</li><li>- Ikke drevet med regelmessig styrketrening på lårmusklene de siste seks måneder (<math>\leq</math> en økt hver annen uke).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Skader i muskel-skjelettapparatet som kan hindre gjennomføring av trening.</li><li>- Bruk av medikamenter og/ eller kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende) under treningsperioden</li></ul>

Det ble rekruttert forsøkspersoner fra vitenskapelige institusjoner i Oslo-området. Rekrutteringen ble utført gjennom sosiale medier, studentmail, informasjon i forelesninger, plakater og ved stand på de forskjellige institusjonene. Det ble i forkant av studiet holdt informasjonsmøte og alle forsøkspersoner fikk utdelt skriftlig informasjon om studien (vedlegg 1).

**Tabell 3.2:** Antropometriske data av forsøkspersonene. Verdiene er i gjennomsnitt og standardavvik.

	Gutter	Jenter
Antall (n)	6	3
Alder (år)	24,5 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2
Høyde (cm)	182 $\pm$ 7	173 $\pm$ 5
Vekt (kg)	85 $\pm$ 10	67 $\pm$ 2

### 3.1.2 Treningsprotokoll

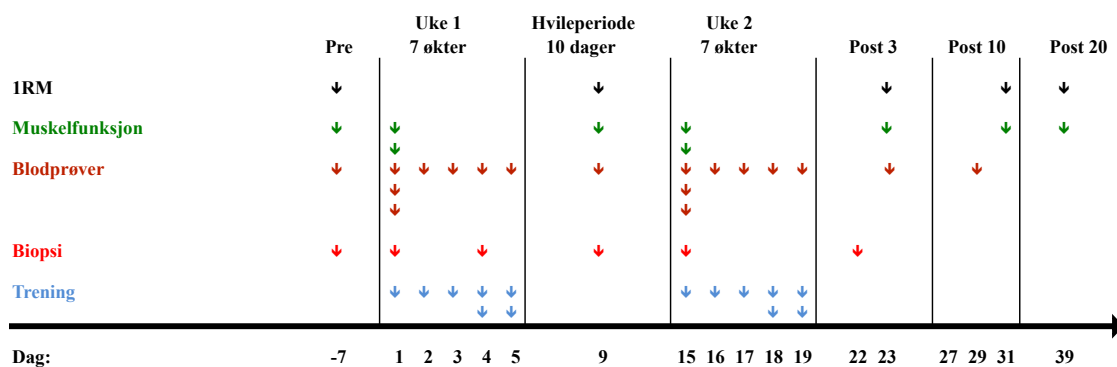


**Figur 3.2:** Treningsoppsettet (1. Datastyrt torniquetsystem. 2. 150 mm bred pneumatisk mansjett).

Forsøkspersonene gjennomførte en kort oppvarming (15 repetisjoner med 5 kg motstand, uten mansjetten oppblåst) før de fikk trykkmansjetten plassert proksimalt på låret; og gjennomførte fire serier med unilateral kneekstensjon ved en belastning på 20 % av 1 RM til utmattelse. Pausene mellom seriene var 30 sekunder. Høyre bein ble trent før venstre, adskilt med fem minutters pause. Mansjettrykket ble opprettholdt under hele gjennomføringen, og ble sluppet opp umiddelbart etter det fjerde settet var gjennomført. Hastighet på muskelaksjonene var satt til ett sekund konsentrisk og ett sekund eksentrisk, kontrollert ved hjelp av en metronom (KORG METRONOME MA-30. Kina). Bevegelsesutslag var satt til å være fra 90 til 10° (0° = full ekstensjon). Forsøkspersonene fikk prøve mansjetten i forkant av treningsøkene, men ingen

tilvenning av trening ble gjennomført. Mansjetten var 150 millimeter bred, med 135 millimeter brede trykksoner (9-7350-003, Delfi Medical, Vancouver BC, Canada) og var koblet opp til et datastyrt tourniquetsystem (Zimmer A.T.S. 2000, USA). Dette kontrollerte at trykket ble holdt tilnærmet konstant under gjennomføringen av treningen. Trykket i mansjetten ble satt til 100 mmHg for guttene og 90 mmHg for jentene. Manuelle håndpumper (VMB Medizintechnik GmbH, Germany) var hele tiden klar som reserve, dersom det automatiske systemet skulle svikte. For å undersøke endring i blodstrøm ved oppblåst mansjett ble et dopplersystem (Vivid 7, GE Vingmed Ultrasound, Horten) brukt. Blodstrømmen ble målt like distalt for mansjetten i *a.femoralis* og *a.superficialis* både med og uten okklusjon. Gjennomsnittlig reduksjon i blodstrøm var  $66\pm 13\%$  og  $64\pm 17\%$ , henholdsvis før og etter intervensjonen.

### 3.2 Styrketester



**Figur 3.3:** Oversikt over tidspunkt for testing og trening gjennom hele intervensjonen. Muskelfunksjon = maksimalt isokinetisk dreiemoment.

Forsøkspersonene utførte en tilvenningstest, og en pretest i forkant av treningsperioden. Høyeste verdi fra disse testene ble brukt som baselineverdi, og for å regne ut treningsbelastning. Individuelle innstillinger av styrkeapparatene ble registrert under tilvenning, og brukt ved senere testing. Styrketestene ble innledet med en generell oppvarming bestående av fem minutter sykling der wattbelastning ble notert for å kunne bruke samme belastning ved senere testing.

### 3.2.1 Isokinetisk kneekstensjon

Den isokinetiske<sup>6</sup> testen ble gjennomført i styrkedynamometer (HUMAC 2009NOMR CSMi. Testing and Rehabilitation System. USA; figur 3.4). Oppvarmingen bestod av fire sammenhengende isokinetiske repetisjoner ved 60 grader per sekund, der forsøkspersonene gradvis økte kraften. Testen ble gjennomført med samme hastighet og totalt tre sammenhengende repetisjoner. Bevegelsesutslaget var totalt 95 grader, fra 95 grader fleksjon til full ekstensjon.



*Figur 3.4: Styrkedynamometer*

---

<sup>6</sup> Bevegelse med konstant hastighet

### **3.2.2 1 RM kneekstensjon**

1 RM-testen ble gjennomført i kneekstensjonsapparat (GYM 2000 Gym Equipment, Geithus, Norge) og ble påbegynt umiddelbart etter den isokinetiske testen. Seterygg og fotpute ble individuelt justert. En sikkerhetssele ble festet rundt livet under testing og forsøkspersonene ble instruert til å holde armene langs sidene. Høyre bein ble testet før venstre, uten pause i mellom. Oppvarmingen ble gjennomført med tre serier med henholdsvis ti (50 % av 1 RM), seks (70 % av 1 RM) og tre repetisjoner (80 % av 1 RM). For at 1 RM skulle godkjennes måtte kneleddet nå en vinkel på  $10^\circ$  eller lavere ( $0^\circ$  = full ekstensjon) fra en startvinkel på  $90^\circ$ . For å kontrollere dette ble høyden på vektmagasinet kontrollert mot et referansepunkt på apparatet. Den høyeste vekten forsøkspersonene klarte å løfte i én godkjent repetisjon, ble registrert som deres 1 RM. Den høyeste verdien fra baseline-testene av 1 RM ble benyttet til å regne ut treningsbelastningen (20 % av 1 RM), og ble ikke justert ved senere testing i treningsperioden.

### **3.3 Akuttdagene**

Den første treningsøkten begge treningsukene ble gjennomført som et akutforsøk der vi testet muskelkraft og tok blodprøver før og etter treningsøkten. Forsøkspersonene fikk selv velge en normalt sammensatt frokost da de ankom laboratoriet ved akuttdag 1. Denne frokosten ble notert og forsøkspersonen spiste et identisk måltid ved akuttdag 2. Forsøkspersonene ble testet for isokinetisk dreiemoment i det beinet som ikke ble tatt biopsi av. Hvilket bein som skulle gjennomgå styrketesting og biopsi ble byttet til akuttdag 2. Biopsi ble tatt nøyaktig 60 minutter etter at treningsøkten for det aktuelle beinet var over. Blodprøve 2 ble tatt rett i forkant av biopsi, mens blodprøve 3 ble tatt tre timer etter økten var ferdig (tabell 3.3).

**Tabell 3.3:** Oversikt over tidsforløpet ved akutt dagene.

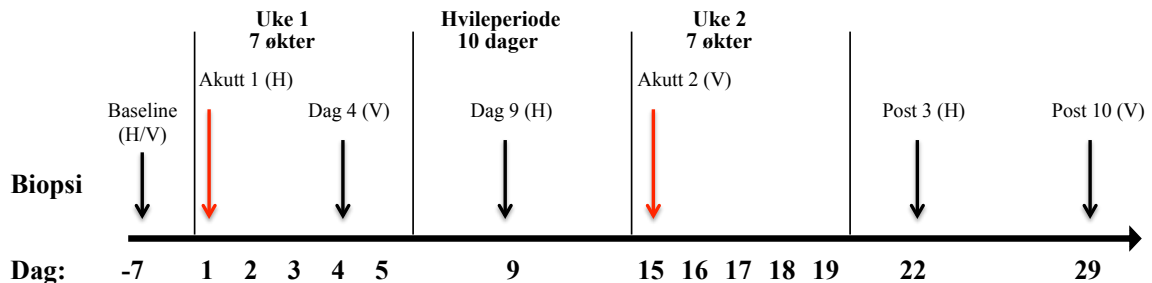
<b>Tid (t):</b>	<b>Hva:</b>
-02:00	Frokost
-01:30	Ultralyd 1
-01:00	Isokinetisk og isometrisk dreiemoment 1
-00:30	Blodprøve 1
00:00	Okklusjonstrening
00:30	Ultralyd 2
01:00	Blodprøve 2
01:30	Biopsi
02:00	Isokinetisk og isometrisk dreiemoment 2
02:30	Lunsj
03:00	-
03:30	Blodprøve 3

### **3.4 Blodprøver**

Venøse blodprøver ble tatt fastende på morgenen ved hver treningsdag; ved testing i hvileuken, og ved testing post 3 og post 10 (figur 3.3). I tillegg ble det tatt to blodprøver rett i etterkant av trening ved akutt dagene (tabell 3.3). Serumprøvene ble sentrifugert ved 2100 g i 10 minutter i fire °C, serumet ble så frosset i -80 °C for oppbevaring før videre analyser. CK ble analysert på analyseplattform Modular Analyser P800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) og myoglobin på analyseplattform Modular Analyser E170 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland). Analytisk variasjonskoeffisient er beregnet til å være 5 % for CK-analysene og 6 % for myoglobinanalysene. CK og myoglobin i serum ble analysert ble utført ved Rikshospitalet (Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus Rikshospitalet, Oslo).

### 3.5 Muskelbiopsier

For å studere endringer på cellenivå ble det tatt vevsprøver av *m.vastus lateralis* før, under og etter intervensjonen. Det ble tatt biopsier fra begge bein (figur 3.6)



**Figur 3.5:** Tidspunkt for biopsitakning, hvilket ben biopsien er tatt fra i parentes. Svart pil= biopsi tatt enten før, eller ikke i forbindelse med trening; rød pil= biopsi en time etter trening.

Biopsiene ble tatt fra *m.vastus lateralis*. Hud og muskelfacie ble bedøvet (Xylocain-adrenaline,  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} + 5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , AstraZeneca, Södertälje, Sverige) før biopsiområdet ble vasket med desinfiserende væske. Et 15-20 millimeter snitt gjennom huden og muskelfascien ble gjort med skalpell. Muskelvevet ble hentet ut med en seks millimeter steril Bergstrømsnål koblet til en 50 milliliter sprøyte. Det ble tatt ut 200-300 milligram muskelvev per biopsi. Muskelbiopsiene ble vasket ren for blod før eventuell bindevev og fett ble dissekert bort. Muskelvev til immunhistokjemi ble ikke vasket før de ble skåret til. Muskelvevet ble deretter fordelt til senere analyser; mRNA, elektronmikroskopi (EM), fosforylering, i tillegg til to restbiter. Bitene med mest parallelle og rette fibre ble skåret vinkelrett med barberblad, og lagt i en form med stabiliserende lim (Tissue-tek, O.C.T. compound, Sakura, Nederland). Biopsiene ble umiddelbart nedfrost i forhåndskjølt ( $-140^{\circ} \text{C}$ ) isopentan. Muskelbitene ble deretter lagt i kryostat (CM 3050, Leica Microsystems; Nussloch, Tyskland) ( $-22^{\circ} \text{C}$ ), før de ble de ble lagret i ultrafryser ( $\sim -80^{\circ} \text{C}$ ). Vev som skulle homogeniseres ble fryst i isopentan nedkjølt på tørris ( $-78^{\circ} \text{C}$ ) eller direkte i flytende nitrogen.

#### 1.1.1 Homogenisering

Inntil homogeniseringen ble biopsiene oppbevart ved  $-80^{\circ} \text{C}$ . Biopsiene ble homogenisert med en homogeniseringsbuffer som bestod av én milliliter Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER, Thermo scientific, Rockford, IL, USA),  $20 \mu\text{l}$  Halt<sup>TM</sup> Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) og

20 µl EDTA (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) per 50 µg muskel. Rett i etterkant av tilsetting av homogeniseringsbuffer ble prøvene homogenisert i tre ganger fem sekunder, eller til alt muskelvevet var løst opp. Prøvene lå på is i ti sekunder mellom hver runde med homogenisering. Etter homogenisering ble prøvene lagt på svak risting i 30 minutter ved fire grader celcius. Prøvene ble så sentrifugert i fem minutter ved 10000 G i en temperatur på fire grader celcius. Supernatantet ble fjernet, før prøvene på nytt ble sentrifugert på samme måte. Det nye supernatantet ble fjernet, og prøvene ble ristet. Prøvene ble alikvotert med 20 µl i rør på 0,2 ml og lagret i ultrafryser ved -80° C.

### **3.6 Muskelanalyser**

#### **3.6.1 Kvantifisering av muskelfiberareal**

Et lysmikroskop (Olympus BX61, Japan) tilkoblet en fluoriserende lyskilde (EXFO, X1120PC-Q, Canada) med tilhørende digitalt kamera (Olympus DP72, Japan) og programvare Cell-F software (Olympus, Japan) ble benyttet til å kvantifisere snittene fra biopsiene. Det ble først tatt ett bilde av snittet med fire ganger forstørrelse. Bildet ble tatt med et filter som slipper gjennom lys fra cellemembran-merkning (laminin); slik at man kan skille fibrene fra hverandre. Bildet ble invertert i Cell-F før det ble skrevet ut på papir og fungerte som et kart over snittet. Telling av fibre ble gjort manuelt ved bruk av bildekartet og et telleapparat (Laboratory Counter). For mer utfyllende protokoll, se Løvstad, Masteroppgave (2014).

#### **3.6.2 Totalproteinmåling**

Proteininnholdet i muskelbiopsiene ble målt med RC/DC Protein Assay kit (BioRad, cat# 500-0121, Hercules, CA, USA) og bovine  $\gamma$ -globulin som standardprotein med et spekter fra 0,125 til 1,5 mg\*ml<sup>-1</sup>. Proteinstandardkurven og prøvene ble målt i triplikater og med en standardkurve  $r^2 > 0,9$ . Prøvene og standardene ble applisert i en micro plate assay (Cat# 0113, Bio-Rad, CA, USA) før det ble målt i et filter photometer (Expert 96, Hitech, UK) og analysert med den medfølgende programvaren (Kim, ver. 5.45.0.1, Daniel Kittrich).



### 3.6.3 Western-Blot

Muskelp prøvene ble analysert med western blot-metoden. Elektroforesen ble utført i XCell SureLocke® Mini Cell-apparat (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) tilsatt MES running buffer (NuPAGE MES SDS, Invitrogen, CA, USA) i ytre kammer og antioksidant (Invitrogen, CA, USA, Cat# NP0005) i indre kammer. Basert på totalproteinmålingene ble prøvene fortynnet med ultrarent vann og tilsatt syv mikroliter Reducing Agent Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) og 17,5 µl Sample Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Prøvene ble så varmet i ti minutter ved 70<sup>0</sup> C og applisert i NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Proteinmengde per brønn ble satt til 30 µl. Elektroforesen ble utført med 200 volt i 80 minutter. Etter elektroforesen ble proteinene overført til polyvinylidene difluorie (PVDF)-membraner (Immuno-blot, Cat# 162-0177, Bio-Rad, CA, USA) ved blotting i XCell IITM Blot Modul (Invitrogen Carlsblad, CA, USA) i Mini Cell-apparat. Apparatet var under blotting fylt med ultrarent vann, mens blottemodulen var fylt med transferbuffer (Nupage, Transfer Buffer (20x) Invitrogen, CA, USA). Etter overføring ble membranene inkubert i 5 % melkeløsning (Skim milk, Cat# 1.15363, Merck, Tyskland) med tris-buffered saline med 0,1 % Tween-20 (TBS-T; TBS, Cat# 170-6435, Bio-Rad, CA, USA; VWR International, PA, USA, Cat# 437082Q) i én time ved romtemperatur. Etter inkubering ble membranene vasket i fire ganger fem minutter i TBS-T før de ble tilsatt primært antistoff (tabell 3.4) og satt for inkubering i kjøleskap (4 grader celcius) over natten. Membranene ble så vasket i én gang 15 minutter i TBS og fire ganger fem minutter med TBS-T før de ble inkubert med sekundært antistoff (tabell 3.4) i én time i romteperatur. Etter inkuberingen ble membranene vasket i fire ganger fem minutter med TBS-T. Membranene ble deretter inkubert med Chelimescent Substrate SuperSignal® WestDura (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Membranene ble tatt bilde av Bio-Rad ChemiDoc™ MP System #170-8280 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Til å analysere bildene og kvantifisere intensiteten på båndene ble Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) brukt. For å kunne sammenligne analysene ble samtlige prøver fra hver forsøksperson gjort på samme gel. Det ble utført duplikater av hver gel i samme Mini Cell-apparat. Etter billedtaket ble membranene strippet i Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i ti minutter før de ble vasket i fem ganger ett minutt i ultrarent vann, én gang 15 minutter i TBS og

fire ganger fem minutter med TBS-T. For å undersøke at det sekundære antistoffet var fjernet ble membranene tatt bilde av på nytt (samme prosedyre som over). Membranene ble så inkubert i sekundært antistoff i en time. De ble vasket i én gang 15 minutter i TBS og fire ganger fem minutter med TBS-T. For å undersøke at primært antistoff var borte, ble membranene ble på nytt tatt bilde av. Strippingen var vellykket ved alle gjennomføringene. Membranene ble på nytt strippet (samme prosedyre som over) og vasket i én gang 15 minutter i TBS og fire ganger fem minutter med TBS-T. Membranene ble så blokkert (samme prosedyre som over) og inkubert med primærantistoff mot totalprotein. Prosedyren var lik for totalproteiner og fosforylerte proteiner (for protkoll, se vedlegg 2).

**Tabell 3.4:** Oversikt over antistoff brukt i studien.

<b>Primærantistoff</b>	<b>Produsent:</b>	<b>Fortynning:</b>	<b>Katalognummer:</b>
Fosfo-p70S6K (Thr 389)	Cell Signalling	1:1000	9234
Total-p70S6K	Cell Signalling	1:1000	2708
Fosfo-eEF2 (Thr56)	Cell Signalling	1:5000	2331
Total-eEF2	Cell Signalling	1:5000	2332
Fosfo-p38MAPK	Cell Signalling	1:1000	8690
Total-p38MAPK	Cell signalling	1:1000	8690
<b>Sekundærantistoff</b>			
Geit-anti-kanin	Cell Signalling	1:30000	7074

### **3.7 Statistikk**

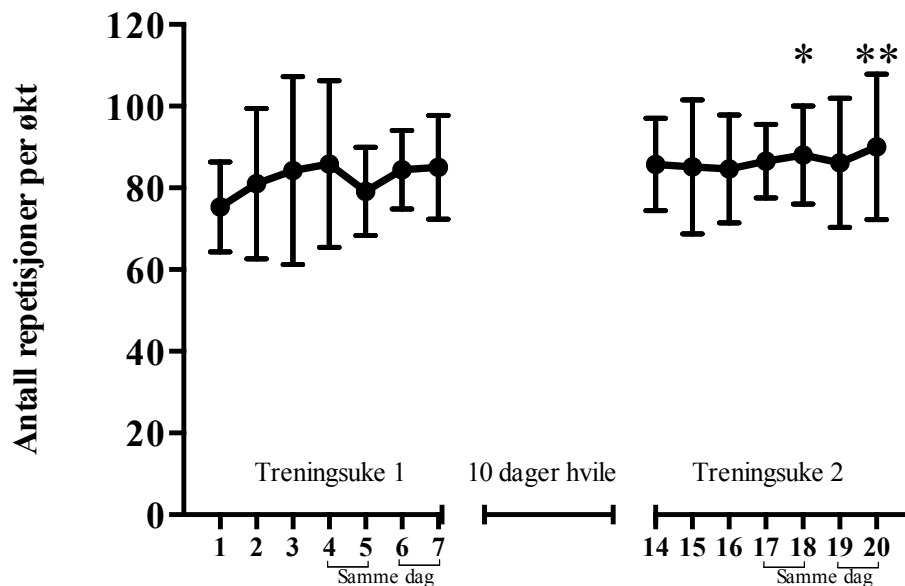
Endringer i antall repetisjoner, 1 RM, isokinetisk dreiemoment, muskelfiberareal og fosforylering ble analysert med enveis-ANOVA for repeterte målinger. Gjennomsnitt av prebiopsi for høyre og venstre bein ble brukt som baseline ved utregning av fiberareal og fosforylering. Utregninger for western blot ble gjort ved at mengden fosforylert protein ble delt på mengden totalprotein. Den høyeste aktiveringen (ratioen) ble satt som 100 % for hver forsøksperson; og resten av prøvene for samme forsøksperson er satt som prosent av høyeste aktivering (peak). Vi brukte duplikater under wester blot-analysene og kunne bruke et gjennomsnitt av to membraner for alle forsøkspersoner.

Paret t-test ble brukt som hovedanalyse for å sammenligne akutt dag 1 og akutt dag 2 for fosforylering og antall repetisjoner. Paret t-test ble også brukt for å sammenligne gjennomsnittsverdier og høyeste verdi mellom treningsukene for CK og myoglobin, i tillegg til å sammenligne gjennomsnitt for totalt antall repetisjoner i treningsukene. Signifikansnivå ble satt til  $P < 0,05$ . Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik (SD). Statistisk tendens er definert som  $P < 0,1$ . Analyser ble gjort i Microsoft Excel 2011 (Microsoft Excel [computer software], Redmond, WA, USA) og Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

## 4. Resultater

### 4.1 Trening

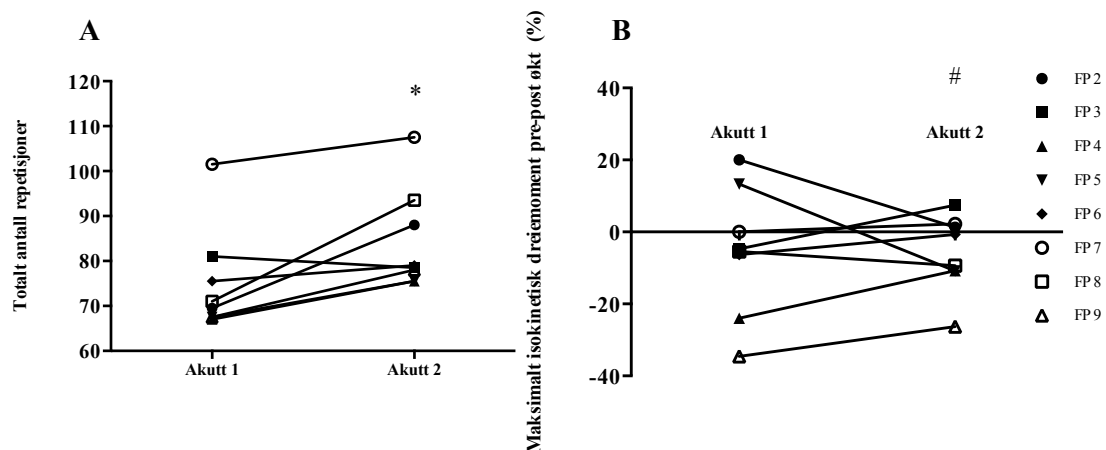
Motstanden var satt til 20 % av 1 RM og var i gjennomsnitt  $13,5 \pm 3$  kg. Gjennomsnittlig treningsvolum<sup>7</sup> ved økt én var  $1015 \pm 149$  kg, mens det økte til  $1213 \pm 241$  kg ( $P = 0,01$ ) ved økt 14. Det totale antallet repetisjoner utført per treningsøkt økte fra økt én ( $75 \pm 12$ ) til økt fem i uke to ( $88 \pm 12$ ;  $P = 0,028$ ); og til siste treningsøkt ( $90 \pm 18$ ;  $P = 0,005$ ; Figur 4.1). I første treningsuke var det en tendens til økning i antall repetisjoner de fire første øktene ( $P = 0,1$ ). Under treningsuke to var antall repetisjoner per økt mer stabilt. Det ble i gjennomsnitt utført  $82 \pm 15$  repetisjoner per økt i treningsuke én og  $87 \pm 14$  repetisjoner treningsuke to ( $P = 0,16$ ).



**Figur 4.1:** Utvikling av totalt antall repetisjoner per økt. \*signifikant forskjellig fra første økt ( $P < 0,05$ ). \*\*signifikant forskjellig fra første økt ( $P < 0,01$ ).

<sup>7</sup> Antall repetisjoner ganger treningsmotstand.

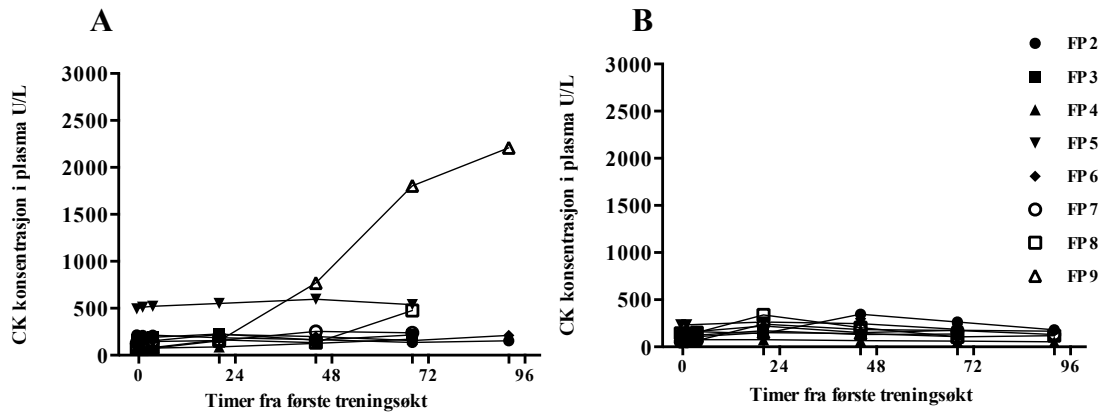
Det ble utført signifikant flere ( $P= 0,005$ ) repetisjoner ved akutt dag 2 ( $84\pm 11$ ; Figur 4,2 A) sammenlignet med akutt dag 1 ( $75\pm 12$ ); som resulterte i en økning av treningsvolum med 140 kg per forsøksperson ( $P= 0,005$ ). Ved akutt dagene ble forsøkspersonene testet for maksimalt isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund ved kneekstensjon både før og etter treningsøkten. Ved akutt dag 2 ( $-5,9\pm 13\%$ ; figur 4.2 B) var det en tendens til nedgang i maksimalt dreiemoment etter økten ( $P= 0,08$ ), mens det var ingen signifikant nedgang i kraft ved akutt dag 1 ( $-5,2\pm 17\%$ ). Det var ingen forskjell mellom akutt dagene.



**Figur 4.2:** A: Treningsdata akutt dagene, \*= signifikant forskjellig fra akutt dag 1 ( $P < 0,05$ ). B: Prosentvis kraftfall i maksimalt isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund pre til post økt, akutt dag 1 og akutt dag 2. #tendens til forskjell mellom dagene ( $P < 0,1$ )

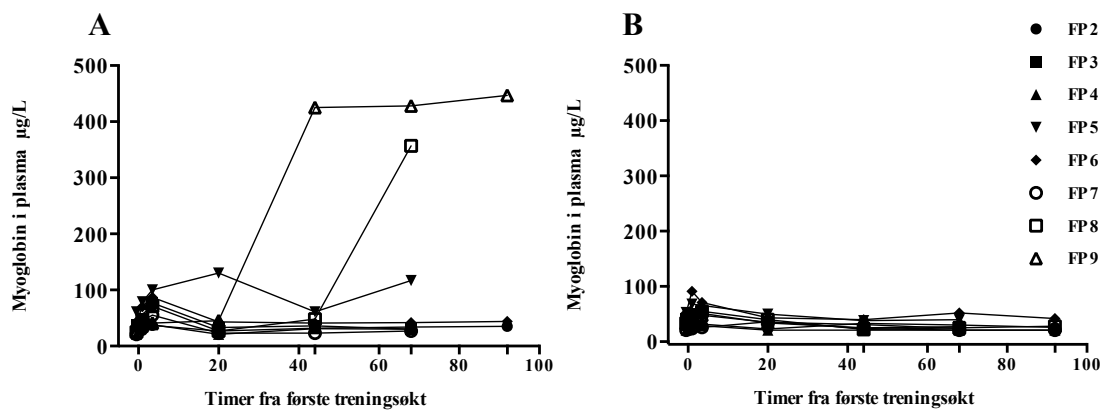
## 4.2 Blodanalyser

CK-verdiene hadde et litt annet forløp i treningsuke 1 sammenlignet med treningsuke 2 for to forsøkspersoner, men ikke for gjennomsnittet ( $P=0,15$ ; figur 4.3). Det var ingen signifikant endring i høyeste nådde verdi mellom treningsukene ( $P=0,25$ ).



**Figur 4.3:** Endringer i CK-konsentrasjon i plasma ved treningsuke én (A) og treningsuke to (B).

Myoglobin hadde noenlunde likt forløp som CK, og endret seg kun for enkelte forsøkspersoner. Det var ingen forskjell mellom ukene for verken gjennomsnitt ( $P=0,12$ ; figur 4.4) eller for høyeste nådde verdi ( $P=0,11$ ).

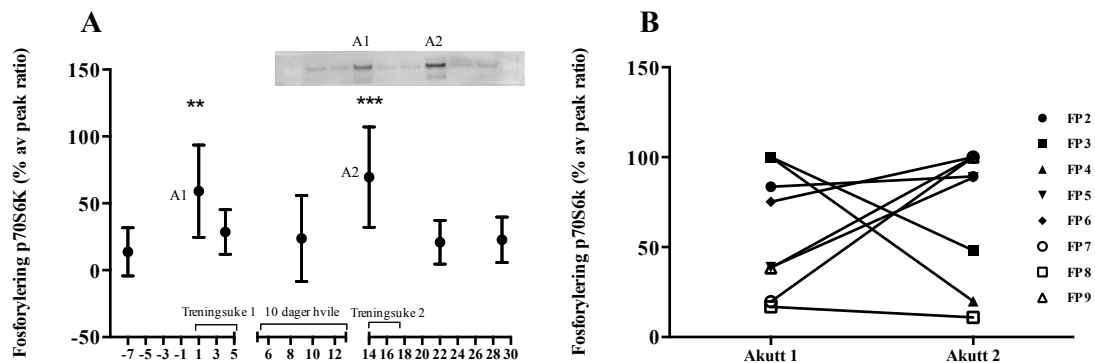


**Figur 4.4:** Endringer i myoglobinkonsentrasjon i plasma ved treningsuke én (A) og treningsuke to (B).

## 4.3 Signalering

### 4.3.1 p70S6K

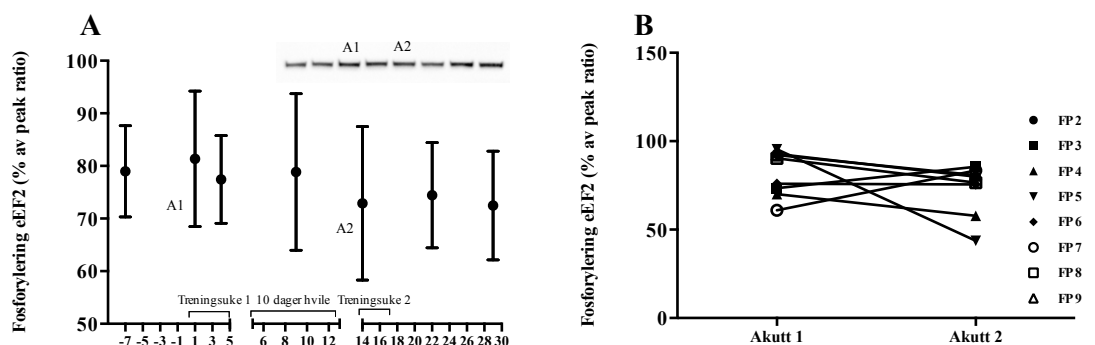
Forholdet mellom fosforylert og total mengde p70S6K var signifikant økt fra baseline ( $17 \pm 20$  %) til en time etter første økt i uke én ( $59 \pm 35$  %;  $P = 0,001$ ; figur 4.5) og til en time etter første økt treningsuke to ( $70 \pm 38$  %;  $P = 0,001$ ). Det var ingen endring fra baseline til dag 4 ( $29 \pm 17$  %), dag 9 ( $24 \pm 32$  %), post 3 ( $21 \pm 16$  %) eller til post 10 ( $23 \pm 17$  %). Det var ingen signifikant forskjell i fosforylering mellom akutt 1 og akutt 2



**Figur 4.5:** Fosforylering av p70S6K gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akuttdagene (B). \*signifikant forskjell fra baseline ( $P < 0,05$ ). \*\*signifikant forskjell fra baseline ( $P < 0,01$ ). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering.

### 4.3.2 eEF2

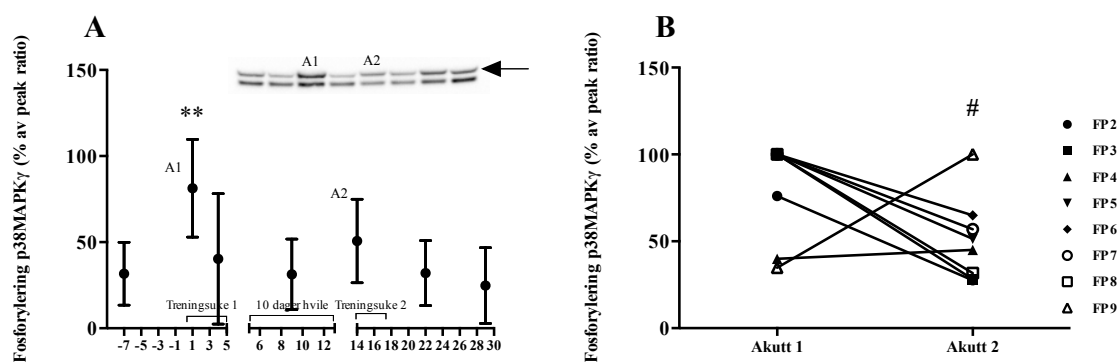
Forholdet mellom fosforylert og total mengde eEF2 hadde ingen endring fra baseline til noen tidspunkt. Det var ingen forskjell mellom akuttdagene (figur 4.6).



**Figur 4.6:** Fosforylering av eEF2 gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akuttdagene (B). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering.

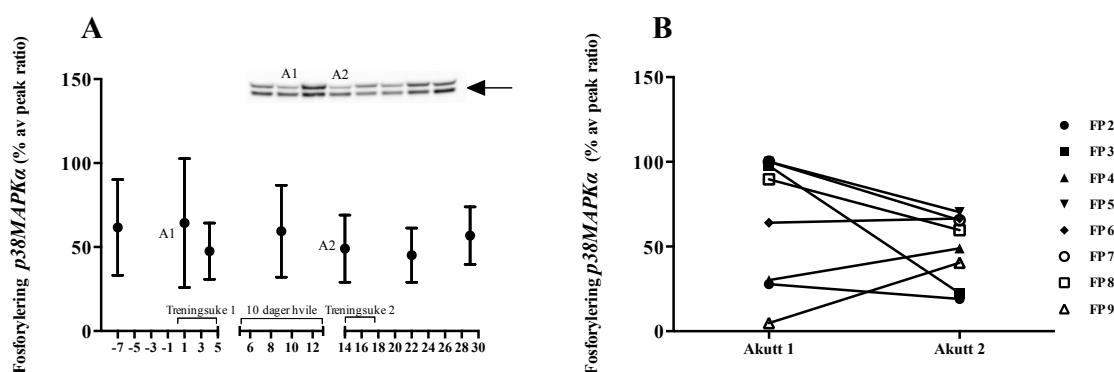
### 4.3.3 p38MAPK

Forholdet mellom fosforylert og total mengde p38MAPK $\gamma$  var økt fra baseline ( $34\pm 18\%$ ) til én time etter første treningsøkt i uke en ( $75\pm 34\%$ ;  $P=0,008$ ; figur 4.7 A), men hadde ingen signifikant endring én time etter første treningsøkt uke to ( $56\pm 27\%$ ). Det var en tendens til lavere fosforylering etter første treningsøkt uke to (figur 4.7 B), sammenlignet med første treningsøkt uke en ( $P=0,098$ ). Det var ingen endring fra baseline til dag 4 ( $38\pm 36\%$ ), dag 9 ( $30\pm 20\%$ ), post 3 ( $32\pm 19\%$ ) eller til post 10 ( $28\pm 23\%$ ).



**Figur 4.7:** Fosforylering av p38MAPK $\gamma$  gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akuttdagene (B). \*\*signifikant forskjell fra baseline ( $P < 0,01$ ). #tendens til forskjell mellom dagene ( $P < 0,1$ ). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering.

Forholdet mellom fosforylert og total mengde p38MAPK $\alpha$  hadde ingen endring fra baseline til noen tidspunkt. Det var ingen forskjell mellom akuttdagene (figur 4.8).

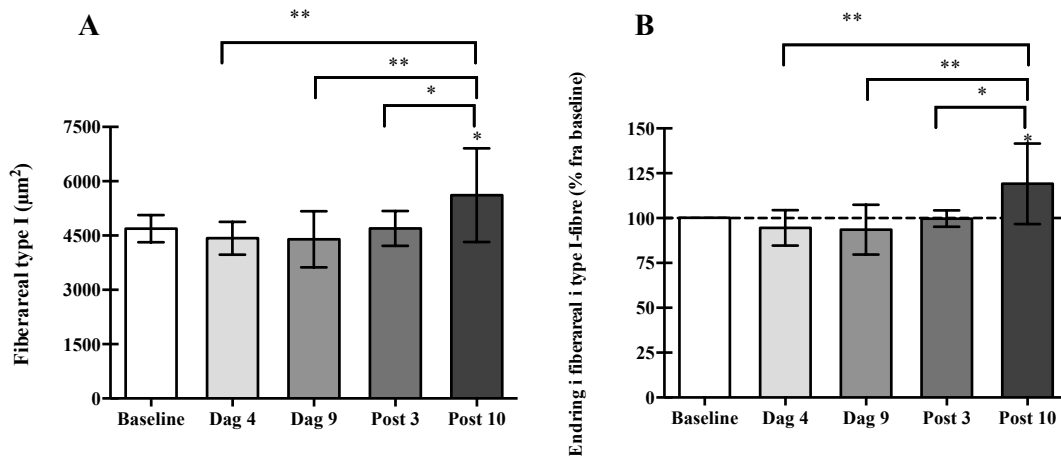


**Figur 4.8:** Fosforylering av p38MAPK $\alpha$  gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akuttdagene (B). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering.



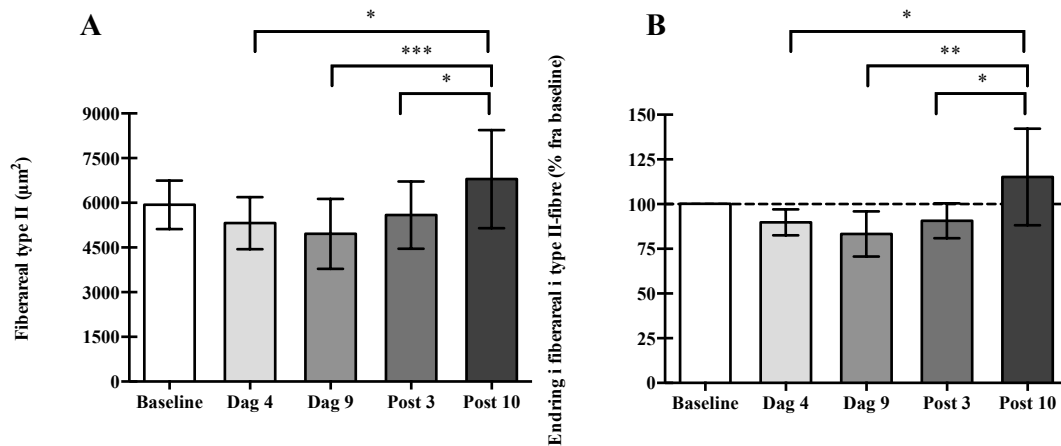
#### 4.4 Muskelvekst

I gjennomsnitt ble 638 fibre analysert for muskelfiberareal (350 type I-fibre og 288 type II-fibre). Muskelfiberareal for type I-fibre endret seg fra baseline ( $4689 \pm 595 \mu\text{m}^2$ ; figur 4.9) til post 10 ( $5615 \pm 1295 \mu\text{m}^2$ ;  $P=0,048$ ), fra dag 4 ( $4426 \pm 455 \mu\text{m}^2$ ) til post 10 ( $P=0,007$ ) og fra dag 9 ( $4396 \pm 776 \mu\text{m}^2$ ) til post 10 ( $P=0,006$ ). Det var også en sterk tendens ( $P=0,05$ ) for økning fra post 3 ( $3697 \pm 528 \mu\text{m}^2$ ) til post 10.



**Figur 4.9:** Muskelfiberareal gjennom hele intervensjonen (A) og prosentvis endring fra baseline (B) for type I-fibre. \*signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ). \*\*signifikant forskjell ( $P < 0,01$ ).

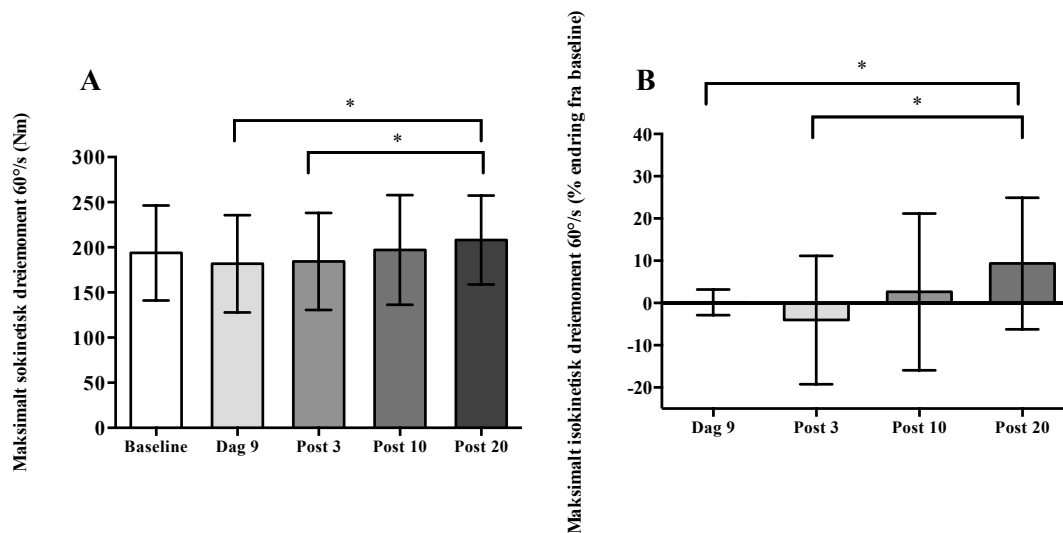
Muskelfiberareal for type II-fibre hadde ingen signifikant endring fra baseline ( $5933 \pm 816 \mu\text{m}^2$ ; figur 4.10), men endret seg fra dag 4 ( $5320 \pm 873 \mu\text{m}^2$ ) til post 10 ( $6797 \pm 1647 \mu\text{m}^2$ ;  $P = 0,008$ ), fra dag 9 ( $4960 \pm 1175 \mu\text{m}^2$ ) til post 10 ( $P = 0,001$ ) og fra post 3 ( $5686 \pm 1234 \mu\text{m}^2$ ) til post 10 ( $P = 0,039$ ).



**Figur 4.10:** Muskelfiberareal gjennom hele intervensjonen (A) og prosentvis endring fra baseline (B) for type II-fibre. \* signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ). \*\*signifikant forskjell ( $P < 0,01$ ). \*\*\*signifikant forskjell ( $P < 0,001$ ).

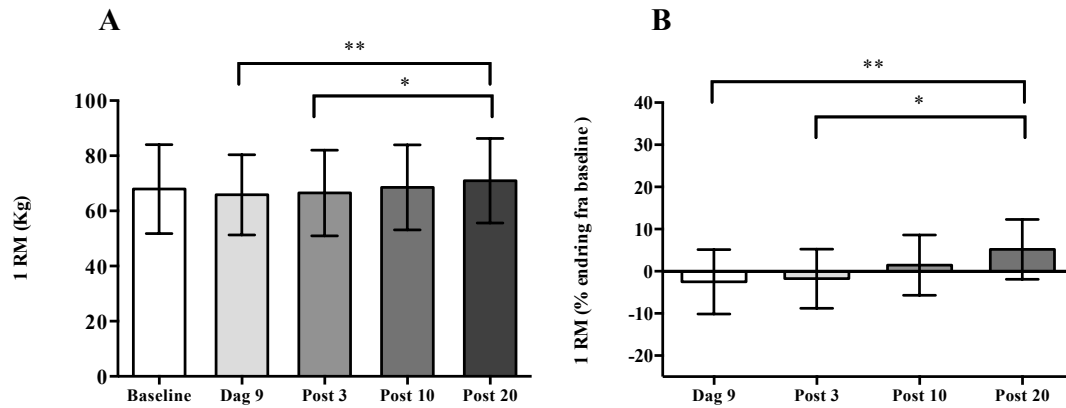
## 4.5 Muskelstyrke

Det var ingen signifikant endring i peak isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund fra baseline ( $192 \pm 50$  Nm; figur 4.11) til verken dag 9 ( $182 \pm 51$  Nm), post 3 ( $185 \pm 51$  Nm), post 10 ( $198 \pm 57$  Nm) eller til post 20 ( $208 \pm 47$  Nm). Det skjedde en økning fra dag 9 ( $P = 0,01$ ) og post 3 ( $P = 0,03$ ) til post 20.



**Figur 4.11:** Peak isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund. Absoluttverdier (A) og prosentvis endring fra baseline (B). \* signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ). \*\*signifikant forskjell ( $P < 0,01$ ).

Det var ingen økning i 1 RM kneekstensjon fra baseline ( $67\pm 16$  kg; figur 4.12) til verken dag 9 ( $66\pm 14$  kg), post 3 ( $66\pm 15$  kg), post 10 ( $68\pm 15$  kg) eller til post 20 ( $71\pm 15$  kg). Det skjedde en økning fra dag 9 ( $P= 0,005$ ) og post 3 ( $P= 0,02$ ) til post 20.



**Figur 4.12:** 1 RM kneekstensjon, absoluttverdier (A) og prosentvis endring fra baseline (B). \* signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ).

## 5. Diskusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke om ti dagers hvile var tilstrekkelig for å resette systemene for hypertrofisignaler etter fem dager med høy-frekvens okklusjonstrening. Våre forsøkspersoner (n= 9) trente syv okklusjonsøkter på fem dager. De fikk ti dager hvile før de på nytt gjennomførte syv okklusjonsøkter på fem dager. Hovedhypotesen ble testet ved western-blot-analyser av biopsier tatt én time etter den første treningsøkten i begge treningsukene. Kort oppsummert var ti dager med hvile tilstrekkelig for å resette fosforyleringssystemene til p70S6K, mens det var en tendens til forskjellig sensitivitet for p38MAPK $\gamma$ -fosforylering. p38MAPK $\alpha$  og eEF2 viste ingen aktivitet ved noen tidspunkt i studien. Fiberareal økte med 20 % for type I-fibre, men økte ikke signifikant for type II-fibre. Muskelstyrken økte ikke ved noen tidspunkt, men tenderte heller til å ha en nedgang under treningsukene.

### 5.1 Treningsresultater

Forsøkspersonene ble mer utholdende og økte antallet repetisjoner utført per økt fra første ( $75\pm 12$ ) til siste treningsøkt ( $90\pm 18$ ). Dette stemmer til dels overens med Nielsen et al. (2012) som brukte tilnærmet samme protokoll, og observerte en økning i antall repetisjoner gjennom alle tre ukene. Ved første treningsdag uke 2 ( $84\pm 11$ ) utførte forsøkspersonene signifikant flere repetisjoner sammenlignet med første treningsdag uke 1 ( $75\pm 12$ ). Siden treningsmotstanden var konstant gjennom intervensjonen resulterte økningen i antall repetisjoner også til en økning i treningsvolum. Dette førte til en tendens til nedgang i kraft etter akuttdag 2, noe vi ikke observerte ved akuttdag 1. Man kan riktignok stille spørsmålsteget ved at enkelte forsøkspersoner hadde en 20 % økning i kraft to timer etter en utmattende økt med okklusjonstrening. Dette kan skyldes feil ved testprosedyren eller at forsøkspersonene sparte seg til treningsøkten ved da vi testet preverdi før en time før treningsøkten.

## 5.2 *Signalering*

### 5.2.1 p70S6K

p70S6K-fosforylering økte signifikant én time etter treningsøkten ved første treningdag i begge treningsukene, men ikke ved noen av de andre tidspunktene. Våre funn stemmer overens med tidligere studier ved at det skjedde en økning i fosforylering en time etter treningsøkt og at det er ingen tydelig fosforylering i hvile. Det er riktignok to studier (Gundermann et al., 2014; Wernbom et al., 2013) som har funnet økning i fosforylering 24 timer etter en lik treningsøkt. Dette står i kontrast til våre funn ved dag 4 som ble tatt 22 timer treningsøkt og viste ingen fosforylering. Dette kan riktignok være fordi sensitiviteten til fosforyleringssystemet var redusert etter tre økter på rad. Gundermann et al. (2012) fant en økning i p70S6K fosforylering etter tre timer, men ikke etter én time; noe som muligens kan tyde på at en time er for kort tid for at p70S6K skal nå sin fosforyleringstopp. Studien til Gundermann et al. (2012) ble riktignok gjort på fastende forsøkspersoner; og de kan derfor ha fått en senere p70S6K-respons av den grunn. Våre forsøkspersoner inntok samme frokost til samme tidspunkt ved begge akuttdagene, og vil sannsynligvis ha en noe annerledes respons. Frokosten kan også føre til en viss stimulering i seg selv, gjennom økningen i aminosyretilgjengelighet (Beugnet, Tee, Taylor, & Proud, 2003). Studier med tradisjonell styrketrening og proteininntak har vist at fosforylering av p70S6K er relativt stabil fra én til fem timer etter treningsøkt (Moore, Atherton, Rennie, Tarnopolsky, & Phillips, 2011; Moore et al., 2009). Både Fry et al. (2010) og Gundermann et al. (2014) fant en økning i fosforylering både én og tre timer etter en økt med okklusjonstrening. Wernbom et al. (2013) fant også en økning en time etter treningsøkt med okklusjon og foreslår at dette potensielt kan være en respons på muskelskader de observerte i studien. Dette forklares med en mulig økning i NO som er vist å kunne øke p70S6K-aktivering indirekte (Ito, Ruegg, Kudo, Miyagoe-Suzuki, & Takeda, 2013). Basert på CK- myoglobindata (Koch, Pereira, & Machado, 2014) og at det ikke var noen signifikant nedgang i kraft ved akuttdagene; er det lite sannsynlig at fosforyleringen av p70S6K er grunnet muskelskader i vår studie. Vår hovedhypotese var at man kunne resette signaleringssystemet slik at det var like mottagelig for stimulus i treningsuke to. I en studie på rotter fant Ogasawara et al. (2013) en økning i fosforylering av p70S6K etter en enkelt treningsøkt. Denne økningen i fosforylering ble svakere ved gjentatte treningsøkter, men det var tilnærmet gjenopprettet da samme treningsøkt ble gjennomført etter en tolv dager lang pause. I samme studie fant de, i

motsetning til oss, en signifikant forskjell mellom treningsøktene, der den første økten hadde høyere fosforylering (Ogasawara et al., 2013). Dette tyder på at signaleringssystemene til en viss grad er tilbakestillt og mottagelig for samme type stimulus etter tolv dager med hvile fra trening. Våre funn er delvis sammenfallende og tilsier at ti dager med hvile er nok for å resette systemene for p70S6K-fosforylering; selv om vi må ta forbehold om at øktene kan ha gitt forskjellig stimulus. Volumet i treningsøkten har vist seg å være viktig for graden av p70S6K-fosforylering (Hulmi et al., 2012; Lucia, 2010; Terzis et al., 2010); og akutt dag 2 hadde signifikant høyere treningsvolum enn akutt dag 1. Akutt dag 2 tenderte også til å ha reduksjon i kraft to timer etter treningen, noe vi ikke observerte ved akutt dag 1. Dette betyr at akutt dag 2 sannsynligvis har gitt et større stimulus til p70S6K-fosforylering, og at vi må ta et visst forbehold når vi sammenligner fosforyleringen mellom akutt dagene. Det kan være at sensitiviteten faktisk er redusert ved oppstart i uke to, men at det økte treningsvolumet har gitt et større stimulus og derfor kompensert for den potensielt reduserte sensitiviteten. Selv om der er feil å sammenligne to økter som ikke er identiske vil dette være slik treningen vil foregå i praksis, og derfor være av stor nytte for å kunne designe treningsprogrammer og protokoller med okklusjonstrening. Vi hadde en meget anstrengende protokoll og lot forsøkspersonene trene til utmattelse i samtlige serier; dette kan ha sørget for en stor rekruttering av type II-fibre (Takada et al., 2012a), som igjen kan være årsaken til p70S6K-fosforyleringen. Utmattelse mot slutten av seriene ser ut til å være avgjørende for aktivering av type II-fibre, og type II-fibre ser ut til å ha en vesentlig større aktivering av p70S6K sammenlignet med type I-fibre (Koopman, Zorenc, Gransier, Cameron-Smith, & van Loon, 2006). Denne eventuelle aktiveringen av type II-fibre stemmer imidlertid ikke overens med den manglende økningen av fiberareal i type II-fibre. Akutt dag 2 var tilsynelatende mer utmattende, og kan ha gitt en større aktivering av type II-fibre og derfor et større stimulus for p70S6K. I etterkant av treningsøktene hadde *m.vastus lateralis* svullet med 21 % (akutt dag 1) og 23 % (akutt dag 2). Denne svellingen vil føre til en mekanisk stimulus for muskelcellene og de strekksensitive signalveiene aktiveres (Haussinger, 1996). Dette kan ha aktivert mTOR gjennom både PLD-veien og gjennom frisetting av IGF-1/MGF, noe som kan være med på å forklare p70S6K-responsen

(Jenkins & Frohman, 2005; Hornberger et al., 2006; Goldspink, 2003). Det er foreslått at reaktiv hyperemi<sup>8</sup> er årsaken for fosforyleringen av hypertrofisignalene ved okklusjonsprotokoller (Loenneke et al., 2012). Dette gjelder spesielt p70S6K som kan bli stimulert via en økende tilgjengelighet av aminosyrer i blodet via mTOR (Beugnet et al., 2003). Denne teorien er foreløpig tilbakevist i én studie (Gundermann et al., 2012); men vi kan imidlertid ikke utelukke at en del av fosforyleringen har skjedd som en følge av reaktiv hyperemi, og ikke utelukkende fra selve okklusjonstreningen.

### 5.2.2 eEF2

eEF2-fosforylering endret seg ikke ved noen biopsitidspunkt i studien. Dette stemmer noenlunde overens med tidligere forsøk med okklusjonstrening, der tre av totalt fire studier heller ikke har sett noen effekt. Vi tok biopsier én time etter økten og dette kan være for tidlig for å observere reduksjon i fosforyleringen av eEF2. I den ene studien som har vist effekt av okklusjonstrening på eEF2, ble biopsien tatt tre timer etter treningsøkten (Fujita et al., 2007). Av studier som ikke finner endring, har det i to av de blitt tatt biopsier både etter en og tre timer; slik at man ikke kan konkludere at eEF2 nødvendigvis aktiveres etter tre timer. Siden p70S6K er en av de viktigste proteinene oppstrøms for eEF2 ville man forventet en viss likhet i mønster av fosforylering. Dette er imidlertid ikke alltid trenden ved vanlig styrketrening (Walker et al., 2013) eller ved okklusjonstrening (Fry et al., 2010; Wernbom et al., 2013). Hvis p70S6K har defosforylert eEF2 i vår studie, må dette ha skjedd utenfor våre tidspunkter med biopsier. Det virker logisk at det krever en viss tid for at p70S6K og andre oppstrøms signalproteiner skal kunne defosforylere eEF2. Av signalproteinene vi har undersøkt er eEF2 sannsynligvis det proteinet som ligger lengst nede i signaleringskaskadene, og vil derfor kunne kreve lengre tid for å ha en virkning. Dette støttes ved at eEF2 er viktig for å blokkere den energikrevende translasjonen under aktivitet (Liu et al., 2013), som igjen vil kreve en omstilling for å kunne fasilitere translasjon i etterkant av treningen. Wang et al. 2001 viste at eEF2 blir defosforylert gjennom to hovedveier, PI3K/Akt/mTOR/p70S6K og av MEK/ERK/p90RSK1 (Wang et al., 2001). Det betyr at en potensiell grunn for manglende defosforylering av eEF2 også kan skyldes en

---

<sup>8</sup> Forbigående økt blodstrøm som følge av iskemi (når man slipper opp trykket fra mansjetten i okklusjonstrening).



manglende aktivering av MEK/ERK/p90RSK-veien. En tredje forklaring kan være at signalveier som fosforylerer eEF2 har blitt aktivert og dermed motvirket p70S6K.

### 5.2.3 p38MAPK

p38MAPK $\gamma$  økte etter første treningsøkt uke 1, men ikke ved noen av de andre tidspunktene. Det var en tendens til forskjell mellom første treningsøkt uke 1 og første treningsøkt uke 2. p38MAPK $\alpha$  hadde ingen endring ved noen tidspunkt. Våre funn stemmer overens med Wernbom et al. (2013) hva gjelder fosforylering av p38MAPK $\gamma$ , men ikke p38MAPK $\alpha$ . Det var imidlertid tilsynelatende mindre forskjeller i fosforylering av p38MAPK $\alpha$  sammenlignet med p38MAPK $\gamma$  også i Wernbom et al. (2013). En potensiell årsak til fosforyleringen av p38MAPK $\gamma$  kan være muskelsvellingen vi observerte etter øktene. Wretman et al. (2001) viste at p38MAPK (isoform ikke nevnt) aktiveres av mekanisk stress; og økningen i cellestørrelse grunnet svelling kan i seg selv virke som et mekanisk stress (Haussinger, 1996).

p38MAPK $\gamma$  er tidligere vist å være forbundet med metabolske adaptasjoner i muskelen (Boppart et al., 2000; Foster et al., 2012; Pogozelski et al., 2009). Dette kan være en mekanisme til at vi så en signifikant økning i antallet repetisjoner utført, og derfor økt utholdenhet i muskulaturen. p38MAPK $\gamma$ -fosforylering tenderte til å være lavere ved akutt dag 2 sammenlignet med akutt dag 1. Dette på tross av at akutt dag 2 hadde signifikant høyere treningsvolum. I tillegg viste forsøkspersonene en tendens til reduksjon i kraft etter akutt 2, men ikke akutt 1. Tendensen til forskjell i fosforylering mellom akutt dagene er ikke lett å forklare. Det ville vært naturlig å tenke at p38MAPK $\gamma$  ville respondere bedre på stimulus fra akutt dag 2 siden det ble utført flere repetisjoner, og derfor fått et større utholdenhetspreg. Forsøkspersonene hadde en tendens til mindre respons av CK og myoglobin ved akutt dag 2, og siden p38MAPK er kjent for å kunne bli aktivert av stress-signaler (Roux & Blenis, 2004) kan dette være med på å forklare den manglende aktiveringen ved akutt dag 2. For å regne ut forholdet mellom mengde fosforylert og totalprotein av p38MAPK bruker vi det fosforylerte båndet for begge isoformene vi undersøker, men vi har kun et bånd som ikke er spesifikt for isoformene for totalmengde protein. Dette betyr at en endring av de andre isoformene sin mengde totalprotein vil endre ratioen til både p38MAPK $\gamma$  og p38MAPK $\alpha$ .

### 5.3 Muskelvekst

Tidligere studier på okklusjonstrening har vist kraftig muskelvekst (tabell 2.1), også ved protokoller tilsvarende vår (Nielsen et al., 2012). Vi observerte en økning på 20 % for type I-fibre, men ingen økning for type II-fibre. Det er riktignok en tendens i tallmaterialet til økning i type II-fibre, men det er ikke signifikant. Dette kan skyldes at vi kun har syv forsøkspersoner inkludert i analysene og kan derfor ha fått en type II-feil. Våre resultater er uansett lavere enn det Nielsen et al. (2012) rapporterte (31 % type I og 32 % type II). I vår studie så vi en tendens til reduksjon i II-fibre etter den første treningsuken, mens Nielsen et al. (2012) så en enorm økning etter uke en (38 %). Siden vi brukte en identisk protokoll den første uken er dette oppsiktsvekkende. Dette kan kanskje forklares med at vi presset våre forsøkspersoner hardere (Mathias Wernbom, personlig kommunikasjon, 2014); og vi hadde gjennomsnittlig 85 repetisjoner per økt, mot kun 66 i Nielsen et al. (2012). Repetisjonsantallet kan riktignok også stamme fra forskjeller i treningsapparat og/eller i kriterier for utmattelse.

Sammenfallende med fiberareal for type II-fibre fant vi ingen endring i tverrsnittsareal for hele *m.quadriceps* ved bruk av MR (data ikke vist). MR-resultatene er i sterk kontrast til tidligere studier som har undersøkt muskelvekst etter okklusjonstrening med MR (Kubo et al., 2006; Takarada et al., 2002; 2004). Det var imidlertid en viss forskjell i tverrsnittøkning for de forskjellige muskelbukene ved MR-analysen; der *m.rectus femoris* hadde en tendens til økning (5 %, ikke signifikant; data ikke vist). Grunnen til den sene hypertrofiresponsen i type I-fibre, og fraværet av hypertrofi i type II-fibre kan muligens også forklares med at treningsbelastningen ble for stor; og at forsøkspersonene behøvde tid på å restituere seg. Siden fiberarealet for type I-fibre forsetter å øke fra post 3 til siste biopsitidspunkt ved post 10 er det heller ikke utenkelig at det hadde fortsatt å øke; spesielt ettersom styrkeresultatene tenderte til å øke fra post 10 til post 20. I tillegg til proteinsyntese vil også proteinnedbrytning påvirke sluttproduktet hypertrofi. Vi målte ikke fosforylering av nedbrytningsfaktorer i denne studien, men tidligere forsøk har vist en reduksjon i mRNA-nivå (Drummond et al., 2008; Manini et al., 2011) eller ingen endring av fosforylering (Fry et al., 2010) for de vanligste nedreguleringsveiene. Disse faktorene kan øke nedbrytning, men også redusere syntesen ved en hemming av hypertrofisignalveiene. Dette er noe som potensielt har påvirket både hypertrofisignaleren og hypertrofifremgangen i vår studie. Gundermann et al. (2014) fant imidlertid ingen endring av proteinnedbrytning etter en okklusjonstreningsokt; og

spekulerer i at nedbrytningen trenger et større mekanisk stress for å bli påvirket.

Gundermann et al. (2014) undersøkte effekten av okklusjonstrening på proteinsyntese hastighet, og viste en økning på 42 % etter en time og 69 % 24 timer etter treningsøkten. Sammenlignbart med økningen sett ved tradisjonell styrketrening (Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997). I tillegg viste resultatene at p70S6K-fosforylering fulgte samme mønster som fractional synthetic rate (FSR)<sup>9</sup>, som taler for en sterk involvering av p70S6K for hypertrofiresponsen (Gundermann et al., 2014). Dette mønsteret stemmer overens med studier på tradisjonell styrketrening (Burd et al., 2010; Kumar, Atherton, et al., 2009a) og tidligere studier på okklusjonstrening (Fujita et al., 2007; Gundermann et al., 2012). Selv om resultatene i (Gundermann et al., 2014) tyder på at effektene man får av okklusjonstrening er mTOR-p70S6K-avhengig, kan vi ikke utelukke at andre signalveier og mekanismer kan ha en stor betydning. MAPK-familien kan potensielt også være viktig for okklusjonstrening, men virkningene er mer allsidige og diffuse sammenlignet med Akt-mTOR-veiene; og derfor vanskeligere å studere. Gundermann et al. (2014) undersøkte også MAPK-fosforylering, og viste ingen fosforylering av ERK1/2 og Mnk1 for verken kontrollgruppen eller rapamycingruppen; selv om det var en tydelig trend til økning for kontrollgruppen og ingen forandring for rapamycingruppen. I en studie fra samme gruppe i 2009 viste de en klar inhibisjon av ERK1/2 og Mnk1 ved inntak av rapamycin i forbindelse med tradisjonell styrketrening (Drummond et al., 2009). Dette taler for at ERK1/2 og Mnk1 sannsynligvis også har vært inhibert i Gundermann et al. (2014). Flere har sett en økning i MAPK-signalering sammen med muskelvekst i studier med okklusjonstrening, ERK1/2 og Mnk1 (Fry et al., 2010; Gundermann et al., 2012) og p38MAPK (Wernbom et al., 2013). Men foreløpig har ingen klart å bevise MAPK sitt bidrag. p38MAPK $\gamma$  er tidligere vist å kunne kontrollere størrelsen på type I-fibre (Foster et al., 2012), og økte sin fosforylering i vår studie. Dette kan tale for en rolle for p38MAPK $\gamma$  i økningen av type I-fibre vi observerte. Hypertrofisignalering er en prosess som involverer en rekke prosesser og faktorer som har forskjellig tidsforløp. Det er også umulig å ekstrapolere fosforyleringen til proteinene da den ikke følger noe bestemt mønster. Det er viktig å bemerke at ikke alle våre biopsitidspunkt ble satt opp for kun å undersøke fosforylering, men heller en rekke analyser. De tidspunktene som ble satt opp for

---

<sup>9</sup> Målemetode for hastighet av MPS.

fosforyleringsanalyser var etter én og 22 timer etter øktene og kan regnes som to stikkprøver av fosforyleringen. Vi vet ikke mønsteret til fosforyleringen verken før, i mellom eller etter disse tidspunktene. Dette gjør at vi heller ikke vet hvordan sensitiviteten har utviklet seg gjennom treningsukene, noe som gjør det vanskelig å tolke om systemene har blitt resatt fra slutten av treningsuke en, til starten av uke to.

Det er vanskelig å finne en sammenheng mellom muskelvekst og hypertrofisignaler. Selv om vi observerte økning i fosforylering av både p70S6K og p38MAPK $\gamma$  ved akuttdag 1, så vi ingen økning i fiberareal for noen av fibertypene etter første treningsuke. På tross av aktivering av signalveier koblet til muskelvekst observerte vi ingen markant muskelvekst, tatt både fiberareal og MR-analyser i betraktning. Dette kan enten forklares ved andre faktorer som påvirker muskelvekst og kan overstyre hypertrofisignaler; for eksempel nedreguleringsfaktorer og muskelskader; eller at hypertrofisignaleringen ikke har vært sterk nok.

Signalering er også vanskelig å koble direkte til muskelvekst siden det er kun en liten del av et stort bilde som består av et stort antall mekanismer. Biopsiene ble tatt fra *m.vastus lateralis* mens hele *m.quadriceps* bidrar under kneekstensjon. Krustrup et al. (2009) viste en endring av rekruttering av muskelbaker i kneekstensjon når man bruker blodtrykksmansjett, der *m.rectus femoris* virker å være den mest aktive. Dette kan også ha vært tilfellet i vår studie siden *m.rectus femoris* var den eneste muskelen som tenderte til å øke ved MR-målingene (5 %, ikke signifikant, data ikke vist). Selv om det er rimelig å anta at alle musklene som bidrar til kneekstensjon må bidra når man nærmer seg utmattelse, vil dette kunne tale for et misforhold mellom fiberareal, som er målt fra *m.vastus lateralis*. Videre er biopsiene kun en liten del av selve muskelen og ikke nødvendigvis representativ for resten av muskelbuen eller muskelgruppen, verken for fosforylering eller fiberareal.

## 5.4 Muskelstyrke

Vi fant ingen endring i verken isokinetisk dreiemoment eller 1 RM for noen tidspunkt i denne studien. Styrken tenderte til å få en reduksjon gjennom selve treningsperioden, men økte fra hvileuken til målingene etter treningsukene. Fiberarealet fra våre biopsier viser at type I-fibrene har hatt økning, mens MR viser at *m.quadriceps* som helhet ikke har økt sitt tverrsnittsareal. Dette er sannsynligvis grunnen til at vi ikke observerer noen økning i muskelstyrke gjennom treningsperioden, og et innslag av muskulær tretthet kan ha medvirket til tendensen til lavere styrke etter første treningsuke.

Resultatene er i kontrast til tidligere studier med tilnærmet lik varighet. Abe et al. (2005a) observerte 17 % økning i 1RM knebøy etter to uker med okklusjonstrening to ganger hver dag, seks dager i uken; og Abe et al. (2005b) som viste 10 % økning i 1RM beinpress etter åtte dagers okklusjonstrening på friidrettsutøvere. Noe av forskjellen kan forklares ved forskjellige test- og treningsmetoder, der kneekstensjon, som vi brukte, i mindre grad vil bli påvirket av tekniske momenter og derfor vil være mer representativ for den faktiske endringen i muskelkraft. Grunnen til at muskelstyrken tenderte til å bli lavere etter første treningsuke, for så å øke gradvis mot post 20, kan være at forsøkspersonene opplevde for stor treningsbelastning. Styrkeresultatene våre ligner på mønster man ser etter forsøk der man har trent for tungt for å skape en overreaching effect<sup>10</sup> (Kraemer et al., 2006; Volek et al., 2004). I motsetning til vår studie viste disse forsøkene økning i CK; som gjør det rimelig å anta at forsøkspersonene var overbelastet i større grad. Vi kan ikke utelukke at vi hadde observert en videre økning i styrke etter vår siste måling ved post 20, siden muskelstyrken fortsatte å øke fra post 10 til post 20.

---

<sup>10</sup> For mye treningsbelastning på for kort tid.

## **5.5 Begrensninger**

Grunnet manglende oppslutning av forsøkspersoner måtte vi gjøre forsøke med færre forsøkspersoner enn planlagt (n=9). Grunnet en feil under behandling av biopsiprøvene ble samtlige biopsibiter til to forsøkspersoner skadet slik at de ikke kunne analyseres for fiberareal. Dette gjør at resultatene fra bare syv forsøkspersoner utgjør datagrunnlaget for fiberareal, som øker muligheten for type II-feil. Forsøket ble ikke utført på en blindet måte siden samme personer stod for både trening, testing, laboratoriearbeid, dataanalyser og tolkninger. Testingen av maksimalt isometrisk dreiemoment en time før, og etter treningsøktene ved akutt dagene viser tegn på at de ikke har blitt utført bra nok. Flere forsøkspersoner går vesentlig opp i kraft; noe som ikke kan stemme. Dette kan skyldes for dårlig testmetodikk eller at forsøkspersonene sparte seg til treningsøkten. Vi hadde et massivt testbatteri som potensielt kan ha gitt en treningseffekt i seg selv. Testbatteriet har ikke hatt påvirkning på fosforyleringsresultatene våre da vi kun testet motsatt bein av det som skulle ta biopsi ved akutt dagene. Ingen annen testing ble gjennomført i forkant av biopsitakning.

## 6. Konklusjon

Denne studien viste at ti dager hvile kan være tilstrekkelig for å resette hypertrofisignaleringen etter en periode med høy-frekvent okklusjonstrening (syv økter på fem dager). p70S6K hadde lik fosforylering etter første treningsøkt ved begge ukene, og kan derfor ha vært like mottagelig for nye stimuli fra treningene i treningsuke to. Det kan imidlertid være at samme aktivering i uke to stammer av et økt treningsstimulus, og derfor ikke nødvendigvis på grunn av en lik sensitivitet. p38MAPK $\gamma$  viste en tendens til redusert sensitivitet; selv om treningsstimulus antakelig var større ved oppstart uke to.

eEF2 og p38MAPK $\alpha$  hadde ingen endring ved verken akuttdagene eller de andre tidspunktene, noe som muligens kan tyde på at de ikke blir aktivert med denne type protokoll. eEF2 ligger nedstrøms for de andre proteinene og det kan spekuleres i hvorvidt en time er for tidlig, mens 22 timer potensielt er for sent for å se endring i aktivering. p70S6K-fosforylering økte etter én time ved akuttdag 1 og 2; men var ikke aktivert 22 timer etter treningsøkt ved dag 3. Fosforyleringen av p70S6K er i samsvar med tidligere studier med okklusjonstrening og er foreslått å være nødvendig for effektene man ser på økning i proteinsyntesehastighet. p38MAPK $\gamma$ -fosforyleringen stemmer overens med den ene studien som har undersøkt den tidligere (Wernbom et al., 2013); og kan ha vært medvirkende til økningen i fiberareal i type I-fibre. På tross av aktivering av begge disse antatte sentrale signalveiene observerte vi ingen markant muskelvekst. Fiberareal økte med 15 % for type I-fibre, men økte ikke signifikant for type II. MR-analyser viste at tverrsnittsarealet for *m.quadriceps* var uendret etter intervensjonen, og viser at økningen av fiberareal for type I-fibre ikke var tilstrekkelig for å gi en funksjonell økning av *m.quadriceps*. Dette var sannsynligvis en viktig årsak til at muskelstyrken ikke økte ved noen tidspunkt.

## 7. Referanser

- Abe, T., Kawamoto, K., Yasuda, T., & Kearns, C. F. (2005a). Eight days KAATSU-resistance training improved sprint but not jump performance in collegiate male track and field athletes. *International Journal of KAATSU Training Research 1: 19-13*
- Abe, T., Yasuda, T., Midorikawa, T., & Sato. (2005b). Skeletal muscle size and circulating IGF-1 are increased after two weeks of twice daily “KAATSU” resistance training. *International Journal of KAATSU Training Research. 1:6-12*
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2010). Essential Cell Biology. Third Edition. *The Quarterly Review of Biology, 85(1)*, 105–106.
- Ameln, H., Gustafsson, T., Sundberg, Okamoto, K., Jansson, Poellinger, L., & Makino, Y. (2005). Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19(8)*, 1009–1011.
- American College of Sports Medicine. (2009, March). American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*.
- Apro, W., Wang, L., Ponten, M., Blomstrand, E., & Sahlin, K. (2013). Resistance exercise induced mTORC1 signaling is not impaired by subsequent endurance exercise in human skeletal muscle, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 305(1)*, E22–E32.
- Arsham, A. M., Howell, J. J., & Simon, M. C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *The Journal of Biological Chemistry, 278(32)*, 29655–29660.
- Beugnet, A., Tee, A., Taylor, P., & Proud, C. (2003). Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochemical Journal, 372(2)*, 555.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology, 3(11)*, 1014–1019.
- Bolster, D. R., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2003). Translational Control Mechanisms Modulate Skeletal Muscle Gene Expression During Hypertrophy. *Exercise and Sport Sciences Reviews, 31(3)*, 111.
- Booth, F. W., Tseng, B. S., Flück, M., & Carson, J. A. (1998). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiologica Scandinavica, 162(3)*, 343–350.
- Boppart, M. D., Asp, S., & Wojtaszewski, J. (2000). Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 $\gamma$  activities in human skeletal muscle. *Journal of Physiology, 526.3*. 663-669.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., et al. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex *Genes & Development, 18(23)*, 2893–2904.
- Burd, N. A., Holwerda, A. M., Selby, K. C., West, D. W. D., Staples, A. W., Cain, N. E., et al. (2010). Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *The Journal of Physiology, 588(Pt 16)*, 3119–3130.



- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Review* 75(1), 50–83.
- Carlberg, U., & Nilsson, A. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *European Journal of Biochemistry* 191, 639-645.
- Coffey, V. G., & Hawley, J. A. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports Medicine* 37(9), 737–763.
- Cook, C. J., Kilduff, L. P., & Beaven, C. M. (2014). Improving strength and power in trained athletes with 3 weeks of occlusion training. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 9(1), 166–172.
- Cully, M., Genevet, A., Warne, P., & Treins, C. (2010). A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Molecular And Cellular Biology*. (jan) 481-495
- Cumming, K. T., Paulsen, G., Wernbom, M., Ugelstad, I., & Raastad, T. (2014). Acute response and subcellular movement of HSP27,  $\alpha$ B-crystallin and HSP70 in human skeletal muscle after blood flow restricted low-load resistance exercise. *Acta Physiologica*.
- Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113–1121.
- Dodd, S., Hain, B., & Judge, A. (2009). Hsp70 prevents disuse muscle atrophy in senescent rats. *Biogerontology*, 10(5), 605–611.
- Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Pennings, B., Fujita, S., Glynn, E. L., Chinkes, D. L., et al. (2008). Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle., 294(2), E392–400. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. vol 294. 392-400.
- Dreyer, H. C., Fujita, S., Cadenas, J. G., Chinkes, D. L., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2006). Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 576(Pt 2), 613–624.
- Drummond, M. J., Fry, C. S., Glynn, E. L., Dreyer, H. C., Dhanani, S., Timmerman, K. L., et al. (2009). Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 7), 1535–1546.
- Drummond, M. J., Fujita, S., Abe, T., Dreyer, H. C., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2008). Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 40(4), 691–698.
- Ehlert, T., Simon, P., & Moser, D. A. (2013). Epigenetics in Sports. *Sports Medicine*. 43(2), 93–110.
- Foster, K. G., & Fingar, D. C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14071–14077.
- Foster, W. H., Tidball, J. G., & Wang, Y. (2012). p38 $\gamma$  activity is required for maintenance of slow skeletal muscle size. *Muscle & Nerve*, 45(2), 266–273.
- Franchi, M. V., Atherton, P. J., Reeves, N. D., Flück, M., Williams, J., Mitchell, W. K., et al. (2014). Architectural, functional and molecular responses to concentric and eccentric loading in human skeletal muscle, *Acta Physiologica* 210(3), 642–654.

- Frigeri, A., Nicchia, G. P., Balena, R., Nico, B., & Svelto, M. (2004). Aquaporins in skeletal muscle: reassessment of the functional role of aquaporin-4. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*(7), 905–907.
- Fry, C. S., Abe, T., Glynn, E. L., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., Fujita, S., et al. (2010). Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. *Journal of Applied Physiology*, *108*(5), 1199–1209.
- Fujita, S., Abe, T., Drummond, M. J., Cadenas, J. G., Dreyer, H. C., Sato, et al. (2007). Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *103*(3), 903–910.
- Fujita, T., Brechue, W. F., Kurita, K., & Sato. (2008). Increased muscle volume and strength following six days of low-intensity resistance training with restricted muscle blood flow. *International Journal of KAATSU Training* *4*: 1-8.
- Glass, D. J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(10), 1974–1984.
- Goldspink, G. (2003). Gene expression in muscle in response to exercise. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *24*(2-3), 121–126.
- Goodman, C. A., Frey, J. W., Mabrey, D. M., Jacobs, B. L., Lincoln, H. C., You, J.-S., & Hornberger, T. A. (2011). The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 22), 5485–5501.
- Goodman, C. A., Miu, M. H., Frey, J. W., Mabrey, D. M., Lincoln, H. C., Ge, Y., et al. (2010). A phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-independent activation of mammalian target of rapamycin signaling is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(18), 3258–3268.
- Gosselink, K. L., Grindeland, R. E., Roy, R. R., Zhong, H., Bigbee, A. J., Grossman, E. J., & Edgerton, V. R. (1998). Skeletal muscle afferent regulation of bioassayable growth hormone in the rat pituitary. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *84*(4), 1425–1430.
- Graham, B., Breault, M., McEwen, J., & McGraw, R. W. (1993). Occlusion of Arterial Flow in the Extremities at Subsystolic Pressures Through the Use of Wide Tourniquet Cuffs. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *286*, 257.
- Gundermann, D. M., Fry, C. S., Dickinson, J. M., Walker, D. K., Timmerman, K. L., Drummond, M. J., et al. (2012). Reactive hyperemia is not responsible for stimulating muscle protein synthesis following blood flow restriction exercise. *Journal of Applied Physiology*, *112*(9), 1520–1528.
- Gundermann, D. M., Walker, D. K., Reidy, P. T., Borack, M. S., Dickinson, J. M., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2014). Activation of mTORC1 Signaling and Protein Synthesis in Human Muscle Following Blood Flow Restriction Exercise is Inhibited by Rapamycin. *AJP: Endocrinology and Metabolism*.
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., & Jenkins, A. (2003). mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Carboxyl-terminal Activation Domain on the Nuclear Transcription Factor *And Cellular Biology*. *23*. 8862-8877
- Haussinger, D. (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochemical Journal*, *313 ( Pt 3)*, 697–710.
- Hennemann, E., Somjen, G., & Carpenter, D. (1965). Functional Significance Of Cell Size In Spinal Motoneurons. *J Neurophysiol*. *25*. 560-580.

- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events, *The Journal of Biological Chemistry*, 123(4), 569–580.
- Hornberger, T. A., Sukhija, K. B., & Chien, S. (2006). Extra View Regulation of mTOR by Mechanically Induced Signaling Events in Skeletal Muscle. *Cell Cycle* 5:13. 1391-1396.
- Houtman, C. J., Stegeman, D. F., Van Dijk, J. P., & Zwarts, M. J. (2003). Changes in muscle fiber conduction velocity indicate recruitment of distinct motor unit populations. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(3), 1045–1054.
- Hulmi, J. J., Walker, S., Ahtiainen, J. P., Nyman, K., Kraemer, D. W. J., & Häkkinen, K. (2012). Molecular signaling in muscle is affected by the specificity of resistance exercise protocol. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 22(2), 240–248. d
- Ito, N., Ruegg, U. T., Kudo, A., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2013). Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nature Medicine*, 19(1), 101–106.
- Jenkins, G. M., & Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20), 2305–2316.
- Kadi, F., Schjerling, P., Andersen, L. L., Charifi, N., Madsen, J. L., Christensen, L. R., & Andersen, J. L. (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 558(3), 1005–1012.
- Kawada, S., & Ishii, N. (2005). Skeletal muscle hypertrophy after chronic restriction of venous blood flow in rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*.
- Kawada, S., & Ishii, N. (2008). Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. *Acta Physiologica*, 192(4), 541–549.
- Knebel, A., Haydon, C. E., Morrice, N., & Cohen, P. (2002). Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochemical Journal*, 367(Pt 2), 525–532.
- Knebel, A., Morrice, N., & Cohen, P. (2001). A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38d, *The EMBO Journal* 20(16), 4360–4369.
- Koch, A. J., Pereira, R., & Machado, M. (2014). The creatine kinase response to resistance exercise. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 14(1), 68–77.
- Koopman, R., Zorenc, A. H. G., Gransier, R. J. J., Cameron-Smith, D., & van Loon, L. J. C. (2006). Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1245–E1252.
- Kraemer, D. W. J., Ratamess, N. A., Volek, J. S., Häkkinen, K., Rubin, M. R., French, D. N., et al. (2006). The effects of amino acid supplementation on hormonal responses to resistance training overreaching. *Metabolism*, 55(3), 282–291.
- Krishna, M., & Narang, H. (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65. 3525-3544.

- Krustrup, P., Söderlund, K., Relu, M. U., Ferguson, R. A., & Bangsbo, J. (2009). Heterogeneous recruitment of quadriceps muscle portions and fibre types during moderate intensity knee-extensor exercise: effect of thigh occlusion. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *19*(4), 576–584.
- Kubo, K., Komuro, T., Ishiguro, N., Tsunoda, N., Sato, Ishii, N., et al. (2006). Effects of low-load resistance training with vascular occlusion on the mechanical properties of muscle and tendon. *Journal of Applied Biomechanics*, *22*(2), 112–119.
- Kumar, V., Atherton, P., Atherton, P., Smith, K., Smith, K., & Rennie, M. J. (2009a). Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *Journal of Applied Physiology*. *106*:2026-2039.
- Kumar, V., Selby, A., Rankin, D., Patel, R., Atherton, P., Hildebrandt, W., et al. (2009b). Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *The Journal of Physiology*, *587*(1), 211–217.
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 20), 3589–3594.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular Cell*, *21*(4), 521–531.
- Liu, Y., Vertommen, D., Rider, M. H., & Lai, Y.-C. (2013). Mammalian target of rapamycin-independent S6K1 and 4E-BP1 phosphorylation during contraction in rat skeletal muscle. *Cellular Signalling*, *25*(9), 1877–1886.
- Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Abe, T., & Bembien, M. G. (2012). Medical Hypotheses. *Medical Hypotheses*, *78*(1), 151–154.
- Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Thiebaud, R. S., Mattocks, K. T., Abe, T., & Bembien, M. G. (2013). Blood flow restriction pressure recommendations: a tale of two cuffs. *Frontiers in Physiology*, *4*, 249.
- Loenneke, J. P., Wilson, G. J., & Wilson, J. M. (2010). A mechanistic approach to blood flow occlusion. *International Journal of Sports Medicine*, *31*(1), 1–4.
- Lucia, A. (Ed.). (2010). Low-load high volume resistance exercise stimulates muscle protein synthesis more than high-load low volume resistance exercise in young men. *PLoS ONE*, *5*(8), e12033.
- Lunde, I. G., Anton, S. L., Bruusgaard, J. C., Rana, Z. A., Ellefsen, S., & Gundersen, K. (2011). Hypoxia inducible factor 1 links fast-patterned muscle activity and fast muscle phenotype in rats. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 6), 1443–1454.
- Manini, T. M., Vincent, K. R., Leeuwenburgh, C. L., Lees, H. A., Kavazis, A. N., Borst, S. E., & Clark, B. C. (2011). Myogenic and proteolytic mRNA expression following blood flow restricted exercise. *Acta Physiologica*, *201*(2), 255–263.
- Meyer, R. A. (2006). Does blood flow restriction enhance hypertrophic signaling in skeletal muscle? *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *100*(5), 1443–1444.
- Miyazaki, M., & Esser, K. A. (2009). Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *106*(4), 1367–1373.
- Miyazaki, M., McCarthy, J. J., Fedele, M. J., & Esser, K. A. (2011). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *The Journal of Physiology*, *589*(7), 1831–1846.

- Moore, D. R., Atherton, P. J., Rennie, M. J., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2011). Resistance exercise enhances mTOR and MAPK signalling in human muscle over that seen at rest after bolus protein ingestion. *Acta Physiologica*, 201(3), 365–372.
- Moore, D. R., Robinson, M. J., Fry, J. L., Tang, J. E., Glover, E. I., Wilkinson, S. B., et al. (2009). Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), 161–168.
- Moritani, T., Muro, M., & Nagata, A. (1986). Intramuscular and surface electromyogram changes during muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology* 60(4), 1179–1185.
- Nielsen, J. L., Aagaard, P., Bech, R. D., Nygaard, T., Hvid, L. G., Wernbom, M., et al. (2012). Proliferation of myogenic stem cells in human skeletal muscle in response to low-load resistance training with blood flow restriction. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 17), 4351–4361.
- Ogasawara, R., Kobayashi, K., Tsutaki, A., Lee, K., Abe, T., Fujita, S., et al. (2013). mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 114(7), 934–940.
- Ohta, H., Kurosawa, H., Ikeda, H., Iwase, Y., Satou, N., & Nakamura, S. (2003). Low-load resistance muscular training with moderate restriction of blood flow after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 74(1), 62–68.
- Ozaki, H., Kakigi, R., Kobayashi, H., Loenneke, J. P., Abe, T., & Naito, H. (2014). Effects of walking combined with restricted leg blood flow on mTOR and MAPK signalling in young men, 211(1), *Acta Physiologica* 211. 97–106.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183.
- Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestanc, J., et al. (2004). S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 24(8), 3112–3124.
- Petrella, J. K., Kim, J.-S., Mayhew, D. L., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *Journal of Applied Physiology* (104(6)), 1736–1742. 7
- Peyrollier, K., Hajduch, E., Blair, A., & Hyde, R. (2000). L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *Biochemical Journal* 1;350. 2.361-8.
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Aarsland, A., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1997). Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *The American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 1), E99–107.
- Pogozelski, A. R., Geng, T., Li, P., Yin, X., Lira, V. A., Zhang, M., et al. (2009). p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. *PLoS ONE*, 4(11), e7934.

- Pope, Z. K., Willardson, J. M., & Schoenfeld, B. J. (2013). Exercise and Blood Flow Restriction. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 27(10), 2914–2926.
- Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochemical Journal*, 403(2), 217–234.
- Proud, C. G., & Browne, G. J. (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells, 269(22), 5360–5368.
- Qi, X., Pohl, N. M., Loesch, M., Hou, S., Li, R., Qin, J.-Z., et al. (2007). p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31398–31408.
- Reeves, G. V., Kraemer, R. R., Hollander, D. B., Clavier, J., Thomas, C., Francois, M., & Castracane, V. D. (2005). Comparison of hormone responses following light resistance exercise with partial vascular occlusion and moderately difficult resistance exercise without occlusion. *Journal of Applied Physiology*, 101(6), 1616–1622.
- Rennie, M. J., Wackerhage, H., Spangenburg, E. E., & Booth, F. W. (2004). Control of the Size of the Human Muscle Mass. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 799–828.
- Richards, S. A., Dreisbach, V. C., Murphy, L. O., & Blenis, J. (2001). Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), 7470–7480.
- Risco, A., & Cuenda, A. (2012). New Insights into the p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  MAPK Pathways. *Journal of Signal Transduction*, 2012(6), 520289–8.
- Rogers, G. W., Richter, N. J., Lima, W. F., & Merrick, W. C. (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry*. 276(33), 30914–30922.
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., & Rossman, R. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology*, 3 (11) 1009-13.
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320–344.
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(6), 342–348.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., et al. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*. 19(18), 2199–2211. d
- Ryazanov, A. G., & Davydova, E. K. (1989). Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 187–190.
- Sato. (2005). The history and future of KAATSU training. *International Journal of Kaatsu Train Research*. 1:1-15.
- Scott, B. R., Slattery, K. M., Sculley, D. V., & Dascombe, B. J. (2014). Hypoxia and Resistance Exercise: A Comparison of Localized and Systemic Methods. *Sports Medicine*. pp 1-14.
- Shinohara, M., Kouzaki, M., Yoshihisa, T., & Fukunaga, T. (1998). Efficacy of tourniquet ischemia for strength training with low resistance. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 77(1-2), 189–191.
- Suga, T., Okita, K., & Morita, N. (2009). Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *Journal of Applied Physiology*. 106: 1119-1124.

- Suga, T., Takada, S., Okita, K., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Yokota, T., et al. (2012). Effect of multiple set on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *European Journal of Applied Physiology*, *112*(11), 3915–3920.
- Takada, S., Okita, K., Suga, T., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Sato, T., et al. (2012a). Low-intensity exercise can increase muscle mass and strength proportionally to enhanced metabolic stress under ischemic conditions. *Journal of Applied Physiology*, *113*(2), 199–205.
- Takada, S., Okita, K., Suga, T., Omokawa, M., Morita, N., Horiuchi, M., Kadoguchi, T., Takahashi, M., Hirabayashi, K., Yokota, T., Kinugawa, S., & Tsutsui, H. (2012b). Blood flow restriction exercise in sprinters and endurance runners. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *44*(3), 413–419.
- Takano, H., Morita, T., Iida, H., Asada, K.-I., Kato, M., Uno, K., et al. (2005). Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. *European Journal of Applied Physiology*, *95*(1), 65–73.
- Takarada, Y., Nakamura, Y., Aruga, S., Onda, T., Miyazaki, S., & Ishii, N. (2000a). Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. *Journal of Applied Physiology* *88*(1), 61–65.
- Takarada, Y., Sato, & Ishii, N. (2002). Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *European Journal of Applied Physiology*. *86*: 208-314.
- Takarada, Y., Takazawa, H., Sato, Takebayashi, S., Tanaka, Y., & Ishii, N. (2000b). Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *Journal of Applied Physiology*, *88*(6), 2097–2106.
- Takarada, Y., Tsuruta, T., & Ishii, N. (2004). Cooperative effects of exercise and occlusive stimuli on muscular function in low-intensity resistance exercise with moderate vascular occlusion., *Japanese Journal of Physiology*. *54*(6), 585–592.
- Tanimoto, M., Madarame, H., & Ishii, N. (2005). Muscle oxygenation and plasma growth hormone concentration during and after resistance exercise: Comparison between “KAATSU” and other types of regimen. *International Journal of KAATSU Training Research*, *1*(2),
- Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., et al. (2008). Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *European Journal of Applied Physiology*, *102*(2), 145–152.
- Terzis, G., Spengos, K., Mascher, H., Georgiadis, G., Manta, P., & Blomstrand, E. (2010). The degree of p70S6K and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. *European Journal of Applied Physiology*, *110*(4), 835–843.
- Victor, R. G., & Seals, D. R. (1989). Reflex stimulation of sympathetic outflow during rhythmic exercise in humans. *The American Journal of Physiology*, *257*(6 Pt 2), H2017–24.
- Viru, Jansson, Viru, & Sundberg. (1998). Effect of restricted blood flow on exercise-induced hormone changes in healthy men. *European Journal of Applied Physiology*, *77*(6), 517–522.
- Volek, J. S., Ratamess, N. A., Rubin, M. R., Gómez, A. L., French, D. N., McGuigan, M. M., et al. (2004). The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *European Journal of Applied Physiology*, *91*(5-6), 628–637.

- Walker, S., Hulmi, J. J., Wernbom, M., Nyman, K., Kraemer, D. W. J., Ahtiainen, J. P., & Häkkinen, K. (2013). Variable resistance training promotes greater fatigue resistance but not hypertrophy versus constant resistance training. *European Journal of Applied Physiology*, *113*(9), 2233–2244.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R., & Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO Journal*, *20*(16), 4370–4379.
- Wernbom, M., Apro, W., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Blomstrand, E., & Raastad, T. (2013). Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *113*(12), 2953–2965.
- Wernbom, M., Augustsson, J., & Raastad, T. (2008). Ischemic strength training: a low-load alternative to heavy resistance exercise? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *18*(4), 401–416.
- Wernbom, M., Järrebring, R., Andreasson, M. A., & Augustsson, J. (2009). Acute Effects of Blood Flow Restriction on Muscle Activity and Endurance During Fatiguing Dynamic Knee Extensions at Low Load. *Journal of Strength and Conditioning Research*, *23*(8), 2389–2395.
- Weston, C. R., & Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, *19*(2), 142–149.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C. Y., Shyu, A. B., et al. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *The EMBO Journal*, *18*(18), 4969–4980.
- Wretman, C., Lionikas, A., Widegren, U., Lännergren, J., Westerblad, H., & Henriksson, J. (2001). Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPKerk1/2 and MAPKp38 in isolated rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, *535*(1), 155–164.
- Yasuda, T., Fukumura, K., Fukuda, T., Uchida, Y., Iida, H., Meguro, M., et al. (2013). Muscle size and arterial stiffness after blood flow-restricted low-intensity resistance training in older adults. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*.
- Yokokawa, Y., Hongo, M., Urayama, H., Nishimura, T., & Kai, I. (2008). Effects of low-intensity resistance exercise with vascular occlusion on physical function in healthy elderly people. *Biosci Trends*.
- Zheng, M., Wang, Y.-H., Wu, X.-N., Wu, S.-Q., Lu, B.-J., Dong, M.-Q., et al. (2011). Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nature Cell Biology*, *13*(3), 263–272.



## Tabelloversikt

<i>Tabell 2.1: Oversikt over studier som har undersøkt okklusjonstrening på muskelvekst og/eller muskelstyrke</i> .....	12
<b>Tabell 3.1:</b> Inklusjons –og eksklusjonskriterier for deltagelse i studien .....	37
<b>Tabell 3.2:</b> Antropometriske data av forsøkspersonene. Verdiene er i gjennomsnitt og standardavvik.....	37
<i>Tabell 3.3: Oversikt over tidsforløpet ved akutt dagene.</i> .....	42
<b>Tabell 3.4:</b> Oversikt over antistoff brukt i studien.....	46

## Figuroversikt

- Figur 2.1** Forenklet oversikt over de antatt viktigste mekanismene til hvorfor okklusjonstrening skaper muskelvekst og styrkeøkning; og det tenkte samspillet mellom disse. Modifisert etter Scott, Slattery, Sculley, & Dascombe (2014). Sannsynlige mekanismer er i mørkegrå bokser og mulige mekanismer som krever mer forskning er i lysegrå bokser. Tykke linjer representerer en etablert link mellom boksene, mens stripet linje representerer en mulig link. .... 16
- Figur 2.2:** Korrelasjon ( $r=0,88$ ;  $P=0,001$ ) mellom økning i tverrsnittsareal og økning i uorganisk fosfat (pI). Målingene av pI ble gjort i hvile og hvert 30. sekund gjennom treningsprotokollen som varte i to minutter CSA ble målt med MR etter to og fire uker med okklusjonstrening. Modifisert etter Takada et al. (2012a). .... 20
- Figur 2.3:** Den foreslåtte linken mellom muskelsvelling og muskelvekst modifisert etter Haussinger (1996) og Loenneke et al. (2012). .... 21
- Figur 2.4:** Endring i hastighet på proteinsyntesen før og etter okklusjonstrening eller kontrolltrening som var matchet uten okklusjon. \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ). #signifikant forskjellig fra kontrollbein ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Gundermann et al. (2014). .... 24
- Figur 2.5:** En forenklet oversikt over hypertrofisignaleringen. Modifisert etter Proud, (2007). Pil betyr at det er etablert en aktivering mellom proteinene. Butt pil betyr at det er etablert en inhibisjon mellom proteinene. Stripet linje betyr at det er foreslått en sammenheng, men har ikke konsensus NB: inhibisjon/defosforylering av eEF2k/eEF2 og 4EBPs/eIF4E/eIF4F er positivt for proteinsyntesen. .... 27
- Figur 2.6:** Overblikk over de viktigste signalveiene opp- og nedstrøms for mTOR. Modifisert etter (Hornberger et al., 2006; Proud, 2007; Laplante & Sabatini, 2009; Liu et al., 2006; Miyazaki et al., 2011). Pil betyr at det er etablert en aktivering mellom proteinene. Butt pil betyr at det er etablert en inhibisjon mellom proteinene. Stripet linje betyr at det er foreslått en sammenheng, men har ikke konsensus. .... 28
- Figur 2.7:** Økning i p70S6K-fosforylering. \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ). #signifikant forskjell mellom gruppene ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Gundermann et al. (2014). .... 31
- Figur 2.8:** Endring i eEF2-fosforylering etter okklusjonstrening. \*signifikant forskjell fra baseline ( $P < 0,05$ ). Modifisert etter Fujita et al. (2007). .... 32
- Figur 2.9:** Økning i p38MAPK øvre bånd (antatt å være p38MAPK $\gamma$ ; A) og p38MAPK nedre bånd (antatt å være p38MAPK $\alpha$ ; B) \*signifikant forskjellig fra baseline ( $P < 0,05$ ) Modifisert etter Wernbom et al. (2013). .... 34
- Figur 3.1:** Tidsoversikt over treningsøktene i intervensjonen. .... 36
- Figur 3.2:** Treningsoppsettet (1. Datastyrt torniquetsystem. 2. 150 mm bred pneumatisk mansjett). .... 38

<b>Figur 3.3:</b> Oversikt over tidspunkt for testing og trening gjennom hele intervensjonen. Muskelfunksjon = maksimalt isokinetisk dreiemoment. ....	39
<b>Figur 3.4:</b> Styrkedynamometer .....	40
<b>Figur 3.5:</b> Tidspunkt for biopsitakning, hvilket ben biopsien er tatt fra i parentes. Svart pil= biopsi tatt enten før, eller ikke i forbindelse med trening; rød pil= biopsi en time etter trening.....	43
<b>Figur 4.1:</b> Utvikling av totalt antall repetisjoner per økt. *signifikant forskjellig fra første økt (P <0,05). **signifikant forskjellig fra første økt (P <0,01). ....	48
<b>Figur 4.2:</b> A: Treningsdata akutt dagene, *= signifikant forskjellig fra akutt dag 1 (P= <0,05). B: Prosentvis kraftfall i maksimalt isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund pre til post økt, akutt dag 1 og akutt dag 2. #tendens til forskjell mellom dagene (P <0,1).....	49
<b>Figur 4.3:</b> Endringer i CK-konsentrasjon i plasma ved treningsuke én (A) og treningsuke to (B). ....	50
<b>Figur 4.4:</b> Endringer i myoglobinkonsentrasjon i plasma ved treningsuke én (A) og treningsuke to (B). ....	50
<b>Figur 4.5:</b> Fosforylering av p70S6K gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akutt dagene (B). *signifikant forskjell fra baseline (P <0,05). **signifikant forskjell fra baseline (P <0,01). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering .....	51
<b>Figur 4.6:</b> Fosforylering av eEF2 gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akutt dagene (B). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering. ....	51
<b>Figur 4.7:</b> Fosforylering av p38MAPK $\gamma$ gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akutt dagene (B). **signifikant forskjell fra baseline (P <0,01). #tendens til forskjell mellom dagene (P <0,1). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering .....	52
<b>Figur 4.8:</b> Fosforylering av p38MAPK $\alpha$ gjennom hele intervensjonen (A) og forholdet mellom fosforylering ved akutt dagene (B). Innfelt bilde av immunoblot fra forsøksperson med gjennomsnittlig fosforylering .....	52
<b>Figur 4.9:</b> Muskelfiberareal gjennom hele intervensjonen (A) og prosentvis endring fra baseline (B) for type I-fibre. *signifikant forskjell (P <0,05). **signifikant forskjell (P <0,01).....	53
<b>Figur 4.10:</b> Muskelfiberareal gjennom hele intervensjonen (A) og prosentvis endring fra baseline (B) for type II-fibre. * signifikant forskjell (P <0,05). **signifikant forskjell (P <0,01). ***signifikant forskjell (P <0,001). ....	54
<b>Figur 4.11:</b> Peak isokinetisk dreiemoment ved 60 grader per sekund. Absoluttverdier (A) og prosentvis endring fra baseline (B). * signifikant forskjell (P <0,05). **signifikant forskjell (P <0,01).....	55

**Figur 4.12:** 1 RM kneekstensjon, absoluttverdier (A) og prosentvis endring fra baseline (B). \* signifikant forskjell ( $P < 0,05$ ). ..... 56

## **Vedlegg**

### ***Vedlegg 1: Informasjonsskriv***

## **Forespørsel om deltakelse som forsøksperson**

### ***Styrketrening med redusert blodstrøm og muskelhukommelse***

Dette skrivet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltakelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene:

- 1) Du må være i alderen 18–45 år (begge kjønn).
- 2) Du skal *ikke* ha drevet regelmessig styrketrening på lårmusklene under de siste 6 måneder (dvs. >1 økt hver annen uke).
- 3) Du må være frisk og uten skader i kneleddene og lårmusklene.
- 4) Du kan ikke bruke noen form for medikamenter eller benytte deg av kosttilskudd under treningsperioden (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende).
- 5) Du kan ikke delta om du er allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende det man får hos tannlegen).

#### **Bakgrunn og hensikt med forsøket**

Tidligere studier har vist kraftig muskelvekst selv med relativ lett motstand (20-50 % av maksimal styrke) om blodtilførselen til muskelen reduseres med en trykkmansjett under trening («okklusjonstrening»). Det interessante med denne metoden er at muskelveksten synes å være målbare etter bare få dager med trening. I denne studien ønsker vi å studere denne treningsformen nærmere, og vi er spesielt interessert i å avdekke de cellulære mekanismene. Vi er også ute etter å undersøke om muskelen kan «huske» at

den har vært igjennom en kort periode med betydelig muskelvekst. Teorien bak denne hukommelsen ligger i at muskelcellene permanent øker antall cellekjerner (som inneholder arvematerialet); så selv om muskelen sviner på grunn av redusert trening vil muskelen raskt gjenvinne størrelsen ved re-trening.

Treningsmetoden med redusert blodstrøm kan ha viktige implikasjoner for en bred målgruppe, fra idrettsutøvere til eldre med kraftig redusert muskelmasse (sarkopeni) og pasienter som skal gjennom en kneoperasjon.

### **Gjennomføringen av forsøket**

Forsøket går ut på at du trener 7 treningsøkter på 5 dager i 2 runder. De to treningsperiodene er avskilt med 10 dager hvile. Treningen består av sittende kneekstensjoner (forsiden av lårene), mens en trykkmansjett er plassert øverst på låret (i lysken).

Du vil bli rekruttert til én av to grupper. Den ene gruppen vil trene begge beina samtidig (gruppe 1), mens den andre gruppen kun vil trene ett, tilfeldig valgt bein (gruppe 2). Rekrutteres du til sistnevnte gruppe vil du om ca ett år fra nå gjennomføre en 10-ukers treningsperiode med tradisjonell, tung styrketrening for begge beina (muskelhukommelsesforsøket; se under).

For at vi skal kunne studere cellulære mekanismer i musklene, må vi ta prøver av musklene dine. Slike muskelprøver (biopsier) vil tas ved flere tidspunkt (se under). Vi vil maksimalt ta 5 prøver fra hvert lår. Blodprøver vil også tappes fra en vene i armen (vanlig blodprøvetakning).

Muskel-styrke og -tykkelse vil registreres ved flere tilfeller før, underveis og etter treningsperiodene. Til dette benytter vi styrketester der du tar i alt du kan, og vi bruker ultralyd og magnetresonans (MR) til å studere muskeltykkelsen.

Alt i alt vil du møte i laboratoriet vårt 12-15 ganger denne høsten. I tillegg kommer oppmøter for forsøket om ett år, hvis du rekrutteres til muskelhukommelsesforsøket

(gruppe 2). Da vil du måtte møte i laboratoriet ytterligere 4-6 ganger, samt trene styrke 3 ganger per uke i 10 uker. Denne treningen vil du gjøre på Norges idrettshøgskole, men du kan selv velge når du skal trene. Laboratorieoppmøtene for testing og prøvetakninger vil fordeles til før og etter treningsperioden. Vi gjør individuelle avtaler.

### ***Før forsøket***

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 2-3 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, måling av muskeltykkelse med ultralyd, og en legesjekk i ukene før forsøket. Hver seanse varer i 1-2 timer. MR må gjøres på et røntgensenter i Oslo sentrum. Syv dager før forsøket tas den første biopsien og blodprøven, dette tar ca 30 minutter og foregår på formiddagen. Tidspunkter avtales individuelt. Du kan ikke drive krevende fysisk aktivitet (trening) i 2 dager før tester og biopsitakning.

### ***Styrketrening med redusert blodstrøm***

Du vil gjennomføre 7 treningsøkter på 5 dager under første og tredje uke av forsøksperioden. På mandag, tirsdag og onsdag har du én treningsøkt, mens torsdag og fredag har du en formiddagsøkt og ettermiddags/kvelds-økt. Treningen vil foregå i styrkelaboratoriet ved Norges idrettshøgskole, og du vil få assistanse med trykkmansjetten og gjennomføringen av selve treningen.

Treningsøkten består av 5 serier med 30 % av maksimal motstand til utmattelse i et kneekstensjonsapparat. Det vil være 45 sekunder pause mellom seriene. Denne trening gjøres med et eller to bein (avhengig av hvilken gruppe du er i), og blodstrømmen til arbeidende muskulatur vil være begrenset med ca 50 % pga. trykkmansjetten.

Er du i gruppe 1, vil du på første treningsdag i hver femdagersperiode teste maksimal isometrisk styrke før og etter treningen, samt 4 timer senere og dagen etter. Det vil også tas en biopsi 1,5 timer etter treningsøkten. Videre muskelprøves vil tas på dag 9, 15, 21 og 29.

Er du i gruppe 2, vil biopsier tas på dag 15 og 29, samt før og etter treningsperioden om



et år.

### ***Muskelhukommelsesforsøket***

Er du i gruppe 2 vil du om ca et år fra nå starte på en 10 ukersperiode med tradisjonell styrketrening av beina tre ganger per uke. Øvelsene vil være knebøy, beinpress og kneekstensjon (5-16 repetisjoner á 2-4 serier). Tester av styrke, muskeltykkelse (MR), samt biopsier og blodprøver tas før og etter treningsperioden.

### **Tester og undersøkelser**

*MR-skanning:* Denne testen innebærer at du ligger stille i ca 30 minutter i en trommel. Målingen utføres ved et røntgeninstitut i Oslo sentrum.

*Muskelfunksjonstest:* Testingen av maksimal styrke gjøres i ulike kneekstensjonsapparater, slik at vi tester både din isometriske (statiske) og dynamiske styrke – inkludert en test av 1 repetisjon maksimum (1RM).

*Blodprøver:* Blod tappes fra en vene i albuen («vanlig blodprøve»).

*Biopsier:* Det vil tas mellom 4-5 biopsier fra hvert lår (totalt 9). Biopsiene tas ut på følgende måte:

- Huden og bindevevet lokalbedøves der prøven skal tas.
- Et snitt på ca. 1 cm gjøres gjennom hud og muskelfascien.
- En nål med diameter på 5-6 mm føres inn (2-3 cm) og 1-3 små biter av muskulaturen, på størrelse med et fyrstikkhode, tas ut.
- Snittet lukkes med tape.

### **Eventuelle ulemper ved å delta**

- Deltakelse i prosjektet vil kreve mye tid og oppmerksomhet. Du må møte ved NIH på totalt 12-14 dager denne høsten, samt neste høst om du er i gruppe 2.

- Trening skal gjennomføres vil medføre en viss risiko for muskelskader, og følelse av sårhet/stølhøhet i muskulaturen vil du oppleve.
- Trening med redusert blodstrøm kan oppleves som meget ubehagelig, men det er ikke knyttet stor risiko til denne typen trening.
- Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet.
- Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.
- Blodprøvetakning (veneprove) medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig.
- En MR-skanning medfører at du ligger inne i en trommel og støynivået er betydelig; selv om du har på deg hørselsvern, kan støynivået oppleves som noe ubehagelig.

## **Personvern**

Vi vil kun lagre informasjon om deg under ditt forsøkspersonnummer. Undervis i forsøket vil vi oppbevare en kodeliste med navn og forsøkspersonnummer. Denne kodelisten vil fysisk være låst inne, slik at det er kun forskerne tilknyttet studien som har adgang til den. Representanter fra kontrollmyndigheter i inn- og utland kan få utlevert studieopplysninger og gis innsyn i relevante deler av din journal. Formålet er å kontrollere at studieopplysningene stemmer overens med tilsvarende opplysninger i din journal. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt. Innsamlet data vil bli anonymisert etter 15 år (kodelisten destrueres).

Alle prøver vil analyseres "blindet", det vil si at forskerne som utfører den enkelte analysen ikke vet hvilken forsøksperson prøven kommer fra (verken forsøkspersonnummer eller gruppe)

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Biobank

Biopsiene og blodprøvene vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2028. Ansvarlig for biobanken er Prof. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.

### **Innsynsrett og oppbevaring av materiale**

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

### **Informasjon om utfallet av studien**

Etter at data er innsamlet og analysert vil vi avholde et møte for alle forsøkspersonene der vi presenterer resultatene fra studien.

### **Forsikring**

Du som er deltaker i prosjektet er forsikret dersom det skulle oppstå skade eller komplikasjoner som følge av forskningsprosjektet. Norges idrettshøgskole er en statlig institusjon og er således selvassurandør. Dette innebærer at det er Norges idrettshøgskole som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringsselskap.

### **Finansiering**

Prosjektet er fullfinansiert av Norges idrettshøgskole, Universitet i Agder og Universitetet i Oslo og Universitet i Gøteborg. Det er mottatt midler fra Centrum för idrottsforskning (Sverige).

### **Publisering**

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfelleverderte, tidsskrift. Du vil få tilsendt artiklene hvis du ønsker det.

### **Samtykke**

Hvis du har lest informasjonsskrivet og ønsker å være med som forsøksperson i prosjektet, ber vi deg undertegne “Samtykke om deltakelse” og returnere dette til en av personene oppgitt nedenfor. Du bekrefter samtidig at du har fått kopi av og lest denne informasjonen.

Det er frivillig å delta og du kan når som helst trekke deg fra prosjektet uten videre begrunnelse. Alle data vil, som nevnt ovenfor, bli aidentifisert før de blir lagt inn i en database, og senere anonymisert.

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med

Gøran Paulsen på tlf: 93429420, eller

Truls Raastad på tlf: 23 26 23 28 el. 913 68 896

Vennlig hilsen

Gøran Paulsen (forsker)

Truls Raastad (Professor)

# Samtykke til deltakelse i studien

**Jeg er villig til å delta i studien**

-----  
**(Signert av prosjektdeltaker, dato)**

**Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien**

-----  
**(Signert, rolle i studien, dato)**

## ***Vedlegg 2 – protokoll western-blot***

## DAG 0

*Running buffer:* 100 mL MES running buffer + 1900 mL ultrarent vann

*Transfer buffer:* 50 mL transfer buffer + 100 mL metanol + 850 mL ultrarent vann

*TBS:* 200 mL TBS + 1800 mL ultrarent vann

*TBS-T:* 200 mL TBS + 1800 mL ultrarent vann + 2 mL tween 20.

*Ultrarent vann:* 2 L

- Settes i kjøleskap over natt.

## DAG 1

### *1. KLARGJØRING. BLANDE PRØVER*

- Ta TBS og TBS-T ut av kjøleskapet.
- Sett varmeblokk på 70°. Dobbeltsjekk at den er påslått. Hent ut prøver av fryser.
- Bland prøve, vann, sample buffer og reducing agent i henhold til «sample preparation mal».
- «Sample preparation mal» finner man under *SFP group* -> *analyselab* -> *SOP-prosedyrer*.
- Print ut «NuPAGE ELFO WB»-skjema.
- Sett merkede eppendorfrør på varmeblokk i 10 min ved 70° (sett temperatur til 60°). Sett på stoppeklokke!

### *2. MENS PRØVEN STÅR PÅ VARMEBLOKK*

- Finn frem: 2 geler til hver boks som skal kjøres, running buffer, antioksidant, elektroforeseboks og markør-alliquotter (4 stk. per elektroforese-kammer).
- Tilsett 1 mL antioksidant i 400 mL running buffer i egen flaske.
- Husk prøvene på varmeblokka!
- Klipp opp plasten på gelene, og tørk av. Ta av hvit tape og fjern kammen.
- Bruk pasteur-pipette til å skylle brønnene med running buffer.
- Sett gelene i boksen med teksten ut. Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen.

### *3. ELEKTROFORESE*

- Fyll indre kammer med running buffer + antioksidant (sjekk at det ikke lekker i ytre kammer).
- Sett 5 uL markør i brønn 1 og 10 på begge sider (bruk 1-10 uL-pipette)
- Sett 30 uL prøve i de øvrige brønnene. (Bruk oransje 5-40 uL-pipette, med svart prikk)
- Før inn i skjema for «NuPAGE ELFO WB» fortløpende.
- Ytre kammer fylles 2/3 fullt med running buffer uten antioksidant.
- Sett på lokk, monter ledninger, slå på og still inn volt (200 V) og tid (80 min).
- Elektroforesekammeret settes i isoporboks med is rundt
- Sjekk at strømmen lager bobler i indre bufferkammer.
- 55 min pause.

#### 4. MENS ELEKTROFORESEN GÅR – AKTIVERE PVDF-MEMBRANENE

- Tilsett 1 mL antioksidant i 1 L transfer buffer.
- Klipp opp 2 PVDF-membraner per elektroforese-kammer og legg disse i lyseblå boks.
- Finn frem 4 filterpapir og 3 pads per elektroforese-kammer.
- Pads legges i transfer buffer + antioksidant i lilla boks i >15 min (klem ut luftbobler).
- PVDF-membraner aktiveres på følgende måte:
  - 30 sek i metanol
  - 30 sek i dH<sub>2</sub>O
  - 1-2 min i nytt dH<sub>2</sub>O
  - 10-15 min i transferbuffer + antioksidant på gyrorocker.
- Filterpapir legges i transferbuffer i lilla boks like før bruk.

#### 5. BLOTTING

- Finn frem: blottedelen til boksene, lilla bokser, pinsett, spade, blyant, tørkepapir, rulle og gul avfallsboks.
- Slå av, trekk ut ledninger. Ta ut en gel om gangen, og tørk av. Ta ut den fremste gelen først.
- Knekk opp med en spade. Løft av den minste platen fra motsatt side av buen.
- Fjern brønnene. Legg vått filterpapir på gelen, og klem lett sammen.
- Snu opp ned, og sett spaden ned i sporet og trykk lett slik at gelen løsner.
- Løft platen forsiktig opp, og se til at gelen nå sitter på filterpapiret.
- Skjær av nedre del av gelen, og lag sandwich:
  - Pad
  - Filterpapir + gel
  - Membran (skriv tall i øvre høyre hjørne, bruk rulle for god kontakt)
  - Filterpapir



- Pad
- Filterpapir + gel
- Membran (skriv tall i øvre høyre hjørne, bruk rulle for god kontakt)
- Filterpapir
- Pad
- Skyll elektroforesekammer i dH<sub>2</sub>O, og monter sandwichen i kammeret. Lukk klemmen.
- Fyll indre kammer med transferbuffer opp til de hvite skruene (sjekk at det ikke lekker).
- Fyll ytre kammer 2/3 fullt med kaldt dH<sub>2</sub>O.
- Sett på lokk, monter ledninger. Sjekk at elektrodene sitter i sporene slik de skal.
- Blotting: 30 V, 90 min.

#### 6. NÅR BLOTTING ER IGANGSATT

- Rydd det som kan ryddes.
- Lag 5 % melkeløsning: 20 g melkepulver + 400 mL TBS-T (røres med magnet)
- Finn frem glassplate, kniv, linjal, blyant, pasteur-pipette og markørvekt-skjema.
- 60 min pause.

#### 7. NÅR BLOTTINGEN ER FERDIG: BLOKKERING

- Slå av, trekk ut ledninger, ta ut og åpne blotmodulen over lilla plastboks.
- Legg membranene i lyseblå plastboks med 5% melkeløsning i 2t.
- Boksen settes på gyrorocker i 2 timer (hastighet: 20).
- Finn frem glassplate, kniv, linjal, blyant, pasteur-pipette og markørvekt-skjema.
- Legg pads i dH<sub>2</sub>O (må ikke komme i kontakt med deconex). Filtrene kastes.
- Lag 1 % melkeløsning: Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T.
- Vask elektroforese-kamrene og div.
- 1t45min pause

#### 8. Vasking

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- 4 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Finn frem antistoff for de fosfo-proteinene som skal studeres.
- Finn frem rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- Antistoff tines og spinnes ned.

- Fosfo p70: Fortynning 1:1000, 5 mL + 5 uL (3. skuff i fryser).
- Fosfo eEF2: Fortynning 1:5000, 10 mL + 2 uL (3. skuff i fryser).
- Fosfo p38: 1:1000, 5 mL + 5 uL 1 (2. skuff i fryser).
- Bland primært antistoff i plastboks (p70) og plastrør (p38 og ef2)
- Pipettør 5 mL 1 % melkeløsning i hvert rør, og pipetter primært antistoff i riktig rør.
- Pipettør Proclin (5ul ved 10ml melkeløsning og 2,5ul ved 5ml melkeløsning)

## 9. Kutting og inkubering i primært antistoff

- Bruk pasteur-pipette til å fukte glassplaten
- Legg membranen på glassplaten med proteinsiden opp, og bruk linjal og blyant for å tegne opp hvor det skal kuttet. Kuttet ved:
  - 120
  - 1.1 Rett over blå 82
  - 1.2 Midt mellom rød 62 og rød 55
  - 1.3 Rød 26
- Marker membrandelene med tekst, FP-NR+membran-Nr +protein (feks. FP10,1 p70)
- Kutt langs de opptegnede strekene, og legg de ferdigkuttete membranene i ferdig rør med antistoff. Rull dem med proteinsiden inn (tekst inn) eller rygg til rygg i plastboks.
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7). Hold inne powerknappen for å få frem uendelighetstegnet ∞.
- Sett TBS, TBS-T, dH<sub>2</sub>O og 5 % melkeløsning i kjøleskap.
- Opprydning og vask.
- Ferdig for dagen!

## DAG 2

### 10. VASKING

- Ta TBS, TBS-T og melkeløsning ut av kjøleskapet (TBS og TBS-T røres og varmes).
- Bruk pinsett for å ta membranene ut av rørene. Ta vare på rørene med antistoffer (?).

- Legg membranene i lyseblå plastboks og skyll to ganger i TBS-T.
- 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Lag 1 % melkeløsning: Bland 20 mL 5 % melkeløsning med 80 mL TBS-T med magnet. (→)

#### *11. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF*

- Gjør klar en lyseblå plastboks og bland melkeløsning med sekundært antistoff.
- 30ml melkeløsning og 10µl antistoff. (1:30000)
- Legg membranene med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- 60 min pause.

#### *12. VASKING*

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Mens membranene vaskes: Finn frem et lite rør og pakk det inn i aluminiumsfolie.
- Bland substratvæske, bland lett og sett i skap  
200 µl per liten membran, 300 µl per store membran.
- Lag oppsett for billedtagningen.

#### *13. BILDER*

- Dekk en liten flate på bildetakningsapparatet med substratvæske og legg første membraner med proteinsiden opp. Undersøk plassering av membranene, sørg for at den er i midten av kamera. Dekk så membranene rikelig med substratvæske, lukk døren og vent minimum 5min (ta tiden). I mellomtiden: Lag mappestruktur.
- MINE DOKUMENTER → TORSTEIN → WB → UKENR → FOSFO ELLER TOTAL → PROTEIN
- Ta bilder med automatisk oppløsning og lagre under riktig mappe.
- HUSK MEMBRANBILDE AV HVER ENKEL RUNDE
- Legg membraner fortløpende tilbake i plastboks med TBS.

#### *14. STRIPPING, VASKING OG BLOKKERING*

- Skyll membranene 2-3 ganger i TBS-T.

- Strip membranene med «Restore PLUS Western blot stripping buffer» i 10 min på gyrorocker
- Skyll membranene 5 x 1 min i dH<sub>2</sub>O. Benytt ny plastboks.
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Ta bilder på nytt, undersøk at det ikke kommer frem bånd.
- Hvis bånd: ny stripperunde → Ta bilder på nytt
- Hvis ikke bånd:
- vask 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Inkubér i sekundært antistoff i 1t: Legg membranene med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- 60 min pause.
- Ta bilder på nytt
- Blokkér i 5 % melkeløsning i 60 min.
- Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T (forberedelse til antistoff-inkubering)
- Finn frem rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- 45 min pause.

#### 15. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- Skyll 2 x 2 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- Finn frem antistoff for de total-proteiner som skal studeres.

#### 16. INKUBERING I PRIMÆRT ANTISTOFF (TOTAL-PROTEINER)

- Finn frem antistoff for de total-proteiner som skal studeres.
- Antistoff tines og spennes ned.
  - Total p70: Fortynning 1:1000, 5 mL + 5 uL (3. skuff i fryser).
  - Total eEF2: # 2332S, 1:5000, 10 mL + 2 uL (3. skuff i fryser).
  - Total p38: # 9212P, 1:5000(?), 10 mL + 2 uL (2. skuff i fryser)
- Pipetter 5 mL eller 10 uL 1 % melkeløsning i hvert rør, og pipetter i riktig primært antistoff.
- Ta membranene opp av TBS-T-løsningen og rull dem med proteinsiden inn (tallet inn).
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7). Hold inne powerknappen for å få frem uendelighetstegnet ∞.
- Sett TBS, TBS-T og 5 % melkeløsning i kjøleskap.
- Rydd/vask!
- Ferdig for dagen!

## DAG 3

### *17. VASKING*

- Ta TBS, TBS-T og melkeløsning ut av kjøleskapet (TBS og TBS-T røres og varmes).
- Bruk pinsett for å ta membranene ut av rørene. Ta vare på rørene med antistoffer (?)
- Legg membranene i lyseblå plastboks og skylle to ganger i TBS-T.
- 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

### *18. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF*

- Gjør klar en lyseblå plastboks og bland melkeløsning med sekundært antistoff.
- 30ml melkeløsning og 10 $\mu$ l antistoff. (1:30000)
- Legg membranene med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- 60 min pause.

### *19. VASKING*

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skylle 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

### *13. BILDER*

- Dekk en liten flate på bildetakningsapparatet med substratvæske og legg første membraner med proteinsiden opp. Undersøk plassering av membranene, sørg for at den er i midten av kamera. Dekk så membranene rikelig med substratvæske, lukk døren og vent minimum 5min (ta tiden). I mellomtiden: Lag mappestruktur.
- MINE DOKUMENTER → TORSTEIN → WB → UKENR → FOSFO ELLER TOTAL → PROTEIN
- Ta bilder med automatisk oppløsning og lagre under riktig mappe.
- HUSK MEMBRANBILDE AV HVER ENKEL RUNDE
- Legg membraner fortløpende tilbake i plastboks med TBS.

#### *14. STRIPPING, VASKING OG BLOKKERING*

- Skyll membranene 2-3 ganger i TBS-T.
- Strip membranene med «Restore PLUS Western blot stripping buffer» i 10 min på gyrorocker
- Skyll membranene 5 x 1 min i dH<sub>2</sub>O. Benytt ny plastboks. 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Lag plastposer for nedfrosne membraner. Merkes med initialer, fp-nr, membran-nr og vektområde. 110-82kd (ef2) 82-55kd (p70) 55-30kd (p38)

#### 15. Nedfrysning

- Tørk membranene på støvfritt papir, klem begge sidene med papir slik at de er tørre. Legges ned i ferdiglagde plastposer. Fryses ned på -81grader.