

Atle Wendel Scheie

Kan akutte endringer i muskelens fjærstivhet indikere omfang av treningsindusert muskelskade?

En sammenlikning av akutt endring i fjærstivhet med endring i muskelfunksjon og cellulære skader i muskelstrukturer representert ved akkumulering av heat shock proteiner.

Masteroppgave i idrettsvitenskap
Institutt for fysisk prestasjonsevne
Norges idrettshøgskole, 2021

Forord

Denne masteroppgaven var en del av doktorgradsprosjektet til Vilde Handegard; «*Recovery after Exercise-Induced Muscle Damage*», gjennomført ved institutt for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole høsten 2020.

Det har vært utrolig spennende å ha tatt del i dette prosjektet og få jobbe så tett med så mange dyktige fagpersoner; fra testing av forsøkspersoner til analysering av muskelprøver i lab. Læringsgevinsten har derfor også vært stor. Det har likevel vært noen utfordringer gjennom prosessen og året 2020-21 er nesten blitt synonymt med COVID-19. Med god lab-koordinering og kanskje litt flaks har det heldigvis gått fint å gjennomføre hele prosjektet.

Takk til Truls for nøye tilbakemeldinger og generelt god oppfølging gjennom hele prosessen. En spesiell takk til Vilde for tett samarbeid, gode tilbakemeldinger, faglige diskusjoner og hyggelige samtaler. Takk til Hege og Elise for god opplæring og tips i lab, og for at dere har holdt ut med meg gjennom de utallige timene i labben. Mimrer tilbake til fraksjonering av muskelprøver og julemusikk.

Takk til alle forsøkspersonene som deltok med positivitet og strålende innsats til tross for en krevende forsøksprotokoll. Dere er jammen meg tøffe!

Takk til mamma og pappa for all støtte gjennom hele studietiden min, både økonomisk og mentalt. Stor takk til Heidi for din enorme positivitet og støtte gjennom hele masteren, samt forståelse for at det har blitt sene kvelder, både i lab og med masterskriving. Også takk for din tålmodighet når 80% av samtaleemnene våre har vært om masteren. Nå er det snart slutt på dette og vi kan snakke mer om min fremtidige jobb.

Oslo - Mai 2021

Atle Wendel Scheie

Sammendrag

Innledning: Det er vist en sterk negativ korrelasjon mellom økt fjærstivhet i muskelvevet og endring i maksimal viljestyrt isometrisk kraft (MVIK) etter treningsinduserte muskelskader (EIMD), og dermed foreslått at endring i fjærstivhet kan predikere omfang av EIMD.

Likevel er det usikkert om endringer i fjærstivhet korrelerer med cellulære markører for EIMD. Akkumulering av heat shock proteiner (HSP) i myofibrillære strukturer er en god markør for strukturelle muskelskader. Hensikten med denne studien var derfor å undersøke om akkumuleringen av HSP og utviklingen av tretthet har en sammenheng med økt fjærstivhet i muskelvevet etter uvant eksentrisk arbeid hos friske voksne.

Metode: 15 friske kvinner og menn ($26,1 \pm 3,7$ år) gjennomførte totalt 50 maksimale eksentriske biceps curls på randomisert arm. Den kontraltaterale armen var kontroll og gjennomførte alle testene. MVIK ble testet før og 5 minutter, 3, 24, 48, 72 og 96 timer etter eksentrisk arbeid. Elektrisk stimulering, ved 20 og 50 Hz, og fjærstivhetsmåling (shear modulus) ble utført på m. biceps brachii før og like etter eksentrisk arbeid. Muskelbiopsier ble tatt på m. biceps brachii 2, 48 og 96 timer etter eksentrisk arbeid og analysert for Hsp70 og α B-crystallin i cytosol og cytoskjelett.

Resultat: MVIK i belastet arm falt med $\sim 50\%$ rett etter eksentrisk arbeid og var signifikant lavere enn kontrollarm fram til 72 timer etter arbeid. Krafratioen mellom 20 og 50 Hz stimulering falt med $42 \pm 11\%$ ($P = 0,03$), og shear modulus ved 20° albuevinkel økte med $74 \pm 15\%$ like etter eksentrisk arbeid. α B-crystallin akkumulerte raskt i cytoskjelett og returnerte gradvis til normalnivå etter 48 timer. Hsp70-nivået økte, både i cytosol og cytoskjelett, etter 48 timer. MVIK korrelerte med økt shear modulus, samt med akkumulering av α B-crystallin i cytoskjelett og Hsp70 i cytoskjelett og cytosol. Endring i shear modulus korrelerte imidlertid ikke med akkumulering av HSP. Det var en moderat, men ikke-signifikant, korrelasjon mellom shear modulus og 20:50 Hz krafratio ($r = -0,55$).

Diskusjon: Den raske reduksjonen i MVIK skyldes sannsynligvis både utvikling av tretthet og strukturelle skader i muskelvevet. Den langvarige reduksjonen i MVIK antas å skyldes strukturelle skader i muskelfiberne indikert av økt akkumulering av HSP til strukturelle områder. EIMD har trolig også ført til innstrømning av Ca^{2+} fra ekstracellulært område og

videre økt fjærstivhet i muskelvevet. Det var en god sammenheng mellom redusert MVIK og fjærstivhet ved moderate skader, men uklar sammenheng med større skader.

Konklusjon: Det ser ut til å være en sammenheng mellom redusert MVIK og HSP-respons etter eksentrisk arbeid og skyldes sannsynligvis strukturelle skader i muskelvevet.

Fjærstivhet i muskelvevet hadde en sammenheng med redusert MVIK, men ikke med HSP-respons etter eksentrisk arbeid på albuefleksorene.

Innhold

| | |
|--|-----------|
| Forord | 3 |
| Sammendrag | 4 |
| Innhold | 6 |
| 1. Innledning | 9 |
| 2. Teori | 12 |
| 2.1 Fall i kraftgenerende kapasitet | 12 |
| 2.1.1 Mekanisk stress og eksentrisk arbeid | 14 |
| 2.1.2 Mekanisk stress og endringer i myofibrillær struktur | 15 |
| 2.1.3 Mekanisk stress inducerer innstrømming av Ca ²⁺ i muskelcellene | 16 |
| 2.2 Forstyrrelser i E-C kopling | 17 |
| 2.3 Fjærstivhet i muskelvevet | 18 |
| 2.3.1 Cellulære mekanismer for økt fjærstivhet i muskelvevet | 19 |
| 2.3.2 Shear wave elastografi | 21 |
| 2.4 Økt intracellulær Ca²⁺ fører til aktivering av calpain | 24 |
| 2.5 Blodmarkører | 24 |
| 2.6 Heat shock proteiner | 25 |
| 2.6.1 Små heat shock proteiner | 26 |
| 2.6.2 α B-crystallin | 27 |
| 2.6.3 Hsp70 | 28 |
| 2.6.4 Regulering av Hsp70 respons | 29 |
| 2.7 HSP-respons til treningsindusert muskelskade | 30 |
| 2.8 Faktorer som påvirker omfanget av muskelskade | 31 |
| 2.8.1 α -aktinin-3 | 31 |
| 2.9 Oppsummering | 32 |
| 3. Metode | 34 |
| 3.1 Rekruttering og inklusjon | 34 |
| 3.2 Studiedesign | 34 |
| 3.2.1 Protokoll for det eksentriske muskelarbeidet | 35 |
| 3.2.2 Tilvenning til testprotokoll | 36 |
| 3.3 Målinger | 37 |
| 3.3.1 Shear Wave Elastography | 37 |
| 3.3.2 Maksimal voluntær kraftutvikling i albuefleksorene | 37 |
| 3.3.3 Elektrisk stimulering | 37 |
| 3.3.4 Muskelbiopsier | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.4 | Analyser | 38 |
| 3.4.1 | Shear Wave Elastography | 38 |
| 3.4.2 | Fraksjonering av muskelbiopsier..... | 39 |
| 3.4.3 | Proteinmåling..... | 40 |
| 3.4.4 | Western Blot | 40 |
| 3.5 | Statistikk | 42 |
| 4. | Resultater | 44 |
| 4.1 | Maksimal voluntær isometrisk kontraksjonskraft | 44 |
| 4.2 | Elektrisk stimulering | 45 |
| 4.3 | Heat shock proteiner | 45 |
| 4.3.1 | α B-crystallin | 45 |
| 4.3.2 | Hsp70..... | 46 |
| 4.4 | Fjærstivhet i muskelvevet | 47 |
| 4.5 | Korrelasjoner | 48 |
| 4.6 | ACTN3 påvirker ikke restitusjonen av muskelfunksjon eller αB-crystallin eller Hsp70 responsen | 51 |
| 5. | Diskusjon | 53 |
| 5.1 | Langvarig reduksjon i MVIK | 53 |
| 5.1.1 | Mekanisk stress | 54 |
| 5.1.2 | Forstyrrelse i E-C kopling..... | 54 |
| 5.2 | Heat shock proteiner | 55 |
| 5.2.1 | α B-crystallin | 55 |
| 5.2.2 | Hsp70..... | 56 |
| 5.3 | Shear modulus | 58 |
| 5.4 | ACTN3 - spiller det en rolle i muskelskade? | 61 |
| 6. | Konklusjon | 63 |
| | Referanser | 64 |
| | Tabelloversikt | 75 |
| | Figuroversikt | 76 |
| | Forkortelser | 79 |
| | Vedlegg 1 | 81 |
| | Vedlegg 2 | 86 |

Vedlegg 3 **89**

1. Innledning

Styrketrening er generelt sett assosiert med positive effekter som økt muskelstyrke, forbedret idrettslig og hverdagslig funksjon, og generelt bedre helse (Beattie et al., 2014; Delecluse, 1997; Westcott, 2012). I tillegg kan styrketrening ha en skadeforebyggende effekt (Fleck & Falkel, 1986). Styrketrening kan på den andre siden føre til akutt skade i muskulaturen, spesielt hvis det muskulære arbeidet er intenst og/eller uvant for de involverte musklene. Dette blir i litteraturen omtalt som treningsindusert muskelskade (EIMD) (Owens et al., 2019). EIMD er et velkjent vitenskapelig fenomen som kjennetegnes med langvarig fall i kraftgenererende kapasitet, følelse av stølhet og økt hevelse i muskelvevet i dagene etter intenst og /eller uvant muskelarbeid (Byrne et al., 2004; Clarkson & Hubal, 2002). På muskelcellenivå er myofibrillære rupturer og økt inflammatorisk respons typiske kjennetegn på EIMD. Ved alvorlig grad av EIMD vil også cellulær nekrose i noen av muskelfibrene være en mulig konsekvens (Lauritzen et al., 2009; Paulsen et al., 2012).

Stort mekanisk stress på muskelfibrene har blitt trukket fram som en dominerende faktor for EIMD ved intenst muskelarbeid (f.eks. tung styrketrening) (Clarkson & Hubal, 2002). En interessant hypotese relatert til denne type stress er at noen sarkomerer, under aktiv muskelforlengelse, strekkes forbi aktin-myosin overlappingen (Allen, 2004; Byrne et al., 2004). Denne hypotesen kalles «popping sarkomer»-hypotesen og har fått mye oppmerksomhet i litteraturen. Overstrekkingen av sarkomerene fører til små rupturer i membranen og åpning av strekk-induserte Ca^{2+} -kanaler, etterfulgt av innstrømming av Ca^{2+} fra ekstracellulært område (Fanchaouy et al., 2009; Gissel & Clausen, 2001). Dette resulterer i økt intracellulær Ca^{2+} i fri form ved hvile som initierer til en kaskade av nedbrytende prosesser gjennom aktivering av proteasen calpain (Belcastro et al., 1998; Raastad et al., 2010). Calpain er vist å lokalisere seg ved kontraktile proteiner for degradering (Baron et al., 2004; Raastad et al., 2010). Som en respons til EIMD akkumuleres visse proteiner til skadde områder i cellene og fungerer som en beskyttelsesmekanisme (Bakthisaran et al., 2015; Becker & Craig, 1994; Liu et al., 2006). Disse proteinene kalles heat shock proteiner (HSP) og har vist seg som en nyttig biomarkør for å indikere omfang og lokalisering av muskelskade.

Undersøkelser av muskelskademarkører, som HSP-respons, eller direkte mål på muskelskader er vist å være gode og valide metoder for å undersøke EIMD på

muskelcellenivå (Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2007; Vissing et al., 2009). Slike invasive metoder har imidlertid noen utfordringer ettersom de krever et kirurgisk inngrep (biopsitaking). Blant annet er dette ressurskrevende og dyrt å gjennomføre, samt at det kan medføre noe ubehag for forsøkspersonen. I tillegg er det usikkert om en liten muskelbit på 5-20 mg er representativ for resten av muskelen (Paulsen et al., 2012). Langvarig reduksjon i maksimal kraftutvikling er vist å være den mest valide indirekte metoden for å undersøke EIMD, og reflekterer godt skadeomfanget over hele muskelen (Paulsen et al., 2012). En slik måling kan derimot ikke estimere omfang av EIMD like etter et muskelødeleggende arbeid ettersom resultatene blir konfundert av muskeltretthet (Lacourpaille et al., 2017).

Økt fjærstivhet i muskelvevet har blitt vist rett etter muskelødeleggende arbeid, og henger sannsynligvis sammen med økt Ca^{2+} innstrømning (Chleboun et al., 1998; McHugh et al., 1999). I noen nyere studier har ultralyd shear wave elastografi (SWE) blitt benyttet for å estimere fjærstivheten i muskelvevet etter eksentrisk muskelarbeid, som brukes som en modell for å fremkalle muskelskade (Eby et al., 2013; Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017). Det er vist en sterkt negativ korrelasjon mellom endring i shear modulus (mål for fjærstivhet) 30 minutter etter eksentrisk arbeid og endring i maksimal isometrisk kraftutvikling 48 timer etter arbeidet (Lacourpaille et al., 2017). For å videre forstå denne sammenhengen kreves det undersøkelser som ser på sammenheng mellom endring i fjærstivhet i muskelvevet og utviklingen av tretthet, samt ulike biomarkører for muskelskade (f.eks. HSP).

Formålet med denne studien var derfor å undersøke akkumuleringen/translokeringen av HSP og utviklingen av tretthet etter et muskelødeleggende arbeid. Videre var hensikten å undersøke om disse hadde en sammenheng med økt fjærstivhet i muskelvevet målt med ultralyd SWE etter uvant eksentrisk arbeid hos friske voksne.

Problemstillingen i denne studien var følgende:

Har akkumulering/translokering av HSP og utvikling av tretthet en sammenheng med endring i muskelvevets fjærstivhet etter uvant eksentrisk arbeid hos friske voksne?

Hypotesene i denne studien var følgende:

- *Maksimalt eksentrisk arbeid vil føre til økt fjærstivhet i muskelvevet akutt etter arbeidet og dette vil korrelere med:*
 - *Akkumulering/translokering av HSP.*
 - *Fall i maksimal voluntær kraftutvikling*
 - *Utvikling av lavfrekvent tretthet*
- *Akkumulering/translokering av HSP vil korrelere med fall i maksimal voluntær kraftutvikling.*

2. Teori

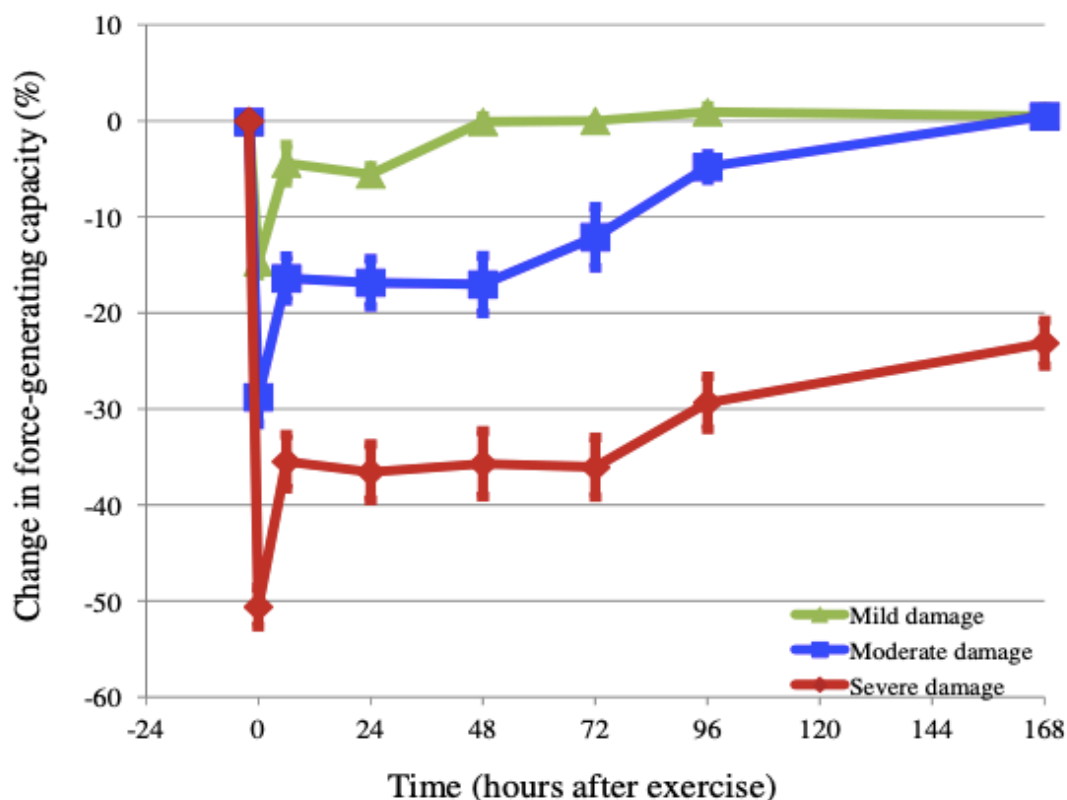
Ved intenst muskellarbeid (f.eks. tung styrketrening) utvikles tretthet i de involverte musklene. Muskeltretthet omtales om enhver reduksjon i muskulær funksjon som er knyttet til fysisk aktivitet (Allen et al., 2008). Dette virker å være et hurtig reversibelt fenomen hvor det meste av muskelfunksjonen raskt blir gjenopprettet i de første timene etter muskellarbeidet (Allen et al., 2008). Når muskelfunksjonen er redusert over en lengre periode på 1 uke eller lengre skyldes det trolig strukturelle skader på muskelvevet. Dette kalles treningsindusert muskelskade (EIMD) og det tar vanligvis opptil flere uker før muskelvevet er «reparert» (Byrne et al., 2004; Paulsen et al., 2012). En lengre restitusjonsperiode er derfor nødvendig for å kunne gjenopprette muskelfunksjonen igjen etter EIMD.

EIMD er et velkjent fenomen i idrettsforskningen. Likevel finnes det ingen klar definisjon på dette fenomenet. I stedet finnes det en rekke strukturelle og funksjonelle tegn og symptomer som karakteriserer EIMD og dermed flere ulike måter å undersøke det på (Paulsen et al., 2012). Det mest kjente symptomet er følelsen av at muskelen er støl og stiv etter en intensiv treningsøkt og kan måles subjektivt basert på følelsen av stølhet (Byrne et al., 2004; Chapman et al., 2013). Siden dette er en subjektiv måling av grad av smerte eller sårhet vil muskelstølhet variere mellom individer, og er derfor ikke valid nok til å kvantifisere omfanget av EIMD (Paulsen et al., 2012). Histologiske observasjoner (f.eks. sarkomerstruktur vurdert ved eletronmikroskopi) og redusert evne til å utvikle muskelkraft virker derimot å være de mest valide metodene for å undersøke omfanget av EIMD (Paulsen et al., 2012). Selv disse metodene har også sine begrensinger. Dette kapittelet vil i første del fokusere på mekanismer for EIMD og ulike ikke-invasive metoder for å undersøke det. Den andre delen vil fokusere mer på HSP-respons til EIMD og forhold som kan påvirke omfanget av muskelskade.

2.1 *Fall i kraftgenererende kapasitet*

Langvarig fall i maksimal muskelkraft blir ansett som den mest valide og reliable indirekte målingen på treningsindusert muskelskade og ser ut til å fungere godt til å predikere omfanget av muskelskade over en hel muskel eller muskelgruppe (Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen et al., 2012). Vanligvis etter muskelødeleggende arbeid reduseres den maksimale kraftutviklingen med 50-60% og det kan gjerne ta 1-2 uker før muskelstyrken returnerer

tilbake til normalverdi (Byrne et al., 2004). Det er tidligere observert to ulike faser ved reduksjonen i maksimal kraftutvikling (Figur 2.1) (Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen et al., 2012). I den første fasen skjer en rask reduksjon i evne til kraftutvikling like etter muskelødeleggende arbeid før muskelstyrken restitueres relativt raskt i timene etter. Deretter følger den andre fasen hvor restitusjonen av muskelstyrke stagnerer etter et par timer (Figur 2.1). (Paulsen et al., 2012). Den første fasen skyldes sannsynligvis utvikling av muskeltretthet og et høyt stress på muskelen som skaper muskelskade. Fase 2 skyldes trolig strukturelle skader på myofibrillene og en følgende inflammatorisk respons (Clarkson & Hubal, 2002; Markus et al., 2021). En viktig prosess i fase 2 som kan skille moderat og alvorlig muskelskade er at ved alvorlig muskelskade vil noen av muskelfibrene gå i nekrose, og dette tar flere uker å restituere (Paulsen et al., 2012). De underliggende mekanismene for denne langvarige reduksjonen i muskelfunksjon ser ut til å ha to hovedkomponenter, endringer i den myofibrillære ultrastrukturen som følge av mekanisk stress og forstyrrelser i eksitasjon-kontraksjons koplingen (E-C kopling) (Clarkson & Hubal, 2002).



Figur 2.1: Restitusjon av kraftgenererende kapasitet for personer som har utført tung styrketrening eller maksimalt eksentrisk arbeid. Grønn linje viser endring i kraftutviklingsevne ved mild muskelskade. Blå linje viser endring i kraftutviklingsevne ved moderat muskelskade. Rød viser endring i kraftutviklingsevne ved alvorlig muskelskade. Figuren er hentet fra Paulsen et al. (2012)

2.1.1 Mekanisk stress og eksentrisk arbeid

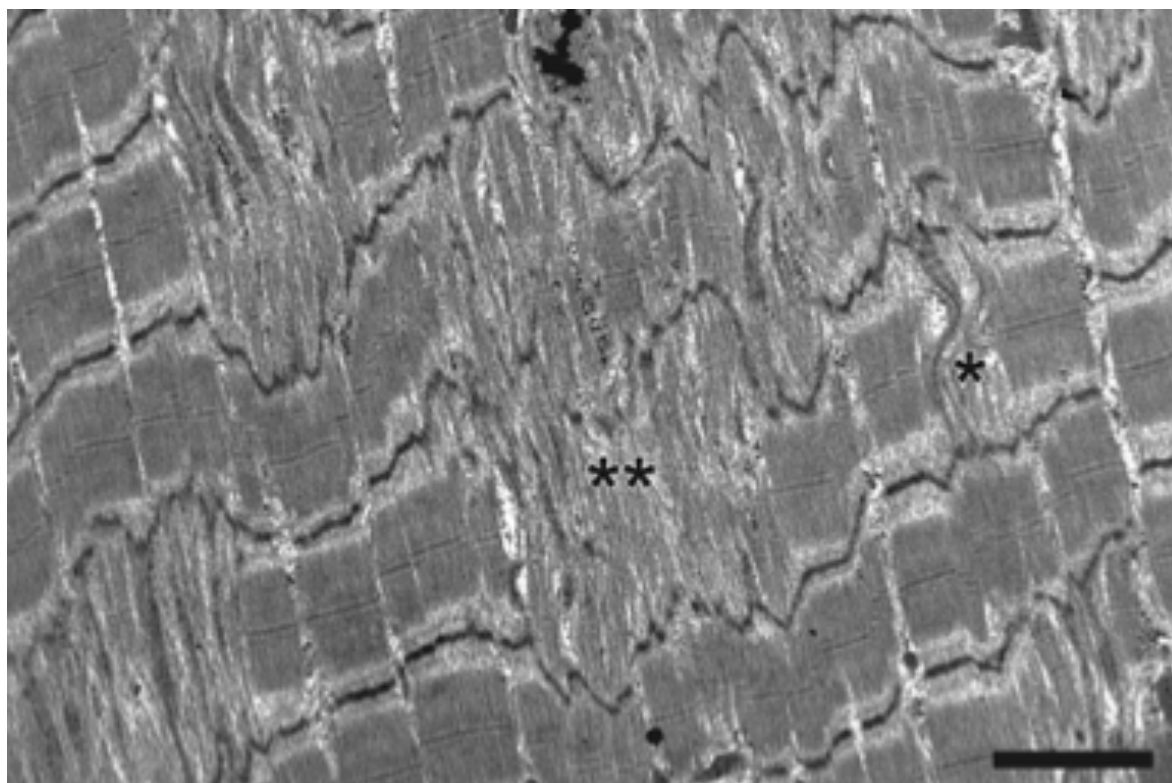
EIMD oppstår som regel ved utførelse av intensiv og/eller langvarig muskelarbeid som veldig ofte er uvant for vedkommende (Byrne et al., 2004). Særlig maksimalt eksentrisk arbeid er blitt trukket frem som en effektiv arbeidsmodell for å indusere muskelskade. Grunnen til det er at maksimalt eksentrisk arbeid induserer et stort mekanisk stress i musklene, noe som er blitt foreslått som en dominerende faktor for EIMD (Clarkson & Hubal, 2002; Tee et al., 2007).

Sett at eksentrisk muskelarbeid utvikler 1,5-1,9 ganger større kraft enn isometrisk muskelarbeid (Byrne et al., 2004), er det tydelig at de involverte muskelfiberne blir utsatt for et stort mekanisk stress under arbeidet. En konsekvens av det store mekaniske stresset er at tverrbroene blir frakoblet mekanisk i stedet for gjennom ATP spalting (Byrne et al., 2004).

Denne hypotesen omtales som «popping sarkomer»-hypotesen og forklarer at intensivt eksentrisk arbeid fører til en ikke-uniform forlengelse av sarkomerene. Det vil si at noen av sarkomerene overekstenderer («popper») slik at myosin- og aktin-filamentene ikke lenger overlapper (Allen, 2004; Byrne et al., 2004). Et resultat av dette er en endret optimal muskellengde for maksimal kraftutvikling mot lengre muskellengder (Brockett et al., 2001). Dette mekaniske stresset på musklene fører videre til endringer i den myofibrillære strukturen.

2.1.2 Mekanisk stress og endringer i myofibrillær struktur

Morfologiske endringer i muskelfibre som overstrukket sarkomer og utflytende Z-disker er typiske direkte tegn på muskelskade som er blitt observert gjennom elektronmikroskopi (Figur 2.2) etter høyt mekanisk stress (Allen, 2004; Fridén et al., 1981; Lauritzen et al., 2009). Z-diskene er lokalisert i hver ende av sarkomerene og kobler sammen en sarkomer til den neste. I tillegg forankrer de aktinfilamentene (Brancaccio et al., 2010). Utflytende Z-disker (Figur 2.2) vil sannsynligvis resultere i redusert kontraktile integritet og medvirke til redusert maksimal kraftutvikling. Z-diskene har videre vist å være den mest sårbare strukturen for EIMD og har blitt omtalt som «det svake leddet» i det kontraktile apparatet (Clarkson & Hubal, 2002; Lauritzen et al., 2009). Type II fibre er interessant nok karakterisert med smalere Z-disker sammenliknet med type I fibre, noe som dermed er foreslått å være en viktig årsak til at type II fibre er mer utsatt for muskelskade (Byrne et al., 2004).



*Figur 2.2: Eksempel på ruptur i myofibrillene og utflytende Z-disker vist gjennom elektronmikroskopi. * indikerer område med mild muskelskade. ** indikerer område med moderat muskelskade. Bildet er hentet fra Lauritzen et al. (2009)*

2.1.3 Mekanisk stress induserer innstrømning av Ca^{2+} i muskelcellene

Det er vist at stort mekanisk stress kan indusere tap av en rekke strukturelle proteiner. Blant annet har eksentrisk arbeid vist å resultere i tap av dystrofin som bidrar i forbindelsen mellom cytoskjelett og extracellulær matriks (Fanchaouy et al., 2009; Lovering & De Deyne, 2004). Tap av dystrofin er derfor anslått å resultere i redusert stabilitet i membranen under mekanisk stress som igjen fører til aktivering av strekk-induserte ionekanaler og mikrorupturer. Dette gjør at Ca^{2+} strømmer inn i intracellulært område som, i fri form, kan skape en kaskade av intracellulære prosesser (Fanchaouy et al., 2009; Gissel & Clausen, 2001; Lynch et al., 1997). Økende fri Ca^{2+} i cytosol under hvile kan se ut til å være et resultat av flere potensielle mekanismer utover innstrømning av ekstracellulært Ca^{2+} . En metning av Ca^{2+} -lageret i sarkoplasmatiske retikulum (SR) har vært foreslått å føre til opphopning av Ca^{2+} i cytosol etter mekanisk stress (Gissel & Clausen, 2001). En annen mekanisme er redusert Ca^{2+} ATPase aktivitet som et resultat av metabolsk stress ved utvikling av muskeltretthet. Ca^{2+} ATPasen, også kjent som Ca^{2+} pumpen (SERCA), er lokalisert på SR membranen og ved hjelp av ATP pumper den Ca^{2+} fra cytosol tilbake til SR. Et lavt nivå av

ATP, noe som er vist hos langdistansesyklister og maratonløpere etter langvarig muskellarbeid, vil potensielt også kunne hemme Ca^{2+} pumpens evne til å fjerne Ca^{2+} fra cytosol (Tee et al., 2007). Slike forstyrrelser i Ca^{2+} homeostasen vil videre resultere i forstyrrelser i E-C koplingen.

2.2 Forstyrrelser i E-C kopling

En muskelkontraksjon initieres av et aksjonspotensial (AP) som oppstår i den nevromuskulære synapsen. AP propageres videre langs sarkolemma fram til T-rørene. Der skaper aksjonspotensialet en konformasjonsendring i dihydropyridin reseptorene (DHPR) som fører til en ladning som beveger seg til ryanodinreseptorene (RyR) på SR. RyR åpnes og dermed frisettes Ca^{2+} fra SR. Dette fører til økt fritt Ca^{2+} i cytosol og Ca^{2+} binder seg til Troponin C. Denne forbindelsen endrer posisjonen til tropomyosin og tillater dannelse av tverrbroforbindelse mellom aktin og myosin. Forbindelsen mellom aktin og myosin legger til rette for aktivering av tverrbrosyklus slik at kan kraft kan utvikles. Ved avslapping dissosierer Ca^{2+} fra troponin C og aktin og myosin kobles fra hverandre. Til slutt blir Ca^{2+} pumpet tilbake til SR av SERCA (Allen et al., 2008). Hele denne prosessen kalles E-C kopling. Forstyrrelser som oppstår hvor som helst i denne prosessen vil i teorien kunne bidra til redusert muskelkraft.

Endringer i E-C kopling kan bli indikert av en utvikling av lavfrekvent tretthet målt gjennom kraftresponsen ved elektriske stimuleringer. Bruk av elektrisk stimulering eliminerer det sentrale bidraget fra nervesystemet i utviklingen av muskeltretthet og kan kontrollere intensiteten av muskelaktiveringen. Det betyr at endringer i kraftrespons ved elektrisk stimulering skyldes endring nedstrøms for AP propagering (Allen et al., 2008). Lavfrekvent tretthet vil si at kraftresponsen reduserer i større grad ved elektrisk stimulering på lav frekvens (~20 Hz) sammenliknet med høy frekvens (50-100 Hz) (Raastad et al., 2010). Redusert Ca^{2+} frigjøring fra SR virker å være hovedårsaken til lavfrekvent krafttap hos mennesker (Cheng et al., 2020; Hill et al., 2001). En nyere studie av Olsson og kolleger (2020) fant at redusert fritt Ca^{2+} korrelerte godt med reduksjonen i kraftutvikling både ved lavfrekvent og høyfrekvent elektrisk stimulering av intercostale muskler. De isolerte muskelfibrene ble deretter tilsatt koffein, som legger til rette for Ca^{2+} frigjøring. Dette førte til at kraftresponsen ved høyfrekvent stimulering ble fullt restaurert. Ved lavfrekvent stimulering etter tilsettelse av koffein ble det observert en økning i fritt Ca^{2+} , noe som faktisk førte til en stor økning i kraftutvikling. Det ble dermed konkludert at redusert Ca^{2+} frigjøring

fra SR var hovedmekanismen bak kraftreduksjonen ved muskeltretthet i denne studien (Olsson et al., 2020). Redusert Ca^{2+} frigjøring fra SR er også blitt foreslått som den viktigste mekanismen for lavfrekvent krafttap rett etter 100 utførte fallhopp (Kamandulis et al., 2017). Det har tidligere blitt foreslått at en fragmentering av RyR har ført til en redusert Ca^{2+} frigjøring etter høyintensivt arbeid på sykkel induisert av økt mengde reaktive oksygenarter (ROS) (Place et al., 2015). Dette ser derimot ikke ut til å være tilfellet ved mekanisk krevende muskelarbeid (f.eks. eksentrisk arbeid) ettersom at ingen endring i ROS ble observert etter 100 fallhopp (Kamandulis et al., 2017). I samme studie ble det heller ikke oppdaget noen fragmentering av RyR etter fallhopp. Det er mulig at mekanisk stress induisert av eksentrisk muskelarbeid fører til Ca^{2+} innstrømning fra ekstracellulært område og på denne måten forstyrrer E-C koplingen (Gissel & Clausen, 2001).

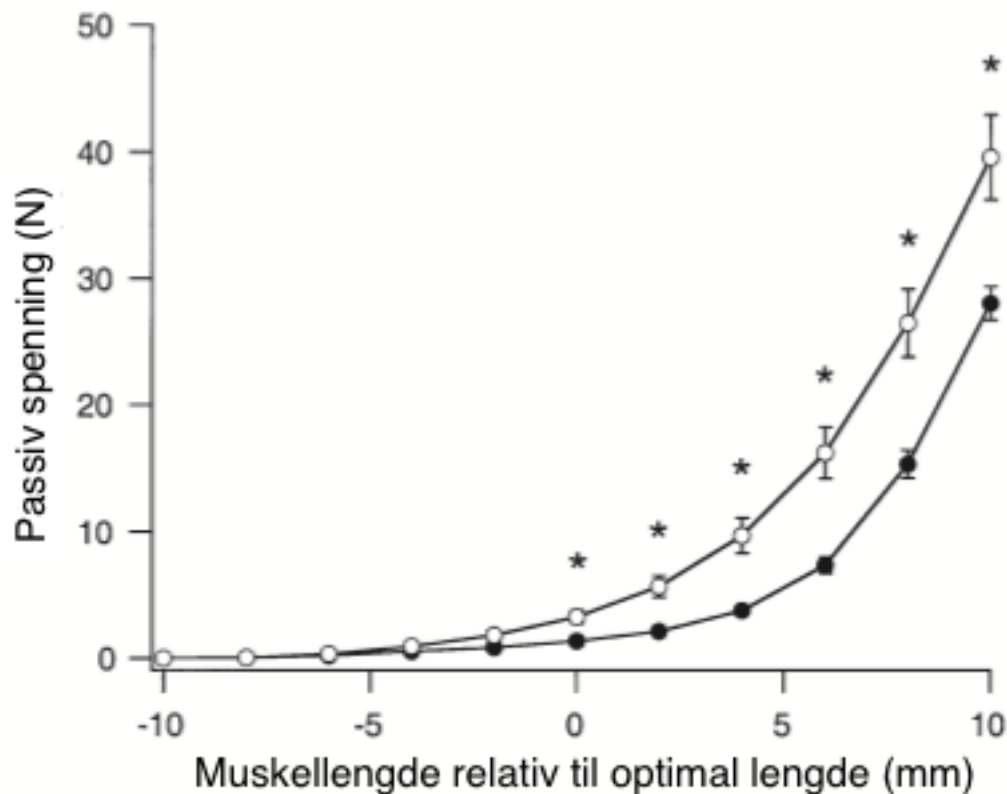
Det er vist en $48 \pm 4\%$ reduksjon i 20:50 Hz kraftratioen etter maksimalt eksentrisk arbeid på kneekstensorene (Raastad et al., 2010). Dette ble etterfulgt av en gradvis restitusjon hvor 20:50 Hz kraftratioen returnerte tilbake til normalverdi etter 2 dager. En tidligere studie fant også dette tidsforløpet hvor 20:80 Hz kraftratioen falt signifikant på kneekstensorer etter ett-bens hinking i nedoverbakke på tredemølle og returnerte til normalverdi etter 48 timer (Martin et al., 2004). Disse funnene indikerer at utvikling av lavfrekvent tretthet er involvert i muskelens reduserte kraftutviklingsevne fram til 2 dager etter eksentrisk muskelarbeid.

Den langvarige reduksjonen i lavfrekvent tretthet skyldes sannsynligvis skade på sarkolemma og åpning av strekk-aktiverte Ca^{2+} -kanaler, etterfulgt av Ca^{2+} innstrømning i sarkoplasma (Dundon et al., 2008). Ukontrollert innstrømning av Ca^{2+} fører også til dannelse av tverrbroer som skaper kontrakturer i muskelvevet. Dette spiller trolig en viktig rolle i økt muskulær fjærstivhet etter eksentrisk arbeid (Whitehead et al., 2001).

2.3 Fjærstivhet i muskelvevet

Når musklene blir strukket utover sin hvilelengde utvikles en passiv spenning som en motstandsmekanisme mot muskelforlengelse (Hoang et al., 2007). Musklene fungerer på denne måten som en strikk eller fjær hvor den passive spenningen øker eksponentielt med økt muskellengde (Figur 2.3). En høyere passiv spenning ved ulike muskellengder (dvs. økt passiv motstand mot muskelforlengelse) har i litteraturen blitt referert som økt fjærstivhet i muskelvevet (Hoang et al., 2007; Lacourpaille et al., 2017; Whitehead et al., 2001). Økt fjærstivhet i muskelvevet er blitt observert flere ganger etter eksentrisk arbeid og har blitt

etablert som et vanlig symptom for EIMD. Chleboun et al. (1998) observerte en økt fjærstivhet på $60 \pm 14\%$ i albuefleksorene umiddelbart etter eksentrisk arbeid og som var økt i opptil 5 dager etter arbeidet. Videre fant Whitehead et al. (2001) at passivt dreiemoment økte i plantarfleksorene med $41 \pm 13\%$ rett etter et eksentrisk arbeid. Passivt dreiemoment økte deretter gradvis fram til 24 timer etter arbeid før det ble redusert igjen. Omtrent det samme tidsforløpet i passivt dreiemoment ble også observert i plantarfleksorene av Hoang et al. (2007).



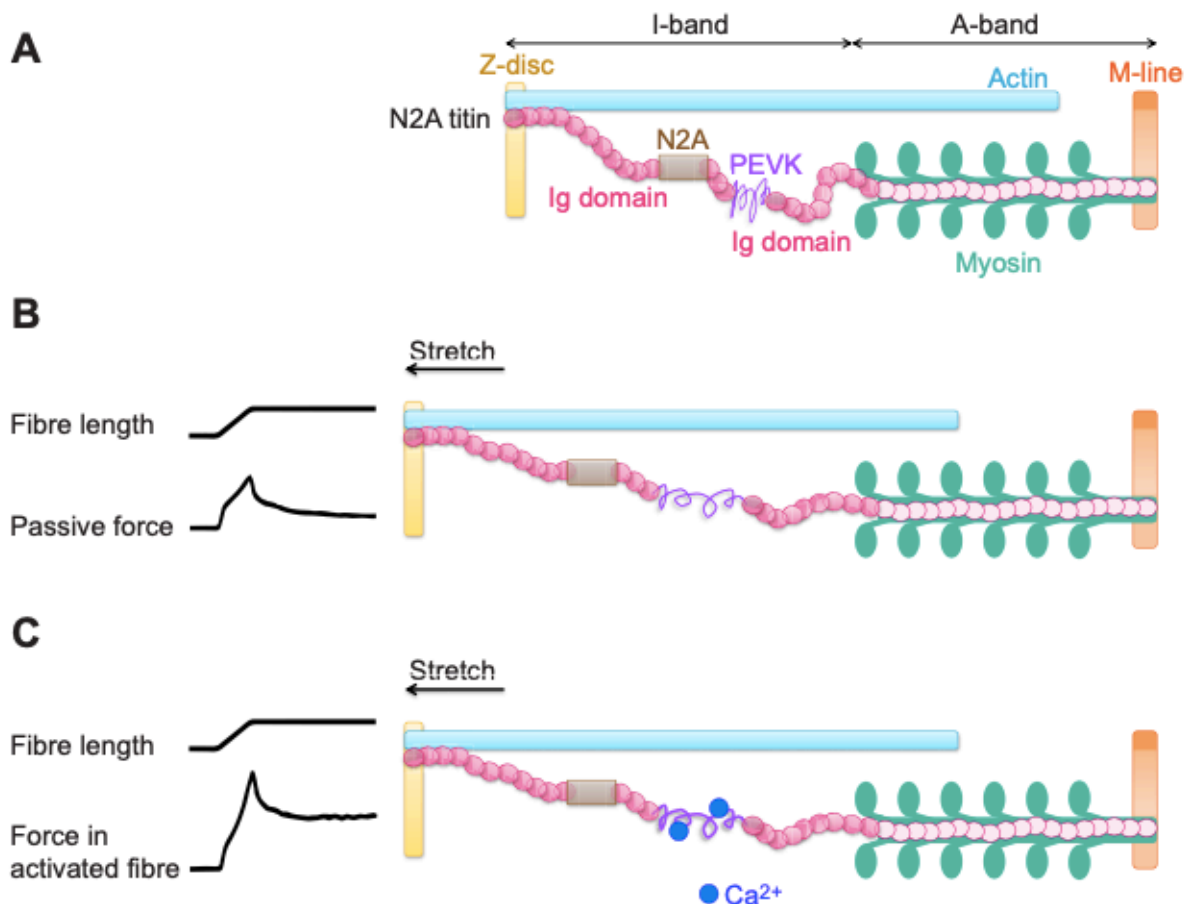
Figur 2.3: Eksempel på økt muskelstivhet. Grafen viser passiv spenning ved ulike muskellengder relativt til muskelens optimale lengde før (sorte sirkler) og etter (åpne sirkler) eksentrisk arbeid. * = signifikant forskjellig fra kontrollverdi. Verdiene vises som gjennomsnitt \pm SEM. Figuren er hentet fra Whitehead et al. (2001).

2.3.1 Cellulære mekanismer for økt fjærstivhet i muskelvevet

Det er tidligere blitt foreslått at skade i muskelen induisert av eksentrisk arbeid leder til økt hevelse som følge av inflammatorisk respons og økning i ekstracellulær væske. Dette stresser passive elastiske elementer i muskelen som fører til økt passiv spenning (Whitehead et al., 2001). Denne hevelsen i musklene øker derimot ikke før 1-2 dager etter eksentrisk

arbeid (Chleboun et al., 1998). Dette tilsier at økt hevelse i musklene ikke kan forklare økt fjærstivhet like etter eksentrisk arbeid og dermed spiller en liten rolle for de raske endringene i fjærstivhet (Whitehead et al., 2001). Som forklart tidligere kan gjentatte eksentriske kontraksjoner føre til rupturer på membranen i muskelcellene. Hypotesen er at dette igjen fører til en forstyrrelse av Ca^{2+} homeostase i form av økt intracellulært fri Ca^{2+} som videre leder til aktivering av tverrbrosyklus og trigger et lavt nivå av aktivering i det kontraktile apparatet (Hoang et al., 2007; Whitehead et al., 2001). Dette vil i teorien skape små kontrakturer i musklene ved hvile og dermed øke den passive muskelspenningen.

Det er også blitt foreslått at det store elastiske proteinet titin spiller en rolle for den passive spenningen i sarkomerene (Hoang et al., 2007). Titin er et enormt protein, med en molekylær vekt på 3-4 MDa, og er forankret i Z-disken og til M-linje regionen i sarkomeren. Funksjonen til titin er å bevare organiseringen mellom de tykke og tynne filamentene i sarkomerene, holde myosin sentrert i midten av sarkomeren, og unngå feil overlapping mellom A bånd og I bånd (Colombini et al., 2016). Rollen til titin i musklenes passive spenning kan forklares gjennom de ulike områdene i proteinet. Ved korte sarkomerlengder vil en forlengelse av muskelen skape strekk i Ig-domenet, som til vanlig er foldet. Dette skaper kun en liten økning i passiv kraft. Ved lengre sarkomerlengder derimot, øker den passive kraften mye mer ved forlengelse. Dette er fordi PEVK segmentet på titin blir strukket og fungerer som en fjær (Colombini et al., 2016). Videre er det foreslått at økt intracellulært Ca^{2+} etter eksentrisk arbeid fører til at Ca^{2+} binder seg til PEVK segmentet, noe som øker den titin-baserte kraftresponsen til forlengelse av sarkomerene (Figur 2.4). Altså fjærstivheten på titin forventes å øke ved økt Ca^{2+} i cytosol (Freundt & Linke, 2019).



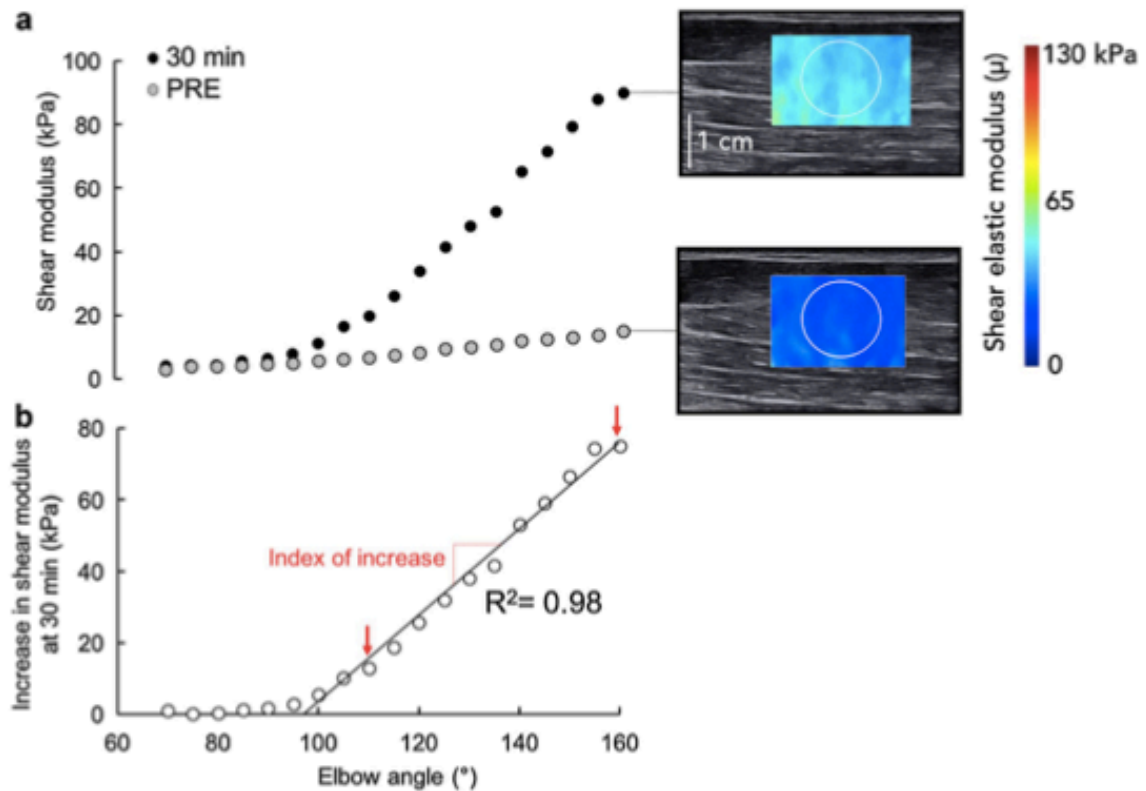
Figur 2.4: En illustrasjon av titin i tre ulike faser; avslappet fase (A), utstrakt fase (B) og utstrakt fase hvor Ca^{2+} er bundet til PEVK segmentet (C). Kraftkurvene til venstre illustrerer den passive spenningen ved endring i muskellengde under de ulike fasene (B og C). Legg merke til at kraftresponsen ved endring i muskellengde er større når Ca^{2+} er bundet til PEVK segmentet på titin. Figuren er hentet fra Colombini et al. (2016).

2.3.2 Shear wave elastografi

Siden måling av passivt dreiemoment reflekterer en sammensetning av ulike muskulære og ikke-muskulære strukturer (f.eks. sener, hud, leddstruktur og ligamenter) vil ikke en slik måling gi oss et direkte og nøyaktig estimat for de mekaniske egenskapene i de enkelte muskelvevene (Lacourpaille et al., 2014). Den kvantitative ultralyd-baserte teknikken shear wave elastografi (SWE) har i senere år vist seg som et lovende verktøy for å undersøke mekaniske egenskaper i muskelvev (Eby et al., 2013). SWE baserer seg på at ultralydproben sender trykkbølger i muskelen som videre danner bølger («shear waves») som propageres vinkelrett ut i muskelvevet. Hastigheten på disse bølgene blir så målt kvantitativt for å kunne kalkulere shear modulus (mål for vevets fjærstivhet). Ved stivere vev, vil hastigheten på

shear bølger øke og dermed gi høyere shear modulus (Brandenburg et al., 2014). De fleste SWE teknikker er basert på antakelsen om at det underliggende vevet er isotropisk, slik som i lever og brystvev. Det vil si at de mekaniske egenskapene er like i hele vevet. Muskler er på den andre siden anisotropisk, altså at de mekaniske egenskapene er ulike mellom muskelfiberne. For å oppnå nøyaktige og reliable målinger bør derfor ultralydproben plasseres longitudinelt med muskelfiberne (Brandenburg et al., 2014; Eby et al., 2013). Selv om SWE kun måler lokale endringer i muskelen er shear modulus vist å korrelere godt med Young's modulus som er basert på målinger av global belastning gjennom hele muskelvevet. Dette indikerer at lokale SWE målinger er valide og kan reflektere mekaniske egenskaper over hele muskelen (Eby et al., 2013).

Det er videre gjort undersøkelser av SWE målinger, hvor det er funnet signifikant økning i shear modulus like etter eksentrisk arbeid (Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017). Denne økningen var tilsvarende for den distale, mediale og proksimale delen av m. biceps brachii i tillegg til m. brachialis (Lacourpaille et al., 2014). Økningen i shear modulus var høyere og holdt seg forhøyet over lengre tid ved 160° sammenliknet med 110° vinkel i albueleddet, mens ingen økning ble funnet ved 70° vinkel (180° tilsvarte full ekstensjon) (Lacourpaille et al., 2014; Lacourpaille et al., 2017). Dette viste at muskellengdens påvirkning på de mekaniske egenskapene i musklene, målt med globale målinger, også ble observert på innenfor et interesseområde (ROI) på muskelen. Figur 2.5 viser et eksempel på hvordan endring i muskellengde påvirker shear modulus. Det er blitt foreslått av Stephenson & Wendt (1984) at Ca^{2+} sensitiviteten øker ved lengre muskellengder (Lacourpaille et al., 2017). Den høyere økningen av shear modulus ved lengre muskellengder kan dermed skyldes involvering av Ca^{2+} avhengige prosesser som tverrbroforbindelse og stivere titin (Lacourpaille et al., 2014).



Figur 2.5: Eksempel på SWE og hvordan shear modulus øker ved økende albuevinkel (økende muskellengde) før (grå prikker) og etter (sorte prikker) eksentrisk arbeid. (a) viser hvordan endring i shear modulus ser ut visuelt innen et interesseområde (ROI; de blå rektanglene). (b) viser en lineær sammenheng mellom endring i albuevinkel og endring i shear modulus fra omtrent 100° til 160° . Bildet er hentet fra (Lacourpaille et al., 2017).

På bakgrunn av dette og at myofibrillære rupturer og skade på membranen resulterer i økt intracellulært Ca^{2+} , ønsket Lacourpaille et al. (2017) å undersøke sammenhengen mellom økt shear modulus og omfanget av muskelskade. De fant en sterk korrelasjon mellom endring i maksimal voluntær isometrisk kontraksjon (MVIK) 48 timer etter eksentrisk arbeid og endring i shear modulus 30 min etter eksentrisk arbeid både for kneekstensorer ($r = -0,82$) og albuefleksorer ($r = -0,80$). Ettersom at reduksjon i maksimal kraftutvikling like etter eksentrisk arbeid er konfundert av muskeltretthet, vil shear modulus potensielt kunne gi oss et raskt og ikke-invasivt mål på omfanget av muskelskade (Lacourpaille et al., 2017).

Likevel er det fremdeles uklart om shear modulus har en sammenheng med andre tegn på muskelskade som for eksempel HSP-respons og andel av skadde muskelfibre (Lacourpaille et al., 2017).

Det er blitt foreslått at forbindelse av HSP kan bidra til endring i titin-basert fjærstivhet (Freundt & Linke, 2019). HSP akkumulering i musklene vil bli beskrevet nærmere senere i dette kapittelet. Denaturering av proteindomener i titin innebærer en risiko for misfolding, noe som har blitt observert i Ig-domenet (Freundt & Linke, 2019) Det er vist å føre til en forbindelse av Hsp27 og α B-crystallin til Ig-domenet ved I-bånd regionen på titin (Kötter et al., 2014). En bieffekt av denne forbindelsen ser videre ut til å være en mild økning i titin-basert fjærstivhet (Unger et al., 2017), muligens grunnet mekanisk stabilisering av fjærfunksjonen på titin (Freundt & Linke, 2019). En akkumulering av små HSP (sHSP) kan dermed føre til en liten økning i titin-basert fjærstivhet etter eksentrisk arbeid.

Både økt fjærstivhet i muskelvev og en langvarig lavfrekvent tretthet skyldes sannsynligvis økt Ca^{2+} -innstrømning i cytoplasma gjennom skade på sarkolemma og åpning av strekk-aktiverede Ca^{2+} -kanaler (Dundon et al., 2008; Lacourpaille et al., 2017; Whitehead et al., 2001). Siden økt Ca^{2+} trigger til proteolyse i cytoplasma gjennom aktivering av proteaser, kan en forsinket restitusjon av lavfrekvent tretthet og en tidlig økning i fjærstivhet i muskelvevet reflektere en regenereringsprosess relatert til proteinnedbrytning.

2.4 Økt intracellulær Ca^{2+} fører til aktivering av calpain

Økt konsentrasjon av fri Ca^{2+} i cytosol er vist å resultere i proteindegradering i muskelcellen gjennom aktivering av Ca^{2+} aktiverte proteaser. Blant disse ser det ut til at calpain har fått mest oppmerksomhet i litteraturen (Belcastro et al., 1998). Det er vist at calpain-aktiviteten økte etter eksentrisk arbeid og samtidig korrelerte med økt myofibrillære skader og redusert evne til kraftutvikling (Raastad et al., 2010). Det ble foreslått en økt Ca^{2+} konsentrasjon i cytosol etter eksentrisk arbeid og at aktivering av den Ca^{2+} -avhengige proteolytiske signalveien spiller en rolle i EIMD. Calpain ser videre ut til å ko-lokalisere seg ved flere strukturelle proteiner rundt Z-diskene, blant annet det mellomliggende filamentet desmin (Barash et al., 2002). Desmin forbinder to sideliggende Z-disker og spiller en viktig rolle for den laterale kraftoverføringen mellom sarkomerene. Økt konsentrasjon av fri Ca^{2+} i cytosol vil, gjennom aktivering av calpain og degradering av strukturelle proteiner (f.eks. desmin) kunne være av betydning for muskelens evne til kraftutvikling (Raastad et al., 2010).

2.5 Blodmarkører

Økt calpainaktivitet, sammen med mekanisk skade på sarkolemma, bidrar også til økt membranpermeabilitet gjennom degradering av membranproteiner. Dette resulterer videre i

at ulike muskelproteiner lekker ut i blodet (Allen, 2004). Kreatinkinase (CK), myoglobin, troponin I og laktatdehydrogenase (LDH) er eksempler på proteiner som lekker ut i blodet etter muskelødeleggende arbeid og blir ofte brukt som markør for å indikere omfanget av muskelskade (Chen et al., 2020; Markus et al., 2021). Blant disse har CK i blodserumet fått mest oppmerksomhet, muligens fordi økningen i blodet er så stort i forhold til andre proteiner (Clarkson & Hubal, 2002). Nivået av CK i blodserumet blir blant annet benyttet som markør i diagnostisering av raddomyolyse (Cabral et al., 2020). Blodmarkører som målemetode på muskelskade kan på den andre siden være problematisk fordi det er et produkt av hva som blir frigjort fra muskelen og hva som blir fjernet fra blodet. I tillegg viser blodmarkører store individuelle variasjoner og blir ikke ansett som en særlig valid målemetode på muskelskade (Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen et al., 2012). Den økte membranpermeabiliteten vil også føre til at mer Ca^{2+} strømmer inn i muskelcellen og skaper mer ødeleggelser. På denne måten går muskelcellen inn i en slags «ond sirkel» av ødeleggende hendelser og cellulær nekrose kan til slutt oppstå som «verste» utfall (Gissel & Clausen, 2001).

Det finnes noen cellulære mekanismer som har en beskyttende effekt mot EIMD. Blant annet akkumuleres visse proteiner i muskelcellene og som fungerer som en beskyttelsesmekanisme ved EIMD. Disse proteinene blir kalt heat shock proteiner (HSP) og responderer på muskulært stress (f.eks. EIMD). Deres spesielle funksjon gjør det mulig å nærmere undersøke muskelskade på cellulært nivå ved å bruke HSP som en biomarkør. For å kunne undersøke nærmere HSP-responsen ved EIMD kreves histologiske metoder (f.eks. western blot og immunohistokjemi). Slike metoder kan ha sine begrensninger ettersom de krever biopsitaking (5-20 mg muskelvevsprøver). Det er derfor usikkert om denne lille muskelbiten er representativ for hele muskelen (Paulsen et al., 2012).

2.6 Heat shock proteiner

Navnet «heat shock proteiner» stammer fra en gammel studie fra 1962 hvor bananfluer ble eksponert for høy varme. Det ble observert at de bananfluene med høyest HSP akkumulering hadde størst sannsynlighet for å overleve (Ritossa, 1962). Navnet er noe misvisende siden HSP også responderer på mange andre stressfaktorer. HSP blir ofte omtalt som «chaperoner» som beskriver en gruppe proteiner som er ansvarlige for vedlikehold av den native strukturen i celleproteiner (Tikhomirova et al., 2017). Chaperonene har en viktig funksjon ved å hjelpe nye ikke-foldede proteiner med å folde seg til sin native form slik at de blir aktive i sin

funksjon. I tillegg hindrer chaperonene også aggregering (dvs. misfoldede proteiner som klumper seg sammen) og hjelper misfoldede proteiner med å folde seg tilbake til sin native form (Liu et al., 2006). Basert på molekylær masse er HSP delt inn i ulike familier; Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47 og små HSP (sHSP) (Tkáčová & Angelovičová, 2012). Disse har også ulike funksjoner i cellene. I dette underkapittelet vil det være fokus på sHSP, spesielt α B-crystallin, og Hsp70.

2.6.1 Små heat shock proteiner

Ved normale forhold er sHSP bundet i store polydisperse og strukturelt heterogene oligomerer av ikke-fosforylerte molekyler på 200-800 kDa (Koh, 2002). I disse oligomerene skjer dynamiske utvekslinger av protein-underenheter (Tikhomirova et al., 2017). Ulike stressorer resulterer i fosforylering av sHSP som videre kan føre til en omlegging av oligomeriske strukturer som gir mindre komplekser, vanligvis dimere (Tikhomirova et al., 2017; Źwirowski et al., 2017). Dette påvirker videre den cellulære lokaliseringen og chaperone-funksjonen. sHSP binder seg med aggregeringsutsatte proteiner gjennom hydrofobe områder som er eksponert på overflaten av aggregatene. En omstrukturering av oligomerer til mindre komplekser øker eksponeringen av hydrofobe områder. Dette stimulerer til sHSP-forbindelse med utsatte substratproteiner (Boelens, 2014).

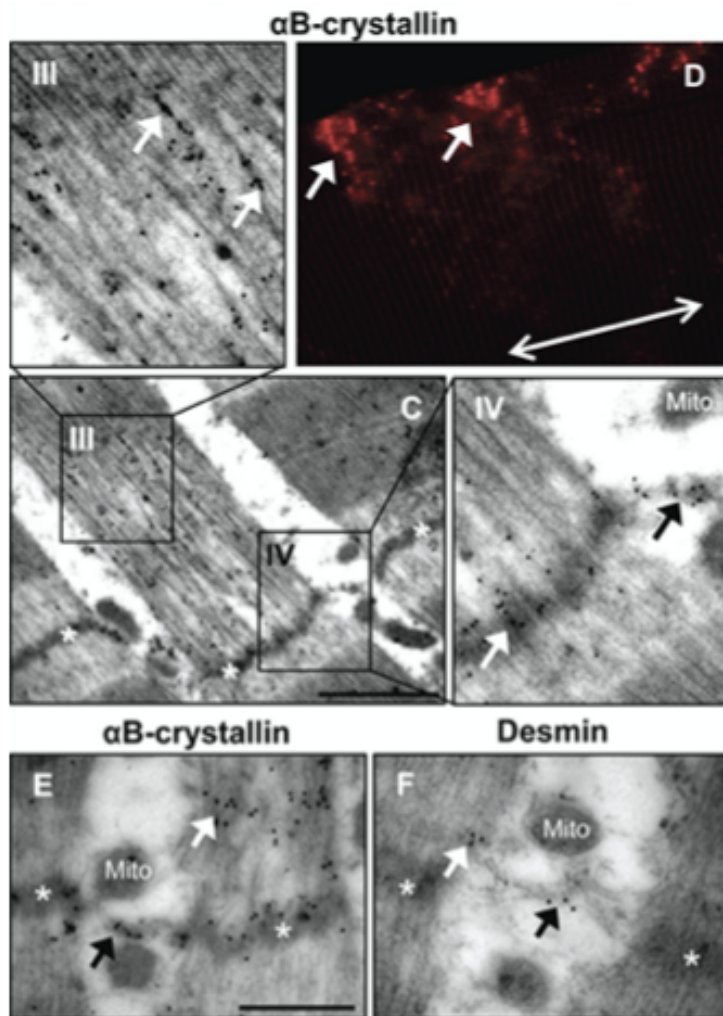
Under cellestress er sHsp den fremste forsvarslinjen og en nøkkelfaktor i modifiseringen av proteinaggregering (Źwirowski et al., 2017). sHSP er ATP-uavhengige chaperoner som er i stand til å raskt fange skadde og misfoldede proteiner gjennom en såkalt «holder»-aktivitet som skjerner hydrofobe områder fra overflaten og dermed hindre protein aggregering (Dimauro et al., 2018; Tikhomirova et al., 2017). sHSP virker å gjenkjenne og binde seg til proteiner som misfoldes under stress, men ser ikke ut til å katalysere refolding av proteinene (Jakob et al., 1993). I stedet, gjennom interaksjon, inhiberer sHSP videre misfolding av skadde proteiner og legger til rette for ATP-avhengige chaperoner (f.eks. Hsp70) til å refolde proteinene til dets native og funksjonelle form (Boelens, 2014). Dette gjør de ved å danne sHSP-substrat samlinger hvor sHSP danner et ytterskall på utsiden av samlingene. Dette ytterskallet skjerner hydrofobe områder på overflaten i substratet og former en selektiv barriere som kun blir penetrert av Hsp70. sHSP-substrat samlingen fører også til at høyere Hsp70-konsentrasjon kreves for å løse opp proteinaggregatene enn hvis de aggregerte proteinene ikke var bundet til sHSP (Źwirowski et al., 2017). På denne måten er sHSP

involvert i viktige cellulære funksjoner som stress toleranse, protein folding og opprettholdelse av integritet i cellestrukturen (Bakthisaran et al., 2015).

2.6.2 α B-crystallin

Som en del av sHSP-familien har α B-crystallin tilvarende lik funksjon som andre sHSP. Likevel skiller α B-crystallin seg fra de andre på ulike måter. Det har tidligere vært trodd at α B-crystallin utelukkende var uttrykt i øyelinsen (Dimauro et al., 2018). Selv om α B-crystallin er sterkt uttrykt i øyelinsen, er det også blitt vist at de uttrykkes i hjertemuskelen, hjernen, nyrene og i skjelettmuskulaturen (Boelens, 2014; Dimauro et al., 2018). Under normale forhold er α B-crystallin, akkurat som andre sHSP, lokalisert i cytosol samlet i store heterogene oligomerer (Dimauro et al., 2018; Tikhomirova et al., 2017). Under cellostress i skjelettmuskulaturen blir α B-crystallin raskt fosforylert som påvirker lokaliseringen og chaperone-aktiviteten (Boelens, 2014).

α B-crystallin er vist å binde seg meg strukturelle proteiner som aktin, desmin og titin (Tikhomirova et al., 2017). Blant annet har iskemisk stress i hjertet vist en rask translokering av α B-crystallin fra cytosol til I-båndet i sarkomeren og interaksjon med proteinet titin (Bakthisaran et al., 2015; Boelens, 2014; Koh, 2002). Rask akkumulering av sHSP til områder rundt Z-diskene er også blitt funnet etter maksimalt eksentrisk muskelarbeid hvor α B-crystallin akkumulerte til skadde områder rundt Z-diskene i større grad enn Hsp27 (Figur 2.6) (Paulsen et al., 2009). I samme studie virket α B-crystallin å binde seg spesielt til desmin-liknende strukturer. Disse resultatene stemmer også med en tidligere studie av Koh og Escobedo (2004) hvor eksentrisk muskelarbeid gjort på mus ga en akkumulering av α B-crystallin i områder rundt Z-disk og membran.



Figur 2.6: Bildet viser muskelprøver 1 og 48 timer etter eksentrisk arbeid som ble merket for α B-crystallin og desmin. Bilde C, E og F er fra elektronmikroskopi (EM), mens D er konfokal mikroskopi (KM). Pilene på EM bildene (III og IV) peker på gullpartikler som markerer α B-crystallin. Legg merke til at pilene på bilde IV peker på en Z-disk nært en skadd myofibrill og til et mellomliggende filament (antageligvis desmin). Pilene på KM bildet (D) viser retningen på fibrene og områder med høy immunoreaktivitet for α B-crystallin. * markerer Z-disker; Mito: mitokondria. Bilde E og F viser immuno-gullmerkning av α B-crystallin og desmin. Pilene markerer gullpartikler som markerer α B-crystallin og desmin. Figuren er hentet fra Paulsen et al. (2009)

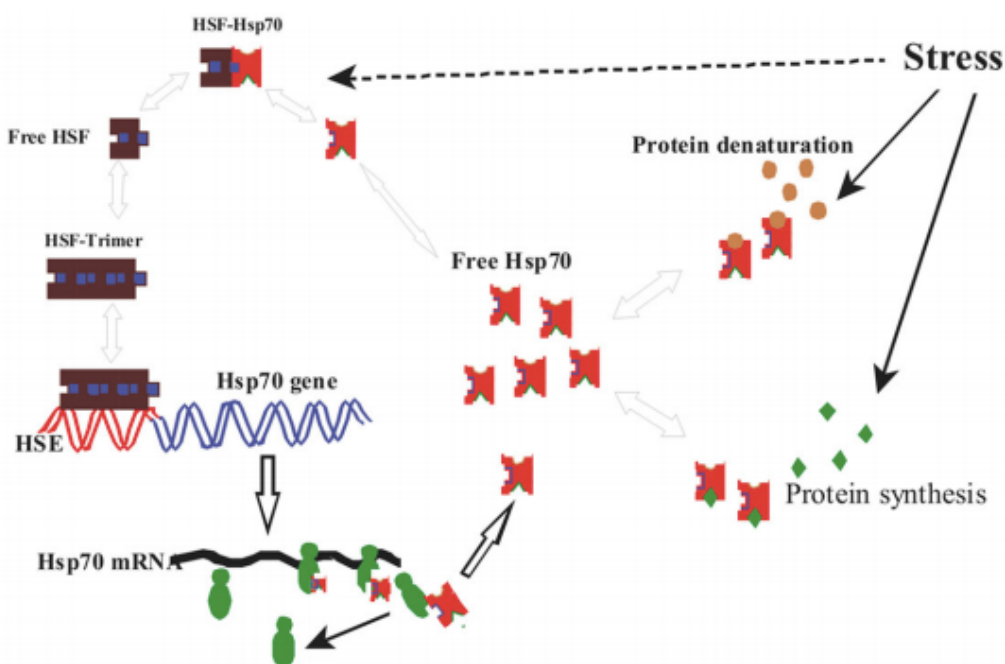
2.6.3 Hsp70

HSP70-familien kommer i fire hovedformer basert på molekylær masse, 72 kDa, 73 kDa, 75 kDa og 78 kDa. Hsp70 er involvert i ulike cellulære prosesser og er en viktig molekylær chaperon fordi den bidrar til å opprettholde cellens homeostase. Som en chaperon hjelper

Hsp70 med å folde ikke-foldede og misfoldede proteiner til deres funksjonelle native form i tillegg til å hindre aggregering ved å binde seg på hydrofobe områder. Dette gjør Hsp70 viktig i beskyttelsen og repareringen av skadde proteiner ved cellulært stress. I tillegg til folding av substratproteiner har Hsp70 også en viktig funksjon gjennom sensing av stress. Det vil si at Hsp70 gjenkjenner skadde proteiner og binder seg til dem, noe som trigger oppregulering av Hsp70 (Figur 2.7) (Liu et al., 2006).

2.6.4 Regulering av Hsp70 respons

Under normale forhold i cellene er Hsp70 bundet til det regulatoriske proteinet heat shock factor-1 (HSF1). (Liu et al., 2006; Silver & Noble, 2012). Ved cellostress frigjør Hsp70 seg fra Hsp70-HSF1 komplekset for å binde seg til skadde proteiner og utføre sin chaperon-funksjon. Denne frigjørelsen tillater HSF1 å inngå i en trimer formasjon som gir en høy affinitet til å binde seg til en spesifikk sekvens i promoter genet til Hsp70 kalt heat shock element (HSE). Denne HSF1-HSE forbindelsen initierer Hsp70 transkripsjon og videre syntese av Hsp70 (Figur 2.7) (Liu et al., 2006).



Figur 2.7: Regulering av Hsp70 akkumulering. Denaturerte og ikke-foldet proteiner fører til at Hsp70 frigjør seg fra HSF1. Dette tillater HSF1 til å danne en trimerformasjon som binder seg til HSE på promoter regionen Hsp70-genet. Dette fører til initiering av transkripsjon av Hsp70 mRNA som videre fører til Hsp70 syntese. Figuren er hentet fra Liu et al. (2006).

2.7 *HSP-respons til treningsindusert muskelskade*

Treningsrelaterte stressfaktorer som akkumulering av fri Ca^{2+} og stress på mellomliggende filamenter (f.eks. desmin) har vist å inducere Hsp70 i skjelettmuskulatur. I tillegg har fall i glykogen og ATP, akkumulering av laktat og fall i muskulær pH-verdi, samt økt ROS vist å inducere Hsp70 akkumulering (Liu et al., 2006). Andre faktorer som kan inducere Hsp70 er cytokiner (f.eks. IL-6) i forbindelse med inflammasjon etter EIMD (Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2012). På denne måten kan akkumulering av HSP fungere som en markør for å undersøke muskelskade.

HSP-responsen til stress er trolig sterkt assosiert med stressintensiteten (Bakthisaran et al., 2015; Liu et al., 2006). Likevel ser det ut til at responsen påvirkes av ulike faktorer. Blant disse er treningsstatus og treningshistorikk, hvor det er vist at både sHSP og Hsp70 responsen blir litt redusert i muskler hos veltrente eller personer som nylig har trent den aktuelle muskelen, referert i litteraturen som «repeated bout effect» (Liu et al., 2006; Paulsen et al., 2009; Vissing et al., 2009). Alder kan også ha en påvirkning på responsen gjennom redusert binding av HSF1 til HSE som tidligere er vist på aldrende mus (Vasilaki et al., 2003). Det er også vist på gnagere at østrogen kan dempe Hsp70 ekspresjonen etter trening i skjelettmuskulene, og at kjønn dermed kan være en påvirkende faktor for HSP-respons. Dette er derimot ikke funnet hos mennesker (Paroo et al., 2002).

I tråd med observasjoner fra flere studier virker det som responsen etter intensivt eksentrisk arbeid kan karakteriseres med en rask akkumulering av sHSP til skadde områder i sarkomeren (f.eks. Z-disk, I-bånd, desmin). Deretter skjer en litt forsinket akkumulering av Hsp70 som ser ut til å lokalisere seg på samme sted som sHSP (Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2007; Thompson et al., 2002; Vissing et al., 2009). Et slikt tidsforløp kan forklares ved at sHSP raskt binder seg på hydrofobe områder som er eksponert på overflaten av denaturerte proteiner. Dette fører til mindre proteinsamlinger hvor sHSP danner et yterskall som kun blir penetrert av Hsp70 (Żwirowski et al., 2017). Hsp70 akkumuleres deretter og tar over for sHSP gjennom en kompetitiv frigjøringsmekanisme hvor Hsp70 binding til proteinsamlingene frigjør sHSP, og kan dermed utføre sin folder-funksjon (Żwirowski et al., 2017). På denne måten kan vi gjerne si at sHSP og Hsp70 komplimenterer hverandre. I tillegg har det blitt rapportert etter eksentrisk arbeid at økning av αB -crystallin nivå i cytoskjelett ble sett sammen med reduksjon av αB -crystallin nivå i cytosol (Paulsen et al., 2009). Samme studien viste også at Hsp70 nivået økte i både cytoskjelett og cytosol. Dette

tilskrives translokasjon av α B-crystallin fra cytosol til cytoskjelett, samt en økt transkripsjon av Hsp70.

2.8 Faktorer som påvirker omfanget av muskelskade

En vesentlig utfordring i undersøkelser av fysiologiske mekanismer rundt EIMD er den store individuelle variasjonen mellom forsøkspersoner. Individuer har i noen studier blitt karakterisert som lav-, moderat-, eller høy-respondere basert på endringene i ulike markører for EIMD etter muskelødeleggende arbeid (Paulsen et al., 2012). Det er usikkert hvilke faktorer som bidrar til den varierende responsen. Det er mulig at faktorer som alder (Vasilaki et al., 2003), kjønn (Paroo et al., 2002), treningsstatus og -historikk kan bidra til denne variasjonen i respons (McHugh et al., 1999; Paulsen et al., 2009; Vissing et al., 2009). Genetiske faktorer har også blitt foreslått å spille en rolle i responsen til EIMD (Paulsen et al., 2012). Blant disse er ekspresjonen av det strukturelle proteinet α -aktinin-3.

2.8.1 α -aktinin-3

α -aktinin-3 (ACTN3) er et medlem av den aktin-bindende proteinfamilien α -aktinin som er store strukturelle nøkkelkomponenter for tynne aktin filamenter til Z-diskene i sarkomeren på type II muskelfibre (Del Coso et al., 2019; Vincent et al., 2010). Det er videre foreslått at α -aktinin-3 har en beskyttende effekt mot EIMD, både etter eksentrisk arbeid og etter maratonløping (Del Coso et al., 2017; Vincent et al., 2010). Omtrent 18% av verdens befolkning ser derimot ut til å mangle dette proteinet grunnet en mutasjon i ACTN3-genet (Ivarsson & Westerblad, 2015). Det er blitt forsøkt å sammenlikne personer med og uten ekspresjon av ACTN3 etter eksentriske kneekstensjoner (Vincent et al., 2010). Det var en større reduksjon i maksimal isokinetisk kraftutvikling ved 100°/sek og 200°/sek hos personene uten ACTN3-ekspresjon samt en høyere CK respons i blodet 24 timer etter arbeid sammenliknet med personene med ACTN3-ekspresjon. Samtidig var det ingen forskjell i reduksjon av isometrisk styrke eller Hsp70 mRNA ekspresjon mellom gruppene. Vincent et al. (2010) hevdet at det muligens kunne forklares av en kompenserende økning av α -aktinin-2 ettersom disse finnes i type II fibre hos begge gruppene. En senere studie gjort på erfarne maratonløpere etter en maratonkonkurranse viste at utøverne uten ACTN3-ekspresjon rapporterte høyere oppfattet utmattelse og muskelsårhet samt høyere CK- og myoglobin-nivå i blodet sammenliknet med utøverne med ACTN3-ekspresjon (Del Coso et al., 2017). De konkluderte med at personer uten ekspresjon av ACTN3 var mer utsatt for muskelskader

etter en maraton sammenliknet med personer med full ekspresjon av ACTN3. Det er mulig disse delvis motstridende funnene kan skyldes ulike intervensjoner hvor et maratonløp sannsynligvis vil indusere mer muskelskade enn totalt 80 eksentriske kneekstensjoner. Dette kan også være grunnet litt ulikt stress på type I og type II fibre. Det kan tyde på at personer uten ekspresjon av ACTN3 er mer utsatt for muskelskade sammenliknet med personer med ACTN3-ekspresjon, men at disse forskjellene trolig er marginale.

2.9 Oppsummering

EIMD etter eksentrisk arbeid sees som overekstenderte myofilamenter og ruptur i sarkolemma som videre fører til en kaskade av nedbrytende prosesser. Utflytende Z-disker har vært et vanlig direkte tegn på muskelskade. I tillegg har økt membranpermeabilitet ført til at intracellulære proteiner (f.eks. CK, myoglobin, Troponin I, LDH) lekker ut i ekstracellulært område og videre ut i blodet. Denne økte membranpermeabiliteten har også resultert i økt innstrømning av Ca^{2+} gjennom mikrorupturer i membran og/eller strekk-aktiverte Ca^{2+} kanaler. Dette fører til en forstyrrelse av Ca^{2+} homeostasen som videre resulterer i forstyrrelser i E-C koplingen. Et resultat av dette er langvarig reduksjon i muskelens evne til å utvikle kraft, både gjennom maksimale voluntære muskelaksjoner og gjennom lavfrekvent tretthet målt via elektriske stimuleringer. Den økte Ca^{2+} -innstrømningen er også antatt å føre til økt fjærstivhet i muskelvevet rett etter eksentrisk arbeid. Dette er trolig et resultat av økt fri Ca^{2+} i muskelcellens cytoplasma som resulterer i aktivering av tverrbrosyklus og økt stivhet i PEVK-segmentet på titin. Ultralyd SWE er i nyere tid vist å være et valid og reliabelt mål for fjærstivhet i muskelvevet. Med denne teknikken har økt fjærstivhet, målt som shear modulus, vist seg å korrelere godt med reduksjonen i muskelens evne til å utvikle kraft. Det trengs derimot videre undersøkelser hvor SWE sammenliknes med andre markører for EIMD for å med sikkerhet kunne si at økt fjærstivhet i muskelvevet kan være et tidlig og ikke-invasivt mål på muskelskade. Økt fri Ca^{2+} i muskelcellene har videre vist å føre til aktivering av calpain, som bidrar til degradering av strukturelle proteiner nært Z-diskene (f.eks. desmin). Dette resulterer videre i redusert kontraktile integritet og forstyrrelser i E-C kopling. Det er veletablert at α B-crystallin og Hsp70 spiller en beskyttende rolle ved EIMD. α B-crystallin translokteres raskt til skadde områder rundt Z-diskene og membranen for å forhindre aggregering av misfoldede proteiner. Deretter akkumuleres Hsp70 for å hjelpe de skadde proteinene med å folde seg tilbake til en funksjonell form. I undersøkelser av EIMD er inter-individuelle variasjoner en stor utfordring. Alder, kjønn, treningsstatus og treningshistorikk blir trukket fram som viktige

faktorer for denne variasjonen. Noen genetiske faktorer kan muligens også spille en rolle. Ekspresjon av ACTN3 kan se ut til å redusere responsen ved EIMD og ca. 18% av verdens befolkning har ikke genet til å produsere ACTN3. ACTN3 har vist å virke beskyttende ved ekstremt belastende aktiviteter som maratonløping, men er det usikkert om de har noen nevneverdig betydning ved eksentriske kontraksjoner.

3. Metode

Denne masteroppgaven var en del av doktorgradsprosjektet «*Recovery after Exercise-Induced Muscle Damage*». Prosjektet var en akuttstudie hvor forsøkspersonene utførte en enkelt økt med eksentrisk muskelarbeid, samt testing før og etter arbeidet. Det ble i tillegg utført tester de fire påfølgende dagene. Testene ble utført for å undersøke ulike aspekter av restitusjon etter eksentrisk muskelarbeid med stor kraftutvikling.

3.1 Rekruttering og inklusjon

Forsøkspersoner ble rekruttert ved hjelp av plakater, informasjon på sosiale medier, fysiske presentasjoner foran studenter og lignende. For å kunne delta i prosjektet måtte forsøkspersonene være mellom 18 - 35 år. Personer med sykdom eller skader i muskel-skjelett systemet ble ekskludert. Forsøkspersonene kunne heller ikke ha trent styrketrening på albuefleksorene regelmessig én eller flere ganger i uken det siste året. Totalt ble 15 forsøkspersoner inkludert i prosjektet. Før tilvenning ble satt i gang fikk hver enkelt deltaker utdelt et informasjonsskriv og signerte samtykkeskjema. Alle deltakerne fullførte protokollen, med noen unntak som blir beskrevet senere i metodekapittelet.

Forsøkspersonenes karakteristikk er beskrevet i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Karakteristika av forsøkspersonene ($n = 15$)

| Alder (år) | Kjønn (♂/♀) | Høyde (cm) | Vekt (kg) |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| 26.1 ± 3.7 | ♂ 8, ♀ 7 | 175.1 ± 8.6 | 75.3 ± 13.4 |

3.2 Studiedesign

Denne oppgaven var en akuttstudie hvor hver forsøksperson var sin egen kontroll. Det eksentriske arbeidet var randomisert mellom dominant og ikke-dominant arm mens den kontralaterale armen var kontroll og gjennomgikk alle testene utenom det eksentriske arbeidet. En oversikt over forsøksprotokollen er illustrert i figur 3.1 og viser når de ulike testene fant sted i forhold til eksentrisk arbeid.

| | Dag 1 | | | | | | | Dag 2 | Dag 3 | Dag 4 | Dag 5 | | | | | |
|-----------------------|-------|------|---------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|----|----|
| MVIK | | ⇓ | | ⇓ | | | ⇓ | ⇓ | ⇓ | ⇓ | ⇓ | | | | | |
| Elektrisk stimulering | | ⇓ | | | ⇓ | | | | | | | | | | | |
| Biopsi | | | | | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | | | | | |
| SWE | ⇓ | | | | ⇓ | | | | | | | | | | | |
| Aktivitet | | | Trening | | | | | | | | | | | | | |
| Tid | 0830 | 0930 | 1015 | 1030 | 1100 | 1130 | 1230 | 1330 | 0930 | 1030 | 0930 | 1030 | 0930 | 1030 | | |
| Timer etter trening | | | 0 | ½ | 1 | 2 | 3 | | 23 | 24 | 47 | 48 | 71 | 72 | 95 | 96 |

Figur 3.1: Oversikt over forsøksprotokoll. MVIK = Maksimal voluntær isometrisk kontraksjon, SWE = Shear Wave Elastografi, Trening = det eksentriske muskelarbeidet.

3.2.1 Protokoll for det eksentriske muskelarbeidet

Det eksentriske arbeidet bestod av totalt 50 maksimale eksentriske muskelkontraksjoner med albuefleksorene fordelt på 10 sett med 5 repetisjoner. Hensikten med dette var å fremkalle muskelskade (Paulsen et al., 2009). Det eksentriske arbeidet ble utført på et dynamometer (Humac® Norm™) hvor bevegelsehastigheten ble stilt inn til 30°/sekund. Forsøkspersonene ble satt i en preacher curl benk og en håndleddsrotose ble festet til dynamometeret for hindre bevegelse i håndleddet (Figur 3.2). Deltakerne fikk 30 sekunder hvileperiode mellom settene. Verbal oppmuntring ble gitt av testleder under hele arbeidet for å sikre maksimal innsats.



Figur 3.2: Bilde av forsøksperson festet på dynamometeret med håndleddsstøtse som utfører maksimalt eksentrisk arbeid.

3.2.2 Tilvenning til testprotokoll

Uken i forkant av testprotokollen gikk deltakerne gjennom en tilvenning av testene. Dette bestod av innstilling av dynamometer og sete tilpasset til hver enkelt forsøksperson. I tillegg ble alle testene unntatt biopsiene utført. Ved tilvenning av ultralydmålingene ble muskelaktiviteten målt med EMG gjennom den passive uttøyningen for å sikre fullstendig avslapping av de strukkede musklene.

3.3 Målinger

3.3.1 Shear Wave Elastography

Ultralyd shear wave elastografi (SWE) ble brukt for å estimere muskelens fjærstivhet gjennom shear modulus beskrevet av Lacourpaille et al. (2017). Proben sender trykkbølge mot muskelvevet som skaper bølger («shear waves») som propagerer vinkelrett ut i vevet. Muskelelastisiteten blir deretter målt gjennom kalkulering av hastigheten på disse bølgene. Hastigheten er direkte relatert til shear modulus, altså hastigheten er høyere i stivere vev (Cè et al., 2020). Tidspunkt på målingene er illustrert i figur 3.1. Ultralydproben ble vinklet longitudinelt med muskelfibrene og satt proksimalt for biopsi-snittene (Figur 3.3). Det ble markert med tusj og benyttet B-mode ultralyd for å finne spesifikke markører i muskelvevet slik at proben ble plassert på samme sted gjennom alle målingene. Målingene ble utført under passiv uttøyning mellom 90° og 10° vinkel på albueleddet (0° tilsvarer full ekstensjon) i en hastighet på 2°/sekund. Det ble også gjort statiske målinger ved 90° og 20° vinkel i albueleddet. Kun de statiske målingene ble tatt med videre i statistiske analyser og presentert i denne oppgaven. Forsøkspersonene ble bedt om å slappe av fullstendig under testing.

3.3.2 Maksimal voluntær kraftutvikling i albuefleksorene

Testing av maksimal voluntær kraftutvikling i albuefleksorene ble utført før og 5 minutter, 3, 24, 48, 72 og 96 timer etter eksentrisk arbeid. Ved bruk av dynamometer (Humac® Norm™) ble den maksimale kapasiteten for kraftutvikling i albuefleksorene målt som maksimal viljestyrt isometrisk styrke (MVIK) ved 80° vinkel i albueleddet. Verbal oppmuntring ble gitt under testene for å sikre maksimal innsats. Minst 2 forsøk ble gjort på hver test og foregikk helt til dreiemomentet på det siste forsøket var lik eller lavere enn det forgående forsøket. Forsøket med høyest dreiemoment ble regnet som maksimal kraftutvikling.

3.3.3 Elektrisk stimulering

Det ble utført elektrisk stimulering på begge armene før og 1 time etter eksentrisk arbeid for å måle endringer i muskelens evne til kraftutvikling hvor det sentrale bidraget til muskeltretthet var eliminert (Allen et al., 2008). Albueleddet ble satt på 80° leddvinkel og to elektroder ble festet over m. biceps brachii. Det ble merket med tusj rundt elektrodene slik at de ble plassert på samme sted før og etter arbeid. Under tilvenningen ble enkle impulser sendt med økende ampere for å etablere maksimal twitch. 75% av maksimal twitch ble deretter brukt under elektrisk stimulering med tog av impulser på 400 ms varighet med

frekvens på 20 og 50 Hz. Det ble gitt minst to støt på hver arm. Dersom maksimal kraft ved de to like stimuleringer på samme tidspunkt var forskjellige, ble det gjennomført én stimulering til. Krafratioen ved 20 og 50 Hz ble deretter regnet ut. Grunnet ubehag i forbindelse med testingen valgte én forsøksperson å ikke gjennomføre denne testen.

3.3.4 Muskelbiopsier

Muskelbiopsiene ble tatt 2, 48 og 96 timer etter arbeid (Figur 3.1). Biopsiene ble tatt på den distale delen av m. biceps brachii på begge armene. I forkant av biopsitakingen ble det satt lokalbedøvelse i huden og bindevevet rundt snittpunktet før huden ble desinfisert med klohexidin. Et lite snitt i huden og muskelfascien ble gjort før selve biopsien ble utført. I henhold til en modifisert Bergstrøm-teknikk ble en 6-mm biopsinål med manuelt vakuum brukt for å «suge» muskelvevet inn i nålen for deretter å klippe den av. Muskelvevet ble deretter fordelt og fryst i flytende nitrogen før det ble oppbevart i -80°C for videre analyser. 2 forsøkspersoner gjennomførte ikke den siste biopsitakingen (96 timer etter arbeid).

3.4 Analyser

3.4.1 Shear Wave Elastography

Før analysene ble videoklippene sjekket for om ultralydproben ble satt på samme sted fra pre til post. De klippene hvor probe plasseringen var ulik fra pre til post ble ekskludert fra studien. Elastografi data ble analysert ved bruk av ElastoGUI software utviklet av Valentin Doguet, Antoine Nordez og Francois Hug (2019) i Matlab. Gjennomsnittlig shear modulus (målt i kPa) ble målt over et interesseområde (ROI) (Figur 3.3) som var likt fra pre til post og fra 90° til 20°. Metning ble satt på 600 kPa.



Figur 3.3: Bildet til venstre viser selve ultralydmålingen utført på forsøksperson. Proben er plassert longitudinelt med muskelfibrene og proksimalt over m. biceps brachii. Bildet til høyre viser ultralydbilde med ROI (blått rektangel).

3.4.2 Fraksjonering av muskelbiopsier

For videre analyser ble muskelbiopsiene fraksjonert til cytosol, membran, nukleær og cytoskjelett i nevnt rekkefølge. ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit fra Calbiochem (cat. no. 539790) ble brukt til fraksjoneringen. En Protease inhibitor cocktail (PINC) ble tilsatt i alle fraksjonene for å hindre videre proteolyse i muskelvevet. Kun cytosol og cytoskjelett ble benyttet for videre analyser i denne oppgaven og detaljert beskrivelse av fraksjoneringen blir derfor gitt kun for disse.

For cytosolfraksjonene var vevsbiten i et 2,0 ml Eppendorf Protein LoBind rør hvor 1,0 ml Extraction Buffer I og 5 µl PINC ble tilsatt før prøven ble homogenisert i 3 x 5 sekunder, eller helt til vevet var løst opp, med knivhomogenisator. Prøvene ble etterpå lagt til risting i 10 minutter ved 4°C etterfulgt av sentrifugering i 10 minutter ved 1000 G og 4°C.

Supernatanten ble videre overført til 1,5 ml rør før den ble fordelt i 30 µl aliquoter i 0,2 ml rør. Røret med restpelleten ble lagt på is. Prøvene ble deretter lagret i -80°.

For cytoskjelettfraksjonene ble røret med restpelleten tilsatt 0,5 ml Extraction Buffer IV og 5 µl PINC. Røret ble så knipset eller ristet til pelleten var løst opp. Rørene ble satt i varmeblokk i 5 minutter på 90°C for å gjøre løsningen homogen. Prøvene ble videre sentrifugert i 10 minutter ved 10 000 G og 20°C. Supernatanten ble deretter overført til 1,5 ml rør og videre aliquotert på samme måte som cytosolfraksjonene før prøvene ble lagret i -80°C.

3.4.3 Proteinmåling

Måling av totalt proteininnhold i prøvene ble utført ved hjelp av DC Protein Assay kit fra BioRad. Bovine Gamma Globulin (cat. #500-0209) ble brukt som standard med 0,125, 0,25, 0,5, 1 og 1,5 mg/ml. Cytosolfraksjonene ble ikke fortynnet, mens cytoskjelett ble fortynnet 1:6 for at proteinkonsentrasjonen skulle falle innenfor området definert av standardproteinene. Prøvene og standardene ble pipettert i triplikater med 5 µl i en 96-brønns mikrotiterplate (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Tyskland). Når alle prøvene/standardene var tilsatt, ble det tilsatt reagens med et DC™ Protein Assay Reagent A/C/B kit. 25 µl blanding av reagens A+C og 200µl reagens B i hver brønn. Plastfilm ble lagt over mikrotiterplaten med prøvene og deretter lagt i et mørkt skap i 15 minutter. Mikrotiterplaten ble deretter avlest ved 690 nm av en FC multiskan™ (Thermo Scientific™) hvor proteinkonsentrasjonene ble beregnet i Thermo Scientific™ SkanIt™ software (versjon 1.01.16). Variasjonen på alle triplettene måtte være innenfor et 10% avvik (CV < 10%) for å bli godkjent.

3.4.4 Western Blot

Prøvene ble tilsatt sample buffer, bestående av 4x Laemmli Sample Buffer (Cat. #161-0747, BioRad), dithiothreitol (DTT) (Cat. #161-0611, BioRad), og ultrarent vann (dH₂O) som varierte i mengde basert på den totale proteinkonsentrasjonen i prøvene. Prøvene hadde en proteinmengde per brønn på 25 µg for cytoskjelett, 11-13 µg for cytosol og 7 µg for kontrollprøven. Prøvene ble videre satt på varmeblokk ved 70°C i 10 minutter for å fremskynde denatureringsprosessen som skjer ved tilsettelse av sample buffer og DTT. Deretter ble prøvene pipettert i 10-brønns geler (Mini-Protean Stain-Free Gels, 4-20%, Cat. #456-8094, BioRad). De tre første western blot analysene ble utført med duplikater for hvert biopsitidspunkt, hvor 4 geler ble brukt for hver forsøksperson. Analysene for de resterende forsøkspersonene ble utført uten duplikat hvor 2 geler ble brukt per forsøksperson, én gel for

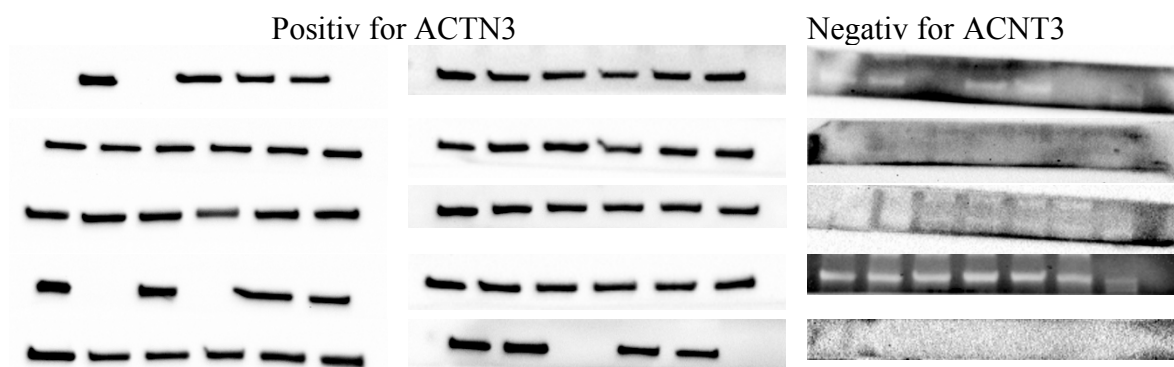
cytosol og én for cytoskjelett. 5 µl vektmarkør (Precision Plus Protein Standards, All Blue, Cat. #161-0373, BioRad) ble pipettert i de to ytterste brønnene, mens 25 µl prøve ble pipettert i de resterende brønnene. I brønnen til høyre for prøvene ble det pipettert 25 µl kontrollprøve for å kunne sammenlikne båndene uavhengig av gel. Elektroforesen ble kjørt i 50 minutter på 200 volt (PowerPac™ HC High-Current Power Supply, BioRad) før gelene ble aktivert i 2,5 min gjennom et stain free gel program på en ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad).

PVDF-membranene (Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kits 1704272, BioRad) ble aktivert i metanol (1.06007.2500, Merck KGaA) i 30 sekunder eller til membranene var gjennomsiktige før de ble skylt to ganger i dH₂O og deretter lagt i transfer buffer (Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kits 1704272, BioRad & Metanol, 1.06007.2500, Merck KGaA) i 3 minutter. Blotting ble innstilt på 25 volt i 30 minutter ved hjelp av et Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Etter blottingen ble det tatt bilde av membranene med et ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad) for senere normalisering til totalprotein. Membranene ble videre lagt i 5% melkeløsning (Skim Milk Powder, 1.15363.0500, Merck KGaA) blandet med TBS-T (Tris buffered saline, 10x TBS, Cat. #170-6435, BioRad & Tween 20, 437082Q, VWR) for blokkering i romtemperatur i 2 timer. Etter blokkering ble membranene kuttet basert på den molekylære vekten på de aktuelle proteinene. Primært antistoff ble fortynnet i 1% melkeløsning i henhold til fortynningsforhold (Tabell 3.2). Membranene ble lagt i inkuberingsrør med primært antistoff mot αB-crystallin, Hsp70 og ACTN3 og inkubert i 4°C på en ruller over natten. Se tabell 3.2 for oversikt over antistoffer benyttet.

Dagen etter ble membranene vasket 15 minutter i TBS-T og deretter 3 x 5 minutter i TBS før de ble lagt i sekundært antistoff i henhold til vertsdyret for det primære antistoffet (Tabell 3.2). Sekundært antistoff var fortynnet i 1% melkeløsning. Membranene ble inkubert i sekundært antistoff i romtemperatur i 1 time, og deretter vasket 15 minutter i TBS-T og 3 x 5 minutter i TBS. Før bildetaking ble membranene inkubert med et chemiluminescenssubstrat (SuperSignal, 34076, Thermo Scientific) i 5 minutter i et mørkt skap.

Bildene ble tatt med ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad) og videre analysert og kvantifisert ved hjelp av Image Lab 6.1.0 software. Intensiteten på hvert proteinbånd ble

normalisert til totalprotein i tilsvarende brønn. Hensikten med det var å ta høyde for variasjon i pipettering av prøve.



Figur 3.4: Figuren viser membraner fra western blot analysene. Membranene til venstre med proteinbånd viser forsøkspersoner som var positiv for ACTN3 i cytoskjelett. Membranene til høyre viser forsøkspersoner som var negative for ACTN3 i cytoskjelett.

Tabell 3.2: Primær- og sekundærantistoff benyttet i analysene

| | Produsent | Vertsdyr | Fortynning | Cat. # |
|-------------------------------------|-------------------|----------|------------|---------------|
| Primært antistoff | | | | |
| α B-Crystallin | Enzo | Mus | 1:4000 | ADI-SPA-222-F |
| Hsp70 | Enzo | Mus | 1:4000 | ADI-SPA-810-F |
| ACTN3 | Abcam | Kanin | 1:4000 | Ab68204 |
| Sekundært antistoff | | | | |
| Anti-mouse IgG HRP-linked antibody | Thermo Scientific | Geit | 1:30 000 | 31430 |
| Anti-Rabbit IgG HRP-linked antibody | Invitrogen | Geit | 1:30 000 | 31460 |

3.5 Statistikk

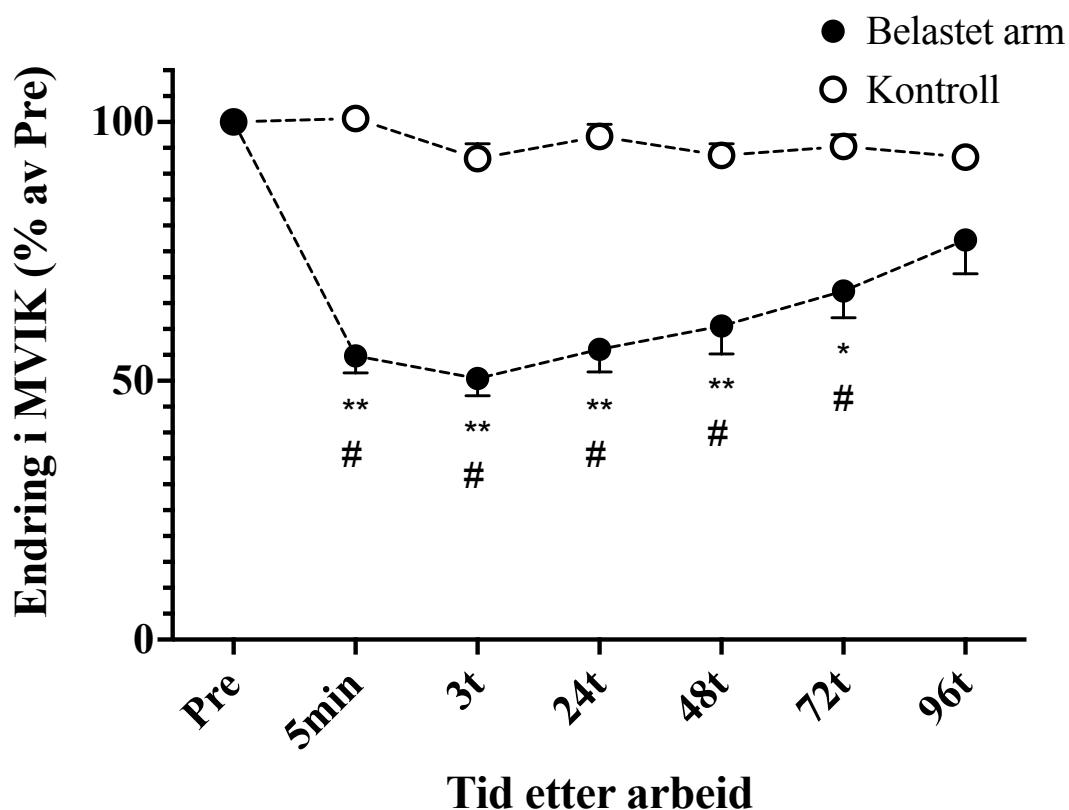
Rådata ble testet for normalfordeling visuelt med Q-Q plot og med Shapiro-Wilk test før videre analyser. Endringer i MVIK og endring i kraftutvikling ved elektrisk stimulering på 50 Hz, samt kraftratioen for 20 og 50 Hz ble analysert med en mixed-effects toveis-ANOVA med post-hoc-test (Bonferroni). Dataene for 20 Hz stimulering, som ikke var normalfordelt, ble analysert med Friedman's toveis-ANOVA. Endringer i nivå av α B-crystallin og Hsp70 i

cytosol og cytoskjelett ble analysert med Friedman's toveis-ANOVA med post-hoc-tester (Bonferroni). Endring i shear modulus ble analysert med en toveis-ANOVA med post-hoc-test (Bonferroni). For analysering av korrelasjoner ble Pearson's (parametrisk) korrelasjonstest eller Spearman's (ikke-parametrisk) korrelasjonstest benyttet, avhengig av om dataene var normalfordelte eller ikke. En uparet multippel Mann Whitney test ble brukt for å teste om responsen av α B-crystallin og Hsp70 mellom forsøkspersonene som hadde, og ikke hadde, påvist ACTN3 var lik ved de ulike tidspunktene etter baseline. Statistisk signifikans ble oppnådd ved $P \leq 0,05$. Dataene er oppgitt i gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM). Utregninger ble gjennomført i Microsoft® excel 2011 og videre analysert i Prism® versjon 9.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Friedman's toveis-ANOVA ble gjort i IBM SPSS Statistics® 1.0.0.1508 (International Buisnes Machines, New York, NY, USA).

4. Resultater

4.1 Maksimal voluntær isometrisk kontraksjonskraft

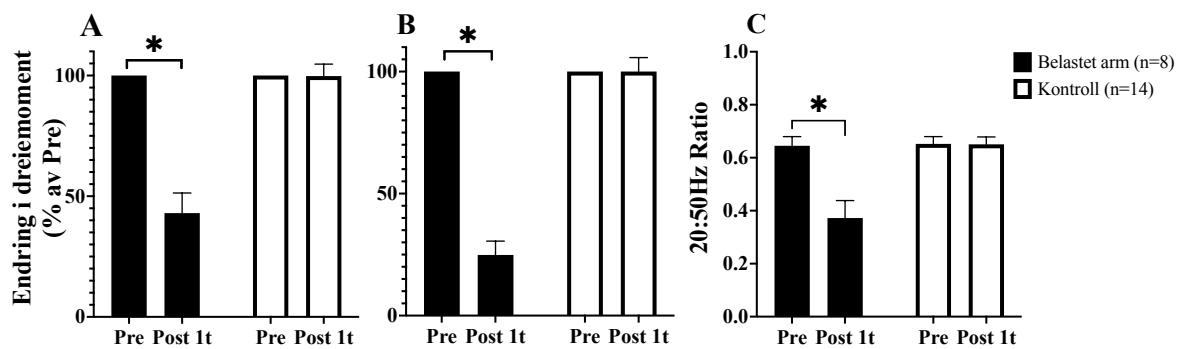
De 50 maksimale, eksentriske albuefleksjonene reduserte evnen til maksimal isometrisk kraftutvikling med ~50% og MVIK var redusert frem til 72 timer etter arbeid (Figur 4.1). Dreiemomentet var redusert med $45 \pm 3 \%$ 5 minutter etter eksentrisk arbeid og holdt seg redusert fra pre med $50 \pm 3 \%$, $44 \pm 4 \%$, $39 \pm 5\%$, $33 \pm 5\%$ etter henholdsvis 3, 24, 48 og 72 timer ($P < 0,01$; Figur 4.1). Det var ingen signifikant forskjell i maksimal kraftutvikling fra pre eller mellom belastet arm og kontrollarm før arbeidet og 96 timer etter arbeid. Det var heller ingen signifikant endring i MVIK i kontrollarmen under eksperimentet.



Figur 4.1: Endring i MVIK på albuefleksorene ved 80° albuevinkel (0° tilsvarer full ekstensjon) relativt til pretest ved ulike tidspunkter etter eksentrisk arbeid. * = forskjellig fra Pre ($P < 0,05$) ** = signifikant forskjellig fra Pre ($P < 0,001$) # = signifikant forskjellig fra kontroll ved samme tidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM

4.2 Elektrisk stimulering

Det var ingen endring i dreiemoment i kontrollarm ved elektrisk stimulering på 50 Hz eller 20 Hz. I belastet arm, 1 time etter eksentrisk arbeid, var dreiemomentet redusert med $57 \pm 8\%$ ($P < 0,01$; Figur 4.2A) og $75 \pm 6\%$ ($P < 0,001$; Figur 4.2B) ved henholdsvis 50 Hz og 20 Hz stimulering. Totalt ble 6 av målingene på belastet arm ekskludert grunnet ikke-valide målinger, noe som reduserte den statistiske styrken på disse resultatene. Én forsøksperson ønsket ikke å gjennomføre elektrisk stimulering. Krafratioen mellom 20 og 50 Hz var redusert i belastet arm med $42 \pm 11\%$ ($P = 0,03$; Figur 4.2C) 1 time etter eksentrisk arbeid. Dette indikerer at kraftfallet ved 20 Hz (lav frekvens) var større enn ved 50 Hz (høy frekvens) og at en lavfrekvent muskeltretthet ble utviklet med denne protokollen. Det var ingen endring i 20:50 Hz krafratio for kontrollarmen.



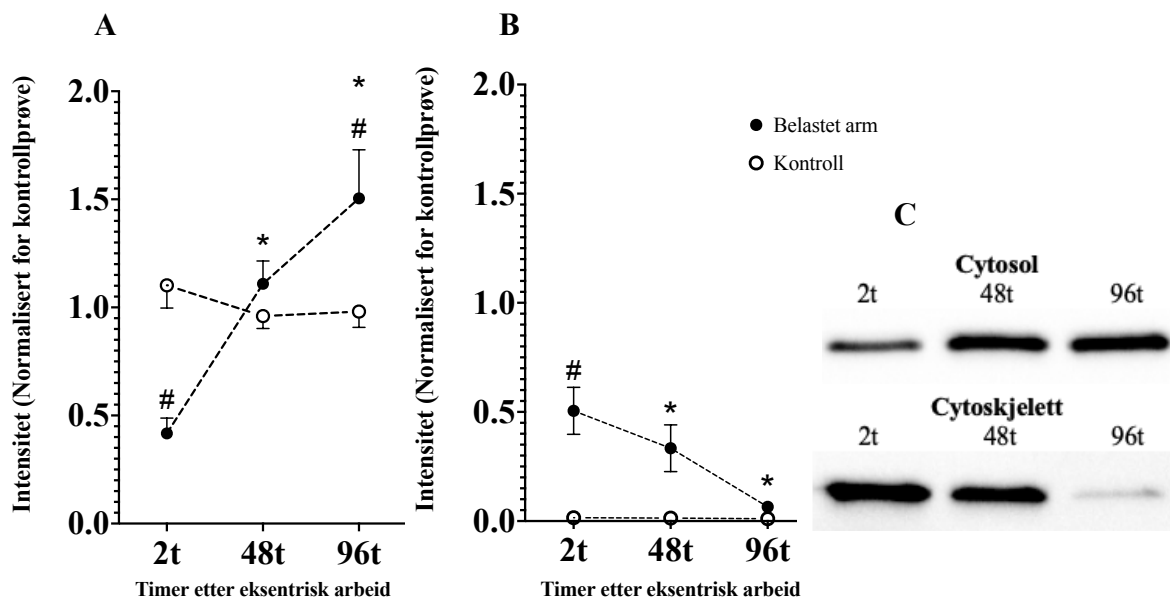
Figur 4.2: Dreiemoment ved elektrisk stimulering på *m. biceps brachii* før (Pre) og 1 time etter (Post 1t) eksentrisk arbeid. Grafene viser dreiemoment relativt til Pre-verdi generert ved stimuleringsfrekvens på 50 Hz (A) og 20 Hz (B). (C) viser ratioen av kraft generert ved 20 og 50 Hz. * = signifikant forskjell mellom Pre og Post 1t ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM

4.3 Heat shock proteiner

4.3.1 α B-crystallin

Det var ingen signifikant endring i nivå av α B-crystallin, hverken i cytosol eller cytoskjelett i kontrollarm. I belastet arm var intensitetsnivået av α B-crystallin i cytosol lavere sammenliknet med kontrollarm 2 timer etter eksentrisk arbeid ($P < 0,01$; Figur 4.3A). På samme tidspunkt var det et signifikant høyere nivå av α B-crystallin i cytoskjelett på belastet arm sammenliknet med kontrollarm ($P < 0,001$; Figur 4.3B). Fra 2 timer til 48 timer etter

eksentrisk arbeid økte nivået i cytosol ($P < 0,01$; Figur 4.3A) og nivået i cytoskjelett ble redusert ($P < 0,05$; Figur 4.3B). Ved 48 timer etter eksentrisk arbeid var α B-crystallin nivået i belastet arm ikke signifikant forskjellig fra kontrollarmen; hverken for cytosol eller cytoskjelett. Det ble observert en ytterligere økning av α B-crystallin i cytosol i belastet arm 96 timer etter eksentrisk arbeid ($P = 0,012$; Figur 4.3A) hvor nivået var signifikant høyere enn kontrollarmen ($P < 0,01$; Figur 4.3A). α B-crystallin nivået i belastet arm var ikke signifikant forskjellig fra kontroll i cytoskjelett 96 timer etter eksentrisk arbeid.

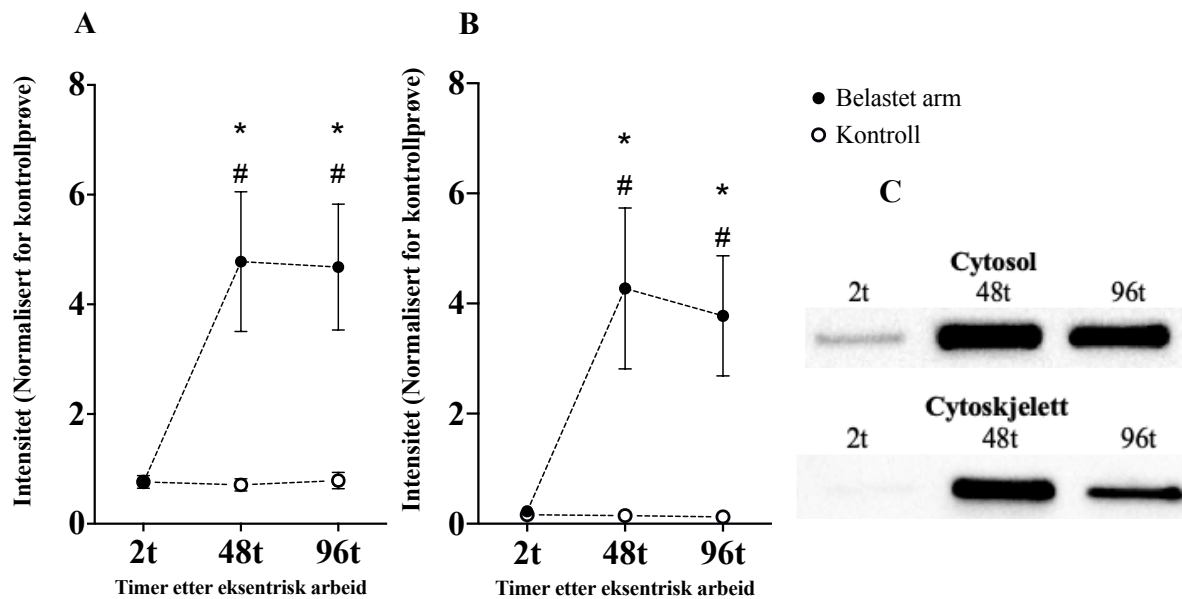


Figur 4.3: Intensitetsnivå av α B-crystallin i cytosol (A) og cytoskjelett (B) etter eksentrisk arbeid analysert med western blot. Intensiteten er normalisert for en kontrollprøve og indikerer proteinnivået i cytosol og cytoskjelett. (C) viser bilder av representative bånd fra western blot analysene av belastet muskel. * = signifikant forskjell fra 2 timer etter trening ($P < 0,05$). # = signifikant forskjell fra kontrollarm ved samme biopsitidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM

4.3.2 Hsp70

I likhet med α B-crystallin, ble det ikke funnet noen signifikant endring i Hsp70 nivå i cytosol eller cytoskjelett på kontrollarmen. Det var en forsinket økning av Hsp70 i belastet arm, både i cytosol og cytoskjelett hvor nivået i belastet arm var lik kontrollarm 2 timer etter eksentrisk arbeid. Deretter økte Hsp70 nivået signifikant 48 timer etter eksentrisk arbeid i cytosol ($P = 0,014$; Figur 4.4A) og i cytoskjelett ($P < 0,01$; Figur 4.4B). Hsp70 nivået var forhøyet 96 timer etter eksentrisk arbeid og var signifikant høyere i belastet arm

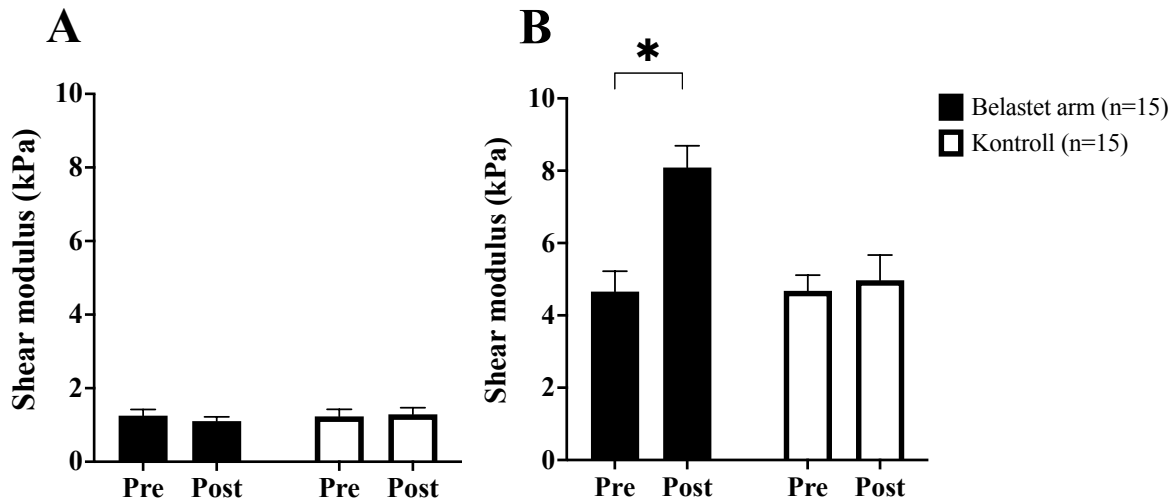
sammenliknet med kontrollarm i cytosol ($P < 0,01$; Figur 4.4A) og cytoskjelett ($P < 0,001$; Figur 4.4B).



Figur 4.4: Endring i intensitetsnivå av Hsp70 i cytosol (A) og cytoskjelett (B) etter eksentrisk arbeid. Intensiteten er normalisert for kontrollprøve. (C) viser representative bånd fra western blot analysene. * = signifikant forskjell fra 2 timer etter trening ($P < 0,05$). # = signifikant forskjell fra kontrollarm ved samme biopsitidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM

4.4 Fjærstivhet i muskelvevet

Gjennomsnittlig shear modulus var signifikant høyere ved 20° enn ved 90° for pre og post ($+271 \pm 47\%$ og $+631 \pm 52\%$, henholdsvis ($P < 0,01$; Figur 4.5)) på den belastede armen og for pre og post ($+279 \pm 34\%$ og $+285 \pm 60\%$, henholdsvis ($P < 0,01$; Figur 4.5)) på kontrollarmen (0° tilsvarer full ekstensjon av albueleddet). Det var ingen signifikant endring fra pre til post i belastet arm ved 90° . Derimot var det en signifikant økning fra pre til post i gjennomsnittlig shear modulus ved 20° på $74 \pm 15\%$ ($P < 0,0001$; Figur 4.5B) i den belastede armen. Det var ingen signifikant endring fra pre til post i kontrollarmen ved 90° eller 20° .



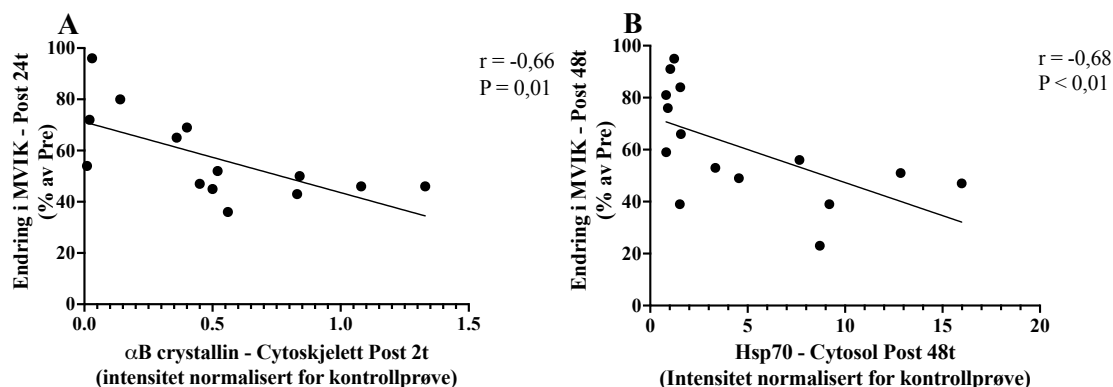
Figur 4.5: Endring i shear modulus målt med Shear wave elastografi ved 90° (A) og 20° (B) leddvinkel på albueleddet (0° er full ekstensjon). Shear modulus, målt i kPa, indikerer muskelens fjærstivhet. * = signifikant forskjell fra Pre ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM.

4.5 Korrelasjoner

Signifikante korrelasjoner ble funnet mellom nivå av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter arbeid og endring i MVIK, både etter 24 timer ($r = -0,66$; $P = 0,01$; Tabell 4.1; Figur 4.6) og 48 timer ($r = -0,61$; $P = 0,02$; Tabell 4.1). Det var ingen signifikant sammenheng mellom reduksjon av α B-crystallin i cytosol etter 2 timer og endring i MVIK. Det var en sammenheng mellom endring i MVIK 48 timer etter arbeid og Hsp70 nivå 48 timer etter arbeid i både cytosol ($r = -0,68$; $P < 0,01$; Tabell 4.1; Figur 4.6) og cytoskjelett ($r = -0,56$; $P = 0,03$; Tabell 4.1).

Tabell 4.1: Korrelasjon mellom prosentvis endring fra pre i MVIK (24 og 48 timer etter baseline), nivå av α B-crystallin 2 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett) og nivå av Hsp70 48 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett). r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi, * = signifikant korrelasjon, NS = ikke signifikant korrelasjon.

| | MVIK (% av Pre) | | | |
|--|-----------------|-------|--------------|--------|
| | Post 24t | | Post 48t | |
| αB-crystallin - Post 2t | r | P | r | P |
| Cytosol | 0,38 | NS | 0,38 | NS |
| Cytoskjelett | -0,66 | 0,01* | -0,61 | 0,02* |
| Hsp70 - Post 48t | r | P | r | P |
| Cytosol | -0,60 | 0,02* | -0,68 | <0,01* |
| Cytoskjelett | -0,55 | 0,04* | -0,56 | 0,03* |



Figur 4.6: A) viser korrelasjonen mellom nivå av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 24 timer etter arbeid. B) viser korrelasjonen mellom Hsp70 nivå i cytosol 48 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 48 timer etter arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi.

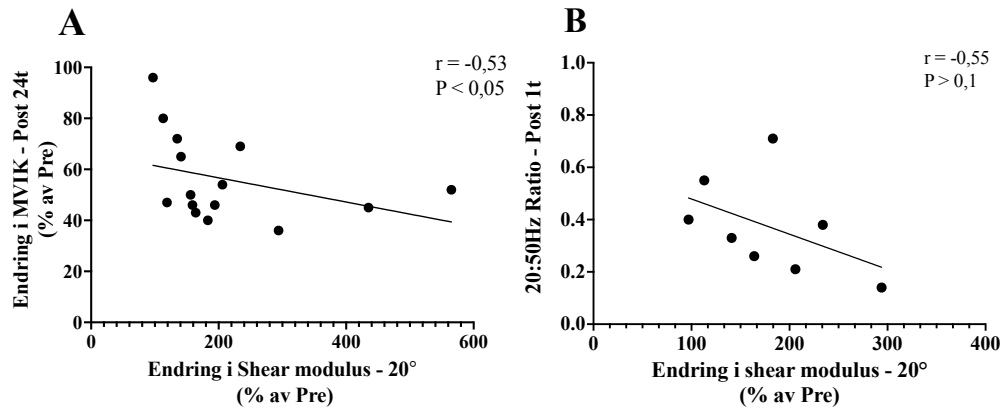
Korrelasjonsanalysene viste ingen signifikant sammenheng mellom endring i gjennomsnittlig shear modulus og nivå av α B-crystallin i cytosol eller cytoskjelett 2 timer etter arbeid (Tabell 4.2). Det var heller ingen sammenheng mellom endring i gjennomsnittlig shear modulus og nivå av Hsp70 i cytosol eller cytoskjelett 48 timer etter arbeid.

Tabell 4.2: Korrelasjon mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus (20° leddvinkel i albuen), nivå av α B-crystallin 2 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett), nivå av Hsp70 48 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 24, 48, 72 og 96 timer etter arbeid, samt ratioen av elektrisk stimulering på 20 og 50 Hz 1 time etter arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi, * = signifikant korrelasjon, NS = ikke signifikant korrelasjon.

| | Shear modulus - 20° (% av Pre) | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | r | P |
| α B-crystallin - Post 2t | | |
| Cytosol | -0,34 | NS |
| Cytoskjelett | 0,35 | NS |
| Hsp70 - Post 48t | | |
| Cytosol | 0,26 | NS |
| Cytoskjelett | 0,12 | NS |
| MVIK (% av Pre) | | |
| Post 24t | -0,53 | < 0,05* |
| Post 48t | -0,33 | NS |
| Post 72t | -0,30 | NS |
| Post 96t | -0,36 | NS |
| Elektrisk stimulering - Post 1t | | |
| 20:50 Hz Ratio | -0,55 | NS |

Det var en signifikant korrelasjon mellom endring i gjennomsnittlig shear modulus og endring i MVIK 24 timer etter arbeid ($r = -0,53$; $P < 0,05$; Tabell 4.2; Figur 4.7A). Ingen signifikant korrelasjon ble funnet mellom endring i gjennomsnittlig shear modulus og endring i MVIK 48, 72 og 96 timer etter arbeid.

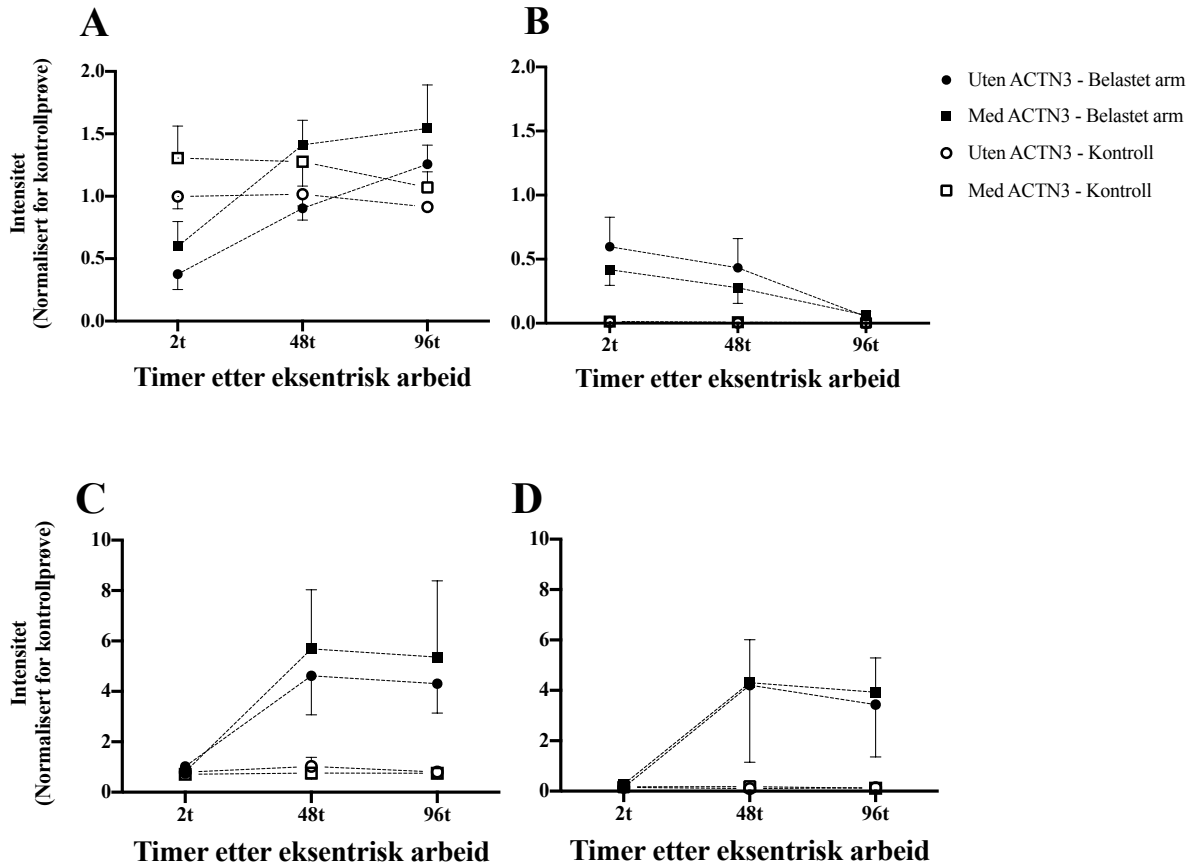
Korrelasjonsanalysen mellom endringen i gjennomsnittlig shear modulus og kraftratioen mellom elektrisk stimulering på 20 og 50 Hz 1 time etter eksentrisk arbeid viste en tilsynelatende moderat korrelasjon, men denne var ikke signifikant ($r = -0,55$; $P > 0,1$; Tabell 4.2; Figur 4.7B).



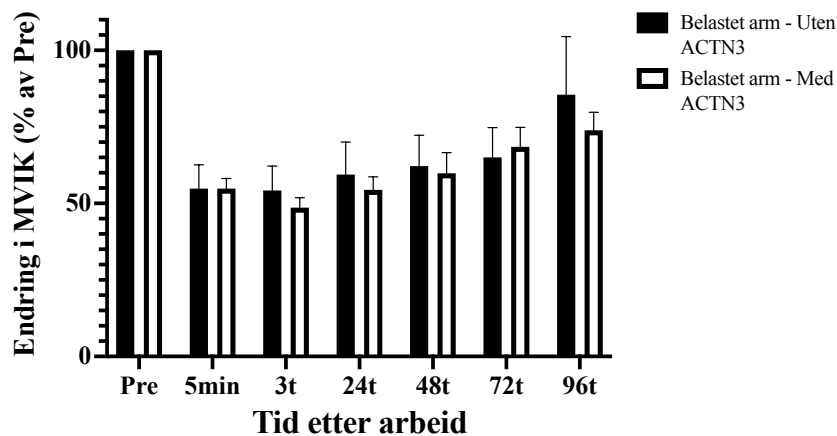
Figur 4.7: A) viser korrelasjonen mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus ved 20° albuevinkel og prosentvis endring fra pre i MVIK 24 timer etter eksentrisk arbeid. B) viser korrelasjonen mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus ved 20° albuevinkel og kraftratioen mellom elektrisk stimulering på 20 og 50 1 time etter eksentrisk arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi

4.6 ACTN3 påvirket ikke restitusjonen av muskelfunksjon eller α B-crystallin eller Hsp70 responsen

Muskelbiopsiene ble i tillegg analysert for ACTN3. Hos 5 av de 15 forsøkspersonene ble det ikke detektert ACTN3. Responsen av α B-crystallin og Hsp70 mellom de som fikk påvist ACTN3 og ikke som ikke fikk påvist ACTN3 i western blot analysene ble deretter sammenliknet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom forsøkspersoner positive for og forsøkspersoner negative for ACTN3 i respons av α B-crystallin eller Hsp70, hverken i cytosol eller cytoskjelett (Figur 4.8). Det var heller ingen signifikant forskjell i MVIK mellom forsøkspersonene positive for ACTN3 og forsøkspersonene negative for ACTN3 (Figur 4.9)



Figur 4.8: Viser responsen av αB -crystallin i cytosol (A) og cytoskjelett (B), samt responsen av Hsp70 i cytosol (C) og cytoskjelett (D) for forsøkspersoner med (firkanter) og uten (sirkler) ACTN3 i *m. biceps brachii*. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM



Figur 4.9: Prosentvis endring i MVIK etter eksentrisk arbeid for forsøkspersonene som var positive (hvite stolper) og negative (sorte stolper) for ACTN3. Resultatene vises i gjennomsnitt \pm SEM.

5. Diskusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke om det var noen sammenheng mellom akkumulering av HSP, utvikling av tretthet, fjærstivhet i muskelvevet og redusert kraftutvikling etter uvant eksentrisk arbeid hos friske voksne. Det eksentriske arbeidet på albuefleksorene resulterte i forventet reduksjon i MVIK for den belastede armen. Reduksjonen i MVIK i belastet arm holdt seg signifikant lavere enn kontrollarmen helt fram til 72 timer etter eksentrisk arbeid. Det var også en tydelig utvikling av lavfrekvent tretthet i belastet arm 1 time etter arbeidet. Det eksentriske arbeidet resulterte i en rask akkumulering av α B-crystallin i cytoskjelettet sammen med en reduksjon av α B-crystallin i cytosol i belastet arm. Dette indikerer skade på strukturelle proteiner kort tid etter eksentrisk arbeid. Det var en forsinket akkumulering av Hsp70 i både cytoskjelett og cytosol etter 48 timer som holdt et forhøyet nivå i belastet arm fram til 96 timer etter eksentrisk arbeid. SWE-målingene viste også en økt fjærstivhet i muskelvevet like etter eksentrisk arbeid i belastet arm, men dette korrelerte ikke med akkumuleringen av HSP. Det var imidlertid en sammenheng mellom endring i muskelvevets fjærstivhet og endring i MVIK, men det var ingen signifikant sammenheng mellom utvikling av fjærstivhet og utvikling av lavfrekvent tretthet.

5.1 *Langvarig reduksjon i MVIK*

Etter eksentrisk arbeid på albuefleksorene var MVIK redusert med ~50% fram til 24 timer etter arbeid. Deretter restituerte MVIK gradvis, men kraften var også signifikant lavere i belastet arm sammenliknet med kontrollarmen fram til 72 timer etter eksentrisk arbeid. Reduksjonen i MVIK ser ut til å stemme godt med tidligere undersøkelser gjort etter intensivt eksentrisk arbeid (Lauritzen et al., 2009; Paulsen et al., 2009). Maksimal kraftutvikling reduseres med opptil 50-60% etter eksentrisk arbeid og det kan ta 1-2 uker før muskelstyrken returner tilbake til normalverdi (Byrne et al., 2004). Den langsomme restitusjonen skyldes trolig muskelskade. I dette forsøket var MVIK signifikant lavere i belastet arm sammenliknet med kontrollarm fram til 96 timer etter eksentrisk arbeid. Likevel så det ut til å være en tendens til lavere MVIK i belastet arm enn kontrollarm etter 96 timer, men forskjellen nådde ikke statistisk signifikans. Dette fraværet av statistisk signifikans etter 96 timer står i kontrast med tidligere forsøk hvor det ble funnet signifikant lavere MVIK i belastet arm sammenliknet med kontrollarm etter 9, og til og med, 21 dager etter eksentrisk arbeid (Lauritzen et al., 2009). Studien inkluderte imidlertid kun såkalte «høy respondere»

som hadde et fall i muskelkraft på mer enn 50% etter eksentrisk arbeid. Utvalget i Lauritzen et al. (2009) er derfor ikke direkte sammenliknbart med utvalget i denne studien. Ettersom forlenget reduksjon i maksimal voluntær kraftutvikling anses som et valid og reliabelt mål på EIMD (Clarkson & Hubal, 2002), er dette en sterk indikasjon på at totalt 50 eksentriske kontraksjoner induserte muskelskade i albuefleksorene.

5.1.1 Mekanisk stress

Siden maksimalt eksentrisk arbeid er sterkt relatert til mekanisk stress i muskelfiberne (Clarkson & Hubal, 2002; Tee et al., 2007), er det sannsynlig at dette har vært en dominerende faktor til den langvarige reduksjonen i MVIK observert i denne studien. Det er flere mulige grunner til det. Trolig inducerer det eksentriske arbeidet en ikke-uniform forlengelse av sarkomerer. Dette gjør at noen av sarkomerene i muskelfiberne blir strukket forbi overlappingen mellom aktin og myosin, altså at de «popper» fra hverandre. Dette er videre kjent for å resultere i lengre optimal muskellengde for kraftutvikling (Allen, 2004; Brockett et al., 2001; Byrne et al., 2004). Denne forskyvningen av optimal muskellengde har sannsynligvis hatt en betydning for endring i kraftutviklingen siden MVIK ble testet på samme muskellengde (albuevinkel) på alle testene. Videre resulterer mekanisk stress i utflytende Z-disker og en følgende redusert kontraktile integritet (Allen, 2004; Lauritzen et al., 2009). Det er også foreslått at mekanisk stress resulterer i tap av dystrofin og en følgende redusert stabilitet i membranen, noe som resulterer i aktivering av strekk-induserte Ca^{2+} -kanaler og mikrorupturer i sarkolemma (Fanchaouy et al., 2009; Lovering & De Deyne, 2004). Dette fører til en økt innstrømning av Ca^{2+} fra ekstracellulært område og en ytterligere ødeleggelse innad i muskelcellene gjennom aktivering av calpain (Raastad et al., 2010). Calpain har tidligere blitt vist å lokalisere seg ved strukturelle proteiner rundt Z-diskene. Blant disse strukturelle proteinene er desmin spesielt utsatt for degradering av calpain (Barash et al., 2002). Siden desmin spiller en viktig funksjonell rolle i den laterale kraftoverføringen mellom sarkomerer spiller trolig disse proteolytiske prosessene en rolle for muskelens reduserte evne til kraftutvikling i dagene etter arbeidet (Barash et al., 2002; Raastad et al., 2010).

5.1.2 Forstyrrelser i E-C kopling

I denne studien var det en $42 \pm 11\%$ reduksjon i 20:50 Hz kraftratio for elektrisk stimulering 1 time etter eksentrisk arbeid. Dette indikerer at endringer i E-C kopling bidro i reduksjonen av MVIK like etter eksentrisk arbeid (Raastad et al., 2010). En tilsvarende reduksjon på $48 \pm$

4% i 20:50 Hz krafratio er tidligere blitt observert på kneekstensorer. Dette ble etterfulgt av en gradvis økning fram til 2 dager etter maksimalt eksentrisk arbeid (Raastad et al., 2010). Martin et al. (2004) fant også en rask reduksjon i 20:80 Hz krafratio etter eksentrisk arbeid som returnerte tilbake til normalverdi etter 48 timer. I denne studien utførte vi elektrisk stimulering kun før og 1 time etter det eksentriske arbeidet. Vi kan derfor ikke si noe om tidsforløpet etter dette. På bakgrunn av de to sistnevnte studiene er det likevel rimelig å anta at 20:50 Hz krafratioen på albuefleksorene i denne studien kan ha returnert til normalverdi etter omtrent 2 dager (Martin et al., 2004; Raastad et al., 2010). Forstyrrelser i E-C koplingen vil i så fall ikke kunne forklare den langvarige reduksjonen i MVIK ettersom reduksjonen i MVIK var signifikant til og med 72 timer etter eksentrisk arbeid.

Det var ingen korrelasjon mellom reduksjon i 20:50 Hz krafratio og økt nivå av α B-crystallin og Hsp70 i cytoskjelett. Lignende funn er observert tidligere hvor andelen av skadde muskelfibre ikke korrelerte med fall i 20:50 Hz krafratio (Raastad et al., 2010). Dette kan indikere at det ikke er en nær sammenheng mellom skader på strukturelle områder i muskelfibrene og de endringer i E-C koplingen som førte til lavfrekvent krafttap.

5.2 *Heat shock proteiner*

5.2.1 α B-crystallin

Som forventet var det en rask akkumulering av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter eksentrisk arbeid i belastet arm. På samme tidspunkt var nivået av α B-crystallin redusert i cytosol i forhold til kontrollarmen. Den raske akkumuleringen av α B-crystallin i cytoskjelett og den samtidige reduksjonen i cytosol samsvarer med data fra Paulsen et al. (2009) som fant en rask økning i cytoskjelettet allerede 1 time etter eksentrisk arbeid. Reduksjonen av α B-crystallin i cytosol var også tilsvarende det som ble funnet i denne studien. Dette indikerer en translokasjon av α B-crystallin fra cytosol til cytoskjelett etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2009). Den raske økningen av α B-crystallin i cytoskjelett indikerer en akutt skade på strukturelle områder i muskelcellene. Den samtidige reduksjonen i cytosol understøtter videre forklaringen om at eksentrisk arbeid fører til rask fosforylering av α B-crystallin i cytosol (Bakthisaran et al., 2015). Denne fosforyleringen reduserer videre oligomer-komplekset, som α B-crystallin under normale forhold er organisert i, og påvirker chaperone-aktiviteten slik at de kan binde seg til misfoldede proteiner (Boelens, 2014; Dimauro et al., 2018; Tikhomirova et al., 2017).

Etter den raske økningen av α B-crystallin nivået i cytoskjelett, reduserte nivået gradvis utover uken fram til 96 timer etter eksentrisk arbeid. I motsetning til dette er det tidligere vist et stabilt forhøyet α B-crystallin nivå i cytoskjelett fram til 7 dager etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2009). Tidsforløpet i akkumulering av α B-crystallin, målt med immunohistokjemi i Paulsen et al. (2009), var relativt likt som i denne studien. I denne studien hadde α B-crystallin nivået i cytosol returnert til kontrollnivå allerede 48 timer etter eksentrisk arbeid. Nivået av α B-crystallin økte deretter ytterligere til et signifikant høyere nivå sammenliknet med kontrollarm 96 timer etter eksentrisk arbeid. Det samme er også observert tidligere (Paulsen et al., 2009). Økt α B-crystallin mRNA nivå er tidligere observert mellom 3 og 24 timer etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2007; Vissing et al., 2009). Økningen av α B-crystallin nivå i cytosol 96 timer etter eksentrisk arbeid ser derfor ut til å være et resultat av økt ekspresjon og translokering av α B-crystallin tilbake fra cytoskjelett til cytosol.

Det ble ikke oppdaget noen sammenheng mellom nivå av α B-crystallin i cytosol 2 timer etter arbeid og endring i MVIK, men det var sammenheng mellom nivå av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter arbeid og endring i MVIK etter 24 og 48 timer. Som nevnt er økt ekspresjon av α B-crystallin blitt observert kort tid etter eksentrisk arbeid. Det kan tenkes at dette førte til at korrelasjonen mellom α B-crystallin nivå i cytosol og endring i MVIK ikke var signifikant.

5.2.2 Hsp70

Resultatene viste en forsinket Hsp70 respons i belastet arm hvor nivået i cytoskjelett ikke økte før 48 timer etter eksentrisk arbeid. Hsp70 nivået holdt seg deretter signifikant høyere i forhold til kontrollarmen fram til 96 timer etter arbeid. Videre var Hsp70-responsen relativt lik i både cytoskjelett og cytosol. Denne responsen er også blitt funnet tidligere (Paulsen et al., 2009). Videre ble det funnet en økning i Hsp70-nivå i cytosol på m. vastus lateralis allerede 24 timer etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2007). Det er derfor mulig at Hsp70-responsen i cytosol i denne studien kan ha vært tidligere enn 48 timer etter eksentrisk arbeid, men det er spekulasjoner ettersom det ikke ble tatt biopsi mellom 2 og 48 timer. En markant økning i Hsp70 mRNA nivå har tidligere blitt demonstrert mellom 3 og 24 timer etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2007; Vissing et al., 2009). Hsp70 mRNA nivået reduserte deretter gradvis fram til 7 dager etter eksentrisk arbeid (Vissing et al., 2009). På bakgrunn av dette var det økte nivået av Hsp70 i både cytoskjelett og cytosol sannsynligvis grunnet en økt

ekspresjon av Hsp70. Dette stemmer også med forklaringen om at stresset på muskelfiberne induisert av eksentrisk arbeid fører til at Hsp70 frigjør seg fra Hsp70-HSF1 komplekset for å binde seg til denaturerte proteiner (Liu et al., 2006). Denne frigjøringen gjør at HSF1 inngår i en trimer-formasjon med HSE som setter i gang Hsp70 transkripsjon og derav økt mRNA-nivå (Liu et al., 2006). Det var også en signifikant sammenheng mellom Hsp70-nivå i cytosol 48 timer etter eksentrisk arbeid og redusert MVIK 24 og 48 timer etter arbeid. Denne sammenhengene støtter dermed påstanden om at Hsp70 fungerer som en «stress-senser» og reflekterer omfanget av skade induisert av eksentrisk arbeid (Liu et al., 2006)

Tidsforløpet for responsen til α B-crystallin og Hsp70 vist i denne studien ser ut til å støtte teorien til Źwirowski et al. (2017). Teorien går utpå at sHSP raskt binder seg på hydrofobe områder eksponert på overflaten av aggregater og danner et ytterskall som kun blir penetrert av Hsp70. Hsp70 tar deretter over for sHSP gjennom en kompetitiv frigjøringsmekanisme og kan deretter folde de skadde proteinene tilbake sin native form (Źwirowski et al., 2017). I denne studien var det en rask akkumulering av α B-crystallin i cytoskjelett etterfulgt av en gradvis reduksjon. Samtidig som α B-crystallin nivået i cytoskjelett reduserte, økte Hsp70 i cytoskjelett. Dette ser også ut til å stemme med andre studier hvor α B-crystallin og Hsp70 også har vist å lokalisere seg på samme sted (Paulsen et al., 2009). Det virker derfor som at α B-crystallin, sammen med andre sHSP, akkumulerer raskt etter eksentrisk arbeid for å hindre aggregering av skadde proteiner før Hsp70 tar over og gjør resten av jobben i å folde proteinene til sin native form.

Nivået av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter arbeid korrelerte godt med endring i MVIK både 24 ($r = -0,66$) og 48 timer ($r = -0,61$) etter eksentrisk arbeid. Det var også en god korrelasjon mellom Hsp70 i cytoskjelett 48 timer etter arbeid og endring i MVIK 24 ($r = -0,55$) og 48 timer ($r = -0,56$) etter arbeid. Disse sammenhengene bekrefter at responsen fra både α B-crystallin og Hsp70 er assosiert med omfanget av muskelskade induisert av eksentrisk arbeid og dermed kan være en god indikator på de strukturelle muskelødeleggelsene (Bakthisaran et al., 2015; Liu et al., 2006). Som chaperoner er α B-crystallin og Hsp70 kjent for å binde seg til skadde og denaturerte proteiner som følge av ulike stressorer (Dimauro et al., 2018; Liu et al., 2006). Videre er det vist at både α B-crystallin og Hsp70 ko-lokaliserer ved strukturelle proteiner rundt Z-diskene og I-bånd etter eksentrisk arbeid (Paulsen et al., 2009). Satt sammen indikerer disse funnene at skader på strukturelle områder i myofibrillene spiller en viktig rolle i forlenget reduksjon i MVIK.

Videre er calpain i likhet med α B-crystallin og Hsp70 også vist å lokalisere seg rundt Z-diskene og I-båndet etter eksentrisk arbeid (Bakthisaran et al., 2015; Paulsen et al., 2009; Tikhomirova et al., 2017). Det er derfor mulig at mye av de strukturelle skadene i muskelcellene muligens skyldtes Ca^{2+} innstrømning og aktivering av calpain., men dette ble ikke undersøkt i denne studien.

5.3 *Shear modulus*

SWE-målingene viste at gjennomsnittlig shear modulus i m. biceps brachii var høyere ved 20° enn ved 90° vinkel på albueleddet både i kontrollarmen og belastet arm (0° tilsvarer full ekstensjon). Dette stemmer godt overens med tidligere funn hvor det ble observert en gjennomsnittlig shear modulus i m. biceps brachii og m. brachialis som økte med lengre muskellengder (Lacourpaille et al., 2014). Samtidig var økningen i shear modulus fra pre til post i belastet arm både større og mer langvarig ved lengre muskellengder (Lacourpaille et al., 2014). I tråd med dette fant vi i denne studien en økning i shear modulus ved 20° albuevinkel fra pre til post i belastet arm, mens ved 90° var det ingen endring i shear modulus. I en tidligere studie ble det heller ikke funnet noen endring i shear modulus ved 110° grader albuevinkel etter eksentrisk arbeid (Lacourpaille et al., 2014). Disse funnene er tidligere blitt forklart med en høyere Ca^{2+} sensitivitet ved lengre muskellengder og større involvering av Ca^{2+} avhengige prosesser som tverrbrodannelse og økt stivhet av titin (Lacourpaille et al., 2014; Stephenson & Wendt, 1984).

Shear modulus ved 20° økte i belastet arm med $74 \pm 15\%$ rett etter eksentrisk arbeid og indikerer en økt fjærstivhet i muskelvevet. Dette funnet er tilsvarende resultatet fra Chleboun et al. (1998) som fant en $60 \pm 14\%$ økning i fjærstivhet på albuefleksorene etter eksentrisk arbeid målt globalt gjennom passivt dreiemoment. Resultatene fra denne studien stemmer muligens bedre med Lacourpaille et al. (2014) som også benyttet shear modulus målt med SWE. De fant en $72 \pm 50\%$ økning i shear modulus ved 20° albuevinkel 1 time etter eksentrisk arbeid på m. biceps brachii. Lacourpaille et al. (2017) fant også en økt shear modulus 30 minutter etter eksentrisk arbeid. Passivt dreiemoment reflekterer en sammensetning av både muskulære og ikke-muskulære strukturer (f.eks. sener, hud, leddstruktur og ligamenter). Mekaniske egenskaper for ikke-kontraktile strukturer kan derfor muligens ha bidratt til forskjell mellom endring i passivt dreiemoment og endring i shear modulus etter eksentrisk arbeid (Lacourpaille et al., 2014).

Økt hevelse som følge av akkumulering av væske og inflammasjon er blitt foreslått som en mulig mekanisme for økt muskelstivhet, men oppstår ikke før 1-2 dager etter eksentrisk arbeid (Chleboun et al., 1998). Dette kan derfor ikke forklare hvorfor økt shear modulus ble funnet like etter eksentrisk arbeid i denne studien (Lacourpaille et al., 2014). En mulig forklaring er at rupturer på membranen i muskelfiberne fører til økt intracellulært Ca^{2+} som leder til tverrbrodannelser gjennom forbindelse mellom Ca^{2+} og Troponin C (Allen et al., 2008; Raastad et al., 2010). Dette resulterer i et lavt nivå av aktivering i det kontraktile apparatet som vil skape små kontrakturer og dermed øke den passive muskelspenningen og trolig øke shear modulus (Hoang et al., 2007; Raastad et al., 2010; Whitehead et al., 2001).

Det er også mulig at en økt stivhet i det store elastiske proteinet titin gjennom Ca^{2+} -forbindelse til PEVK-segmentet kan ha spilt en rolle i økningen av shear modulus observert i denne studien (Colombini et al., 2016; Freundt & Linke, 2019; Hoang et al., 2007). Videre er det vist at små HSP som Hsp27 og α B-crystallin binder seg til Ig-domenet på titin etter eksentrisk arbeid grunnet misfolding etter eksentrisk arbeid. En bieffekt av dette kan se ut til å være en mild økning i stivhet på titin (Freundt & Linke, 2019; Unger et al., 2017). Dette ser derimot ikke ut til å ha noen stor betydning for fjærstivheten i muskelvevet ettersom denne studien ikke fant noen korrelasjon mellom endring i shear modulus og endring i nivå av α B-crystallin eller Hsp70 i cytoskjelett. Dette er delvis støttet av en tidligere studie som ikke fant noen sammenheng mellom omfanget av myofibrillære rupturer og endring i passiv muskelspenning (Raastad et al., 2010). Det spekuleres derfor i om økt intracellulært Ca^{2+} er hovedårsaken til økt fjærstivhet i muskelvevet i tidlig fase etter et muskelødeleggende arbeid.

I denne studien var det en signifikant korrelasjon ($r = -0,53$) mellom endring i shear modulus ved 20° albuevinkel og reduksjon i MVIK 24 timer etter eksentrisk arbeid. Shear modulus korrelerte derimot ikke signifikant med reduksjon i MVIK 48 timer etter eksentrisk arbeid. Dette står i kontrast med funnet fra Lacourpaille et al. (2017). De fant en sterk korrelasjon mellom endring i shear modulus og endring i MVIK etter 48 timer både for albuefleksorene ($r = -0,82$) og kneekstensorene ($r = -0,80$). Denne korrelasjonen var også sterkere enn det som ble funnet i denne studien mellom endring i shear modulus etter 1 time og endring i MVIK etter 24 timer. Det ble nevnt at sammenhengen mellom endring i MVIK og shear modulus så ut til å være ikke-lineær. Kurven for forholdet mellom shear modulus og endring i MVIK etter eksentrisk arbeid så ut til å flate seg ut ved rundt 50% reduksjon i MVIK

(Lacourpaille et al., 2017). Spredningen på punktene i figur 4.7A stemmer godt med påstanden til Lacourpaille et al. (2017) om at det ikke er lineær sammenheng etter 50% reduksjon i muskelkraft. Dette støtter antagelsen om at sammenhengen mellom endring i shear modulus like etter eksentrisk arbeid og endring i MVIK 24 til 48 timer etter arbeidet ikke lengre er lineært etter ~50% fall i MVIK. De ulike korrelasjonene funnet i denne studien og av Lacourpaille et al. (2017) skyldes trolig metodologiske forskjeller. Lacourpaille et al. (2017) delte forsøkspersonene inn i to grupper; lav belastning (totalt 30 eksentriske kontraksjoner) og høy belastning (totalt 60 eksentriske kontraksjoner). Til sammenlikning gjennomførte alle forsøkspersonene i denne studien totalt 50 eksentriske kontraksjoner på albuefleksorene. I Lacourpaille et al. (2017) ble data fra gruppen med høy belastning og gruppen med lav belastning samlet sammen i samme korrelasjonsanalyse. Hele gruppen med lav belastning så ut til å falle innenfor den lineære delen av forholdet mellom endring i MVIK og shear modulus etter eksentrisk arbeid. Dette har trolig gitt en større andel datapunkt innenfor det lineære området sammenliknet med dataene i denne studien. Det er derfor sannsynlig at dette har ført til at korrelasjonen funnet i Lacourpaille et al. (2017) var sterkere enn det som ble funnet i denne studien. Hos gruppen med høy belastning så det ut til at kurven begynte å flate ut ved ~50% fall i MVIK. Dette har antakeligvis påvirket korrelasjonen og en ikke-lineær korrelasjonsanalyse vil trolig være mer passende disse dataene.

Mellom endring i shear modulus og endring i 20:50 Hz krafratio så det ut til å være en moderat korrelasjon ($r = -0,55$), men denne oppnådde ikke statistisk signifikans. Dette kan være på grunn av metodologiske begrensninger i denne studien. Grunnet ikke-valide målinger av 20:50 Hz krafratio ble kun 8 av 15 forsøkspersoner inkludert i videre analyser. Det lave antallet inkluderte observasjoner kan derfor være årsaken til at korrelasjonen ikke var signifikant. Reduksjon i 20:50 Hz krafratio indikerer forstyrrelse i E-C koplning (Raastad et al., 2010). Dette kan muligens skyldes økt Ca^{2+} innstrømning etter eksentrisk arbeid (Gissel & Clausen, 2001). Ettersom økt intracellulær Ca^{2+} også fører til økt stivhet i muskelvevet, forventet vi at endring i shear modulus skulle korrelere med lavfrekvent tretthet (Hoang et al., 2007; Lacourpaille et al., 2014; Whitehead et al., 2001). Videre undersøkelser på denne sammenhengen kreves for å bekrefte denne hypotesen.

Det var ingen sammenheng mellom endring i shear modulus og HSP-responsen. Dette støtter en tidligere studie som ikke fant en sammenheng mellom omfanget av skadde muskelfibre

og passiv spenning i kneekstensorene etter eksentrisk arbeid (Raastad et al., 2010). Det kan bety at skade i muskelcellene etter eksentrisk arbeid ikke alene kan skyldes Ca^{2+} innstrømning og degradering av strukturelle proteiner gjennom aktivering av calpain. Flere faktorer virker å spille inn i den økte responsen av HSP. Det er vist at mekanisk stress induisert av eksentrisk arbeid fører til skade og stress på strukturelle proteiner rundt Z-diskene (Clarkson & Hubal, 2002; Lauritzen et al., 2009). Dette er blitt etterfulgt av at både α B-crystallin og Hsp70 har akkumulert og ko-lokalisert seg rundt Z-diskene (Paulsen et al., 2009). Videre er det også foreslått at økt cytokiner i forbindelse med inflammasjon etter muskelskade kan indusere økt Hsp70-respons, men sannsynligvis ikke akkumulering i cytoskjelett (Paulsen et al., 2009; Paulsen et al., 2012). Denne studien utførte ikke direkte mål på muskelskade. Det trengs derfor videre undersøkelser som ser på sammenhengen mellom endring i shear modulus og direkte mål på muskelskader for å kunne konkludere om shear modulus kan indikere omfang av intracellulære skader etter eksentrisk arbeid.

5.4 ACTN3 - spiller det en rolle i muskelskade?

Det var ingen forskjell mellom forsøkspersonene som fikk påvist ACTN3 og de som ikke fikk påvist ACTN3 i hverken HSP-respons eller endring i MVIK etter eksentrisk arbeid. Det er tidligere gjort forsøk på å sammenlikne restitusjonen etter eksentriske kneekstensjoner mellom personer med og uten ekspresjon av ACTN3 (Vincent et al., 2010). I samsvar med denne studien var det ingen forskjell i isometrisk styrke eller Hsp70 mRNA-respons mellom gruppene etter eksentrisk arbeid. Det ble hevdet at en kompenserende økning i ekspresjon av α -aktinin-2 muligens kunne forklare at det ikke var noen forskjell mellom gruppene (Vincent et al., 2010). I samme studie ble det likevel oppdaget forskjell mellom gruppene i dynamisk styrke og CK respons. Personene uten ACTN3 ekspresjon viste en større reduksjon i maksimal isokinetisk kraftutvikling ved 100°/sek og ved 200°/sek sammenliknet med personene med ekspresjon av ACTN3. I tillegg hadde personene uten ACTN3 ekspresjon en høyere respons av CK i blodet 24 timer etter eksentrisk arbeid (Vincent et al., 2010). En senere studie gjort på maratonløpere etter en maratonkonkurranse fant også høyere CK samt myoglobin-nivå i blodet blant utøverne uten ekspresjon av ACTN3 sammenliknet med utøverne med ACTN3 ekspresjon. Utøverne uten ACTN3 ekspresjon rapporterte også en høyere oppfattet utmattelse og muskelsårhet etter maratonkonkurransen (Del Coso et al., 2017). I motsetning til dette fant vi ingen forskjell i CK-respons mellom forsøkspersonene med og forsøkspersonene uten ACTN3 (Data er ikke vist i denne studien). Dette funnet kaster tvil om ACTN3s betydning i utvikling av CK-verdi i blodet. Data for maksimale

dynamiske kontraksjoner i blodet ble ikke inkludert i denne studien. Det kan derfor være interessant å videre undersøke betydningen av ACTN3 ekspresjon ved maksimalt dynamisk arbeid. Selv om denne studien ikke fant noen forskjell mellom personer med og uten påvist ACTN3, kan tidligere funn tyde på at ACTN3 har en betydning for muskelskade (Del Coso et al., 2017, 2019; Vincent et al., 2010). Denne betydningen virker derimot ikke å være stor.

6. Konklusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke om responsen av α B-crystallin og Hsp70 og muskelens evne til å produsere kraft hadde en sammenheng med muskelvevets fjærstivhet etter uvant eksentrisk arbeid. Det var en markant og langvarig reduksjon i muskelkraft etter eksentrisk arbeid. I tillegg var det en rask akkumulering av α B-crystallin i cytoskjelett og en forsinket akkumulering av Hsp70 i både cytoskjelett og cytosol. Både tidlig akkumulering av α B-crystallin og forsinket Hsp70-respons korrelerte med fall i muskelkraft. Maksimalt eksentrisk arbeid førte til en økt fjærstivhet i muskelvevet målt med SWE, men økningen i fjærstivhet korrelerte ikke med akkumuleringen av HSP. Økt fjærstivhet i muskelvevet korrelerte likevel med redusert muskelkraft. Denne sammenhengen var lineær til et visst nivå, men kurven ser ut til å flate ut når muskelkraft reduseres med ~50%. Det trengs videre studier for å undersøke om denne sammenhengen er lineær eller ikke. Det eksentriske arbeidet reduserte 20:50 Hz kraftratioen og denne reduksjonen viste en moderat korrelasjon med økt fjærstivhet, men den var ikke signifikant. Dette kan ha vært grunnet metodologiske begrensninger i denne studien. Det er dermed behov for videre undersøkelser for å kunne konkludere noe om denne sammenhengen.

Følgende hypoteser ble bekreftet eller forkastet:

Maksimalt eksentrisk arbeid vil føre til økt fjærstivhet i muskelvevet akutt etter arbeidet og dette vil korrelere med:

- *Akkumulering/translokering av HSP - Usikkert*
- ***Fall i maksimal voluntær kraftutvikling - Bekreftet***
- *Utvikling av lavfrekvent tretthet - Fremdeles usikkert/delvis bekreftet*

Akkumulering/translokering av HSP vil korrelere med fall i maksimal voluntær kraftutvikling - Bekreftet

Det var ingen forskjell i HSP respons eller redusert isometrisk kraft mellom personer med og uten påvist ACTN3. Det er fremdeles usikkert om ACTN3 har en betydningsfull rolle for den reduksjonen vi ser i muskelfunksjon ved treningsindusert muskelskade. Det kan være interessant å undersøke betydningen for ACTN3 ved hurtige dynamiske muskelaksjoner etter treningsindusert muskelskade.

Referanser

- Allen, D. G. (2004). Skeletal muscle function: Role of ionic changes in fatigue, damage and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *31*(8), 485–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04032.x>
- Allen, D. G., Lamb, G. D., & Westerblad, H. (2008). Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms. *Physiological Reviews*, *88*(1), 287–332.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, C. M. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1854*(4), 291–319.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>
- Barash, I. A., Peters, D., Fridén, J., Lutz, G. J., & Lieber, R. L. (2002). Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *283*(4), R958-963.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00185.2002>
- Baron, C., Jacobsen, S., & Purslow, P. (2004). Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B. *Meat science*, *68*, 447–456.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.03.019>
- Beattie, K., Kenny, I. C., Lyons, M., & Carson, B. P. (2014). The effect of strength training on performance in endurance athletes. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *44*(6), 845–865. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0157-y>
- Becker, J., & Craig, E. A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry*, *219*(1–2), 11–23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79502-2_2

- Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D., & Raj, D. A. (1998). Exercise-induced muscle injury: A calpain hypothesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *179*(1–2), 135–145.
<https://doi.org/10.1023/a:1006816123601>
- Boelens, W. C. (2014). Cell biological roles of α B-crystallin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *115*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.005>
- Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *48*(6), 757–767.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.179>
- Brandenburg, J. E., Eby, S. F., Song, P., Zhao, H., Brault, J. S., Chen, S., & An, K.-N. (2014). Ultrasound elastography: The new frontier in direct measurement of muscle stiffness. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *95*(11), 2207–2219.
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2014.07.007>
- Brockett, C. L., Morgan, D. L., & Proske, U. (2001). Human hamstring muscles adapt to eccentric exercise by changing optimum length. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *33*(5), 783–790.
- Byrne, C., Twist, C., & Eston, R. (2004). Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage: Theoretical and applied implications. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *34*(1), 49–69. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434010-00005>
- Cabral, B. M. I., Edding, S. N., Portocarrero, J. P., & Lerma, E. V. (2020). Rhabdomyolysis. *Disease-a-Month: DM*, *66*(8), 101015.
<https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.101015>
- Cè, E., Longo, S., Limonta, E., Coratella, G., Rampichini, S., & Esposito, F. (2020). Peripheral fatigue: New mechanistic insights from recent technologies. *European Journal of Applied Physiology*, *120*(1), 17–39. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04264-w>

- Chapman, D. W., Simpson, J. A., Iscoe, S., Robins, T., & Nosaka, K. (2013). Changes in serum fast and slow skeletal troponin I concentration following maximal eccentric contractions. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *16*(1), 82–85.
<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.05.006>
- Chen, T. C., Liu, H.-W., Russell, A., Barthel, B. L., Tseng, K.-W., Huang, M.-J., Chou, T.-Y., & Nosaka, K. (2020). Large increases in plasma fast skeletal muscle troponin I after whole-body eccentric exercises. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *23*(8), 776–781. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.01.011>
- Cheng, A. J., Chaillou, T., Kamandulis, S., Subocius, A., Westerblad, H., Brazaitis, M., & Venckunas, T. (2020). Carbohydrates do not accelerate force recovery after glycogen-depleting followed by high-intensity exercise in humans. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *30*(6), 998–1007.
<https://doi.org/10.1111/sms.13655>
- Chleboun, G. S., Howell, J. N., Conatser, R. R., & Giesey, J. J. (1998). Relationship between muscle swelling and stiffness after eccentric exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *30*(4), 529–535. <https://doi.org/10.1097/00005768-199804000-00010>
- Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, *81*(11 Suppl), S52-69.
<https://doi.org/10.1097/00002060-200211001-00007>
- Colombini, B., Nocella, M., & Bagni, M. A. (2016). Non-crossbridge stiffness in active muscle fibres. *The Journal of Experimental Biology*, *219*(Pt 2), 153–160.
<https://doi.org/10.1242/jeb.124370>
- Del Coso, J., Hiam, D., Houweling, P., Pérez, L. M., Eynon, N., & Lucía, A. (2019). More than a «speed gene»: ACTN3 R577X genotype, trainability, muscle damage, and the risk for injuries. *European Journal of Applied Physiology*, *119*(1), 49–60.
<https://doi.org/10.1007/s00421-018-4010-0>

- Del Coso, J., Valero, M., Salinero, J. J., Lara, B., Díaz, G., Gallo-Salazar, C., Ruiz-Vicente, D., Areces, F., Puente, C., Carril, J. C., & Cacabelos, R. (2017). ACTN3 genotype influences exercise-induced muscle damage during a marathon competition. *European Journal of Applied Physiology*, *117*(3), 409–416.
<https://doi.org/10.1007/s00421-017-3542-z>
- Delecluse, C. (1997). Influence of strength training on sprint running performance. Current findings and implications for training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *24*(3), 147–156. <https://doi.org/10.2165/00007256-199724030-00001>
- Dimauro, I., Antonioni, A., Mercatelli, N., & Caporossi, D. (2018). The role of α B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues. *Cell Stress & Chaperones*, *23*(4), 491–505.
<https://doi.org/10.1007/s12192-017-0866-x>
- Doguet, V., Nordez, A., & Hug, F. (2019). *ElastoGUI User Guide*.
- Dundon, J. M., Cirillo, J., & Semmler, J. G. (2008). Low-frequency fatigue and neuromuscular performance after exercise-induced damage to elbow flexor muscles. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *105*(4), 1146–1155.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01339.2007>
- Eby, S. F., Song, P., Chen, S., Chen, Q., Greenleaf, J. F., & An, K.-N. (2013). Validation of shear wave elastography in skeletal muscle. *Journal of Biomechanics*, *46*(14), 2381–2387. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.07.033>
- Fanchaouy, M., Polakova, E., Jung, C., Ogrodnik, J., Shirokova, N., & Niggli, E. (2009). Pathways of abnormal stress-induced Ca²⁺ influx into dystrophic mdx cardiomyocytes. *Cell calcium*, *46*(2), 114–121.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.06.002>
- Fleck, S. J., & Falkel, J. E. (1986). Value of resistance training for the reduction of sports injuries. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *3*(1), 61–68.
<https://doi.org/10.2165/00007256-198603010-00006>

- Freundt, J. K., & Linke, W. A. (2019). Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *126*(5), 1474–1482. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2018>
- Fridén, J., Sjöström, M., & Ekblom, B. (1981). A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia*, *37*(5), 506–507. <https://doi.org/10.1007/BF01986165>
- Gissel, H., & Clausen, T. (2001). Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiologica Scandinavica*, *171*(3), 327–334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00835.x>
- Hill, C. A., Thompson, M. W., Ruell, P. A., Thom, J. M., & White, M. J. (2001). Sarcoplasmic reticulum function and muscle contractile character following fatiguing exercise in humans. *The Journal of Physiology*, *531*(3), 871–878. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0871h.x>
- Hoang, P. D., Herbert, R. D., & Gandevia, S. C. (2007). Effects of Eccentric Exercise on Passive Mechanical Properties of Human Gastrocnemius in vivo. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *39*(5), 849–857. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318033499b>
- Ivarsson, N., & Westerblad, H. (2015). α -Actinin-3: Why Gene Loss Is an Evolutionary Gain. *PLoS Genetics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004908>
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(3), 1517–1520.
- Kamandulis, S., Leite, F. de S., Hernández, A., Katz, A., Brazaitis, M., Bruton, J. D., Venckunas, T., Masiulis, N., Mickeviciene, D., Eimantas, N., Subocius, A., Rassier, D. E., Skurvydas, A., Ivarsson, N., & Westerblad, H. (2017). Prolonged force depression after mechanically demanding contractions is largely independent of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, *31*(11), 4809–4820. <https://doi.org/10.1096/fj.201700019R>

- Koh, T. J. (2002). Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 30(3), 117–121.
<https://doi.org/10.1097/00003677-200207000-00005>
- Koh, T. J., & Escobedo, J. (2004). Cytoskeletal disruption and small heat shock protein translocation immediately after lengthening contractions. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286(3), C713-722.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00341.2003>
- Kötter, S., Unger, A., Hamdani, N., Lang, P., Vorgerd, M., Nagel-Steger, L., & Linke, W. A. (2014). Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *The Journal of Cell Biology*, 204(2), 187–202.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201306077>
- Lacourpaille, L., Nordez, A., Hug, F., Couturier, A., Dibie, C., & Guilhem, G. (2014). Time-course effect of exercise-induced muscle damage on localized muscle mechanical properties assessed using elastography. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 211(1), 135–146. <https://doi.org/10.1111/apha.12272>
- Lacourpaille, Lilian, Nordez, A., Hug, F., Doguet, V., Andrade, R., & Guilhem, G. (2017). Early detection of exercise-induced muscle damage using elastography. *European Journal of Applied Physiology*, 117(10), 2047–2056. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3695-9>
- Lauritzen, F., Paulsen, G., Raastad, T., Bergersen, L. H., & Owe, S. G. (2009). Gross ultrastructural changes and necrotic fiber segments in elbow flexor muscles after maximal voluntary eccentric action in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 107(6), 1923–1934.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00148.2009>

- Liu, Y., Gampert, L., Nething, K., & Steinacker, J. M. (2006). Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *11*, 2802–2827. <https://doi.org/10.2741/2011>
- Lovering, R. M., & De Deyne, P. G. (2004). Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *286*(2), C230–C238. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00199.2003>
- Lynch, G. S., Fary, C. J., & Williams, D. A. (1997). Quantitative measurement of resting skeletal muscle $[Ca^{2+}]_i$ following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium*, *22*(5), 373–383. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(97\)90022-1](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(97)90022-1)
- Markus, I., Constantini, K., Hoffman, J. R., Bartolomei, S., & Gepner, Y. (2021). Exercise-induced muscle damage: Mechanism, assessment and nutritional factors to accelerate recovery. *European Journal of Applied Physiology*, *121*(4), 969–992. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04566-4>
- Martin, V., Millet, G. Y., Lattier, G., & Perrod, L. (2004). Effects of recovery modes after knee extensor muscles eccentric contractions. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *36*(11), 1907–1915. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000145526.43208.08>
- McHugh, M. P., Connolly, D. A., Eston, R. G., Kremenich, I. J., Nicholas, S. J., & Gleim, G. W. (1999). The role of passive muscle stiffness in symptoms of exercise-induced muscle damage. *The American Journal of Sports Medicine*, *27*(5), 594–599. <https://doi.org/10.1177/03635465990270050801>
- McHugh, Malachy P., Connolly, D. A. J., Eston, R. G., & Gleim, G. W. (1999). Exercise-Induced Muscle Damage and Potential Mechanisms for the Repeated Bout Effect. *Sports Medicine*, *27*(3), 157–170. <https://doi.org/10.2165/00007256-199927030-00002>

- Olsson, K., Cheng, A. J., Al-Ameri, M., Wyckelsma, V. L., Rullman, E., Westerblad, H., Lanner, J. T., Gustafsson, T., & Bruton, J. D. (2020). Impaired sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release is the major cause of fatigue-induced force loss in intact single fibres from human intercostal muscle. *The Journal of Physiology*, *598*(4), 773–787. <https://doi.org/10.1113/JP279090>
- Owens, D. J., Twist, C., Cobley, J. N., Howatson, G., & Close, G. L. (2019). Exercise-induced muscle damage: What is it, what causes it and what are the nutritional solutions? *European Journal of Sport Science*, *19*(1), 71–85. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1505957>
- Paroo, Z., Dipchand, E. S., & Noble, E. G. (2002). Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *282*(2), C245-251. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00336.2001>
- Paulsen, G., Lauritzen, F., Bayer, M. L., Kalhovde, J. M., Ugelstad, I., Owe, S. G., Hallén, J., Bergersen, L. H., & Raastad, T. (2009). Subcellular movement and expression of HSP27, α B-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, *107*(2), 570–582. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00209.2009>
- Paulsen, Gøran, Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: What role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise Immunology Review*, *18*, 42–97.
- Paulsen, Gøran, Vissing, K., Kalhovde, J. M., Ugelstad, I., Bayer, M. L., Kadi, F., Schjerling, P., Hallén, J., & Raastad, T. (2007). Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *293*(2), R844–R853. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00677.2006>

- Place, N., Ivarsson, N., Venckunas, T., Neyroud, D., Brazaitis, M., Cheng, A. J., Ochala, J., Kamandulis, S., Girard, S., Volungevičius, G., Paužas, H., Mekideche, A., Kayser, B., Martinez-Redondo, V., Ruas, J. L., Bruton, J., Truffert, A., Lanner, J. T., Skurvydas, A., & Westerblad, H. (2015). Ryanodine receptor fragmentation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak after one session of high-intensity interval exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(50), 15492–15497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507176112>
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, *18*(12), 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Raastad, T., Owe, S. G., Paulsen, G., Enns, D., Overgaard, K., Crameri, R., Kiil, S., Belcastro, A., Bergersen, L., & Hallén, J. (2010). Changes in Calpain Activity, Muscle Structure, and Function after Eccentric Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *42*(1), 86–95. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181ac7afa>
- Silver, J. T., & Noble, E. G. (2012). Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress & Chaperones*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0290-6>
- Stephenson, D. G., & Wendt, I. R. (1984). Length dependence of changes in sarcoplasmic calcium concentration and myofibrillar calcium sensitivity in striated muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *5*(3), 243–272. <https://doi.org/10.1007/BF00713107>
- Tee, J. C., Bosch, A. N., & Lambert, M. I. (2007). Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *37*(10), 827–836. <https://doi.org/10.2165/00007256-200737100-00001>
- Thompson, H. S., Clarkson, P. M., & Scordilis, S. P. (2002). The repeated bout effect and heat shock proteins: Intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, *174*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2002.00922.x>

- Tikhomirova, T. S., Selivanova, O. M., & Galzitskaya, O. V. (2017). α -Crystallins Are Small Heat Shock Proteins: Functional and Structural Properties. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(2), 106–121. <https://doi.org/10.1134/S0006297917020031>
- Tkáčová, J., & Angelovičová, M. (2012). Heat Shock Proteins (HSPs): A Review. *Lucrari Stiintifice : Zootehnie si Biotehnologii*, 45.
- Unger, A., Beckendorf, L., Böhme, P., Kley, R., von Frieling-Salewsky, M., Lochmüller, H., Schröder, R., Fürst, D. O., Vorgerd, M., & Linke, W. A. (2017). Translocation of molecular chaperones to the titin springs is common in skeletal myopathy patients and affects sarcomere function. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0474-0>
- Vasilaki, A., Iwanejko, L. M., McArdle, F., Broome, C. S., Jackson, M. J., & McArdle, A. (2003). Skeletal muscles of aged male mice fail to adapt following contractile activity. *Biochemical Society Transactions*, 31(2), 455–456. <https://doi.org/10.1042/bst0310455>
- Vincent, B., Windelinckx, A., Nielens, H., Ramaekers, M., Van Leemputte, M., Hespel, P., & Thomis, M. A. (2010). Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 109(2), 564–573. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01007.2009>
- Vissing, K., Bayer, M. L., Overgaard, K., Schjerling, P., & Raastad, T. (2009). Heat shock protein translocation and expression response is attenuated in response to repeated eccentric exercise. *Acta Physiologica*, 196(3), 283–293. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01940.x>
- Westcott, W. L. (2012). Resistance training is medicine: Effects of strength training on health. *Current Sports Medicine Reports*, 11(4), 209–216. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e31825dabb8>

- Whitehead, N. P., Weerakkody, N. S., Gregory, J. E., Morgan, D. L., & Proske, U. (2001). Changes in passive tension of muscle in humans and animals after eccentric exercise. *The Journal of Physiology*, 533(Pt 2), 593–604. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0593a.x>
- Żwirowski, S., Kłosowska, A., Obuchowski, I., Nillegoda, N. B., Piróg, A., Ziętkiewicz, S., Bukau, B., Mogk, A., & Liberek, K. (2017). Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *The EMBO Journal*, 36(6), 783–796. <https://doi.org/10.15252/emj.201593378>

Tabelloversikt

| | |
|---|----|
| Tabell 3.1: <i>Karakteristika av forsøkspersonene (n = 15)</i> | 34 |
| Tabell 3.2: <i>Primær- og sekundærtstoff benyttet i analysene</i> | 42 |
| Tabell 4.1: <i>Korrelasjon mellom prosentvis endring fra pre i MVIK (24 og 48 timer etter baseline), nivå av αB-crystallin 2 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett) og nivå av Hsp70 48 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett). r = korrelasjonskoeffisient, P = P-verdi, * = signifikant korrelasjon, NS = ikke signifikant korrelasjon.</i> | 49 |
| Tabell 4.2: <i>Korrelasjon mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus (20° leddvinkel i albuen), nivå av αB-crystallin 2 timer etter eksentrisk arbeid (i cytosol og cytoskjelett), nivå av Hsp70 48 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 24, 48, 72 og 96 timer etter arbeid, samt ratioen av elektrisk stimulering på 20 og 50 Hz 1 time etter arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P-verdi, * = signifikant korrelasjon, NS = ikke signifikant korrelasjon.</i> | 50 |

Figuroversikt

- Figur 2.1:** Restitusjon av kraftgenererende kapasitet for personer som har utført tung styrketrening eller maksimalt eksentrisk arbeid. Grønn linje viser endring i kraftutviklingsevne ved mild muskelskade. Blå linje viser endring i kraftutviklingsevne ved moderat muskelskade. Rød viser endring i kraftutviklingsevne ved alvorlig muskelskade. Figuren er hentet fra Paulsen et al. (2012) 14
- Figur 2.2:** Eksempel på ruptur i myofibrillene og utflytende Z-disker vist gjennom elektronmikroskopi. * indikerer område med mild muskelskade. ** indikerer område med moderat muskelskade. Bildet er hentet fra Lauritzen et al. (2009) 16
- Figur 2.3:** Eksempel på økt muskelstivhet. Grafen viser passiv spenning ved ulike muskellengder relativt til muskelens optimale lengde før (sorte sirkler) og etter (åpne sirkler) eksentrisk arbeid. * = signifikant forskjellig fra kontrollverdi. Verdiene vises som gjennomsnitt \pm SEM. Figuren er hentet fra Whitehead et al. (2001). 19
- Figur 2.4:** En illustrasjon av titin i tre ulike faser; avslappet fase (A), utstrakt fase (B) og utstrakt fase hvor Ca^{2+} er bundet til PEVK segmentet (C). Kraftkurvene til venstre illustrerer den passive spenningen ved endring i muskellengde under de ulike fasene (B og C). Legg merke til at kraftresponsen ved endring i muskellengde er større når Ca^{2+} er bundet til PEVK segmentet på titin. Figuren er hentet fra Colombini et al. (2016)..... 21
- Figur 2.5:** Eksempel på SWE og hvordan shear modulus øker ved økende albuevinkel (økende muskellengde) før (grå prikker) og etter (sorte prikker) eksentrisk arbeid. (a) viser hvordan endring i shear modulus ser ut visuelt innen et interesseområde (ROI; de blå rektanglene). (b) viser en lineær sammenheng mellom endring i albuevinkel og endring i shear modulus fra omtrent 100° til 160° . Bildet er hentet fra (Lacourpaille et al., 2017)..... 23
- Figur 2.6:** Bildet viser muskelprøver 1 og 48 timer etter eksentrisk arbeid som ble merket for αB -crystallin og desmin. Bilde C, E og F er fra elektronmikroskopi (EM), mens D er konfokal mikroskopi (KM). Pilene på EM bildene (III og IV) peker på gullpartikler som markerer αB -crystallin. Legg merke til at pilene på bilde IV peker på en Z-disk nært en skadd myofibrill og til et mellomliggende filament (antageligvis desmin). Pilene på KM bildet (D) viser retningen på fibrene og områder med høy immunoreaktivitet for αB -crystallin. * markerer Z-disker; Mito: mitokondria. Bilde E og F viser immuno-gullmerkning av αB -crystallin og desmin. Pilene markerer gullpartikler som markerer αB -crystallin og desmin. Figuren er hentet fra Paulsen et al. (2009)..... 28
- Figur 2.7:** Regulering av Hsp70 akkumulering. Denaturerte og ikke-foldet proteiner fører til at Hsp70 frigjør seg fra HSF1. Dette tillater HSF1 til å danne en trimerformasjon som binder seg til HSE på promoter regionen Hsp70-genet. Dette fører til initiering av transkripsjon av Hsp70 mRNA som videre fører til Hsp70 syntese. Figuren er hentet fra Liu et al. (2006). 29
- Figur 3.1:** Oversikt over forsøksprotokoll. MVIK = Maksimal voluntær isometrisk kontraksjon, SWE = Shear Wave Elastografi, Trening = det eksentriske muskelarbeidet. ... 35
- Figur 3.2:** Bilde av forsøksperson festet på dynamometeret med håndleddsortose som utfører maksimalt eksentrisk arbeid. 36

Figur 3.3: Bildet til venstre viser selve ultralydmålingen utført på forsøksperson. Proben er plassert longitudinelt med muskelfibrene og proksimalt over *m. biceps brachii*. Bildet til høyre viser ultralydbilde med ROI (blått rektangel). 39

Figur 3.4: Figuren viser membraner fra western blot analysene. Membranene til venstre med proteinbånd viser forsøkspersoner som var positiv for ACTN3 i cytoskjelett. Membranene til høyre viser forsøkspersoner som var negative for ACTN3 i cytoskjelett. 42

Figur 4.1: Endring i MVIK på albuefleksorene ved 80° albuevinkel (0° tilsvarer full ekstensjon) relativt til pretest ved ulike tidspunkter etter eksentrisk arbeid. * = forskjellig fra Pre ($P < 0,05$) ** = signifikant forskjellig fra Pre ($P < 0,001$) # = signifikant forskjellig fra kontroll ved samme tidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM..... 44

Figur 4.2: Dreiemoment ved elektrisk stimulering på *m. biceps brachii* før (Pre) og 1 time etter (Post 1t) eksentrisk arbeid. Grafene viser dreiemoment relativt til Pre-verdi generert ved stimuleringsfrekvens på 50 Hz (A) og 20 Hz (B). (C) viser ratioen av kraft generert ved 20 og 50 Hz. * = signifikant forskjell mellom Pre og Post 1t ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM 45

Figur 4.3: Intensitetsnivå av α B-crystallin i cytosol (A) og cytoskjelett (B) etter eksentrisk arbeid analysert med western blot. Intensiteten er normalisert for en kontrollprøve og indikerer proteinnivået i cytosol og cytoskjelett. (C) viser bilder av representative bånd fra western blot analysene av belastet muskel. * = signifikant forskjell fra 2 timer etter trening ($P < 0,05$). # = signifikant forskjell fra kontrollarm ved samme biopsitidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM..... 46

Figur 4.4: Endring i intensitetsnivå av Hsp70 i cytosol (A) og cytoskjelett (B) etter eksentrisk arbeid. Intensiteten er normalisert for kontrollprøve. (C) viser representative bånd fra western blot analysene. * = signifikant forskjell fra 2 timer etter trening ($P < 0,05$). # = signifikant forskjell fra kontrollarm ved samme biopsitidspunkt ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM 47

Figur 4.5: Endring i shear modulus målt med Shear wave elastografi ved 90° (A) og 20° (B) leddvinkel på albueleddet (0° er full ekstensjon). Shear modulus, målt i kPa, indikerer muskelens fjærstivhet. * = signifikant forskjell fra Pre ($P < 0,05$). Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM..... 48

Figur 4.6: A) viser korrelasjonen mellom nivå av α B-crystallin i cytoskjelett 2 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 24 timer etter arbeid. B) viser korrelasjonen mellom Hsp70 nivå i cytosol 48 timer etter arbeid og prosentvis endring i MVIK 48 timer etter arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi..... 49

Figur 4.7: A) viser korrelasjonen mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus ved 20° albuevinkel og prosentvis endring fra pre i MVIK 24 timer etter eksentrisk arbeid. B) viser korrelasjonen mellom prosentvis endring fra pre i gjennomsnittlig shear modulus ved 20° albuevinkel og kraftratioen mellom elektrisk stimulering på 20 og 50 1 time etter eksentrisk arbeid. r = korrelasjonskoeffisient, P = P -verdi 51

Figur 4.8: Viser responsen av α B-crystallin i cytosol (A) og cytoskjelett (B), samt responsen av Hsp70 i cytosol (C) og cytoskjelett (D) for forsøkspersoner med (firkanter) og uten (sirkler) ACTN3 i *m. biceps brachii*. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM 52

Figur 4.9: Prosentvis endring i MVIK etter eksentrisk arbeid for forsøkspersonene som var positive (hvite stolper) og negative (sorte stolper) for ACTN3. Resultatene vises i gjennomsnitt \pm SEM..... 52

Forkortelser

| | |
|-------------|--|
| ACTN3 | α -actinin-3 |
| AP | Aksjonspotensial |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| CK | Kreatin kinase |
| DHPR | Dihydropyridin reseptorene |
| DTT | Dithiotreitol |
| E-C kopling | Exitasjon-kontraksjonskopling |
| EIMD | Treningsindusert muskelskade |
| EM | Elektronmikroskopi |
| EMG | Elektromyografi |
| HSE | Heat shock element |
| HSF-1 | Heat shock factor-1 |
| HSP | Heat shock proteiner |
| Hsp70 | Heat shock protein 70 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| KM | Konfokal mikroskopi |
| kPa | Kilopascal |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| MVIK | Maksimal voluntær isometrisk kontraksjon |

| | |
|-------|--|
| PINC | Protease inhibitor cocktail |
| ROI | Region of interest |
| ROS | Reaktive oksygenarter |
| RyR | Ryanodin reseptor |
| SERCA | Sarko/endoplasmatisk retikulum Ca^{2+} ATPase |
| sHSP | Små heat shock proteiner |
| SR | Sarkoplasmatisk retikulum |
| SWE | Shear wave elastography |
| TBS | Tris buffered saline |

Vedlegg 1

Western Blot - Protokoll

Løsninger (beregnet for 4 geler)

- Running Buffer, 1,5 L (150 ml 10xTGS buffer + 1350 ml dH₂O)
- Transfer Buffer, 2 L (200 ml 10xTris/glycine buffer + 200 ml metanol + 1600 ml dH₂O)
- TBS, 2 L (200 ml TBS + 1800 ml dH₂O)
- TBS-T, 2 L (200 ml TBS + 1800 ml dH₂O + 2 ml Tween 20)
- 5 M DTT (386 mg DTT + 500 µl dH₂O)

Dag 1

1. Klargjøring av prøver

- Sett varmeblokk på 70 °C
- Sett prøvene (aliquotene) på is (Cytoskjelett-prøver skal stå i romtemperatur)
- Lag **Sample buffer** - Bland Laemmli og DTT i et eget rør (4 geler: 336 µl **Laemmli** + 14 µl **5M DTT**)
- Beregn mengde prøve, dH₂O og sample buffer i henhold til «Prøveopparbeidelse til WB». Bland prøvene godt ved hjelp av en vortxer og en mini-sentrifuge).
- Sett merkede eppendorfrør på varmeblokk i 10 minutter ved 70°C.

2. Klargjøring av elektroforese

- Finn frem geler, Running buffer, elektroforesekammer og markører.
- Ta gelene ut av plastemballasjen, og fjern kammen og tapen på undersiden av gelen.
- Bruk en pasteur-pipette til å skylle brønnene med *Running buffer*.
- Nummerer gelene, og noter hvilken kassett de plasseres i.
- Sett gelene i gelkassetten med brønnene vendt innover.
- Kontroller at gelene står korrekt før de låses fast.
- Tilsett *Running buffer* i det indre kammeret - kontroller lekkasje

3. Elektroforese

- Tilsett 5 µl proteinmarkør i de to ytterste brønnene (1 og 10).
- Pipetter mengde prøve etter ønsket loadingvolum i brønn 2-9 - kontroller maksvolumet i brønnene på gelene som benyttes.
- Fyll det ytre kammeret med *Running buffer*.
- Sett på lokk, monter ledninger, og skru på power supplyen.
- Juster volt til 200 V, og start elektroforesen.
- Elektroforesen tar 25-45 minutter - la tiden telle oppover og noter ampere ved start
- Kontroller for bobler i elektroforesekammeret når strømmen blir slått på, og se til at proteinene vandrer parallelt nedover i gelen
- Den blå linjen skal være nederst i karet ved elektroforeseslutt.

4. Klargjøring til blotting

- Finn frem PVDF-membran og transfer stacks - klipp et hakk og skriv nummer øverst i venstre hjørne på membranen.
- Aktiver PVDF-membranen:
 - 30 sekunder i metanol
 - 30 sekunder x2 i dH₂O
 - 2-3 minutter i *Transfer buffer*
- Transfer stacks fuktes i *Transfer buffer* i 2-3 minutter.

5. Aktivering av gel

- Noter ampere og tid ved elektroforeseslutt.
- Trykk på stoppknappen og skru av PowerPacen.
- Ta ut gelene og benytt et metallredskap til å åpne platen rundt gelen.
- Legg platen i håndflaten og fjern den ene plastplaten.
- Fjern brønnene og den uthevede kanten nederst på gelen.
- Lag et kutt øverst i hjørnet over brønn 1 for å markere hvor brønn 1 befinner seg.
- Legg gelen i dH₂O og fjern den andre plastplaten - pass på at gelen ikke flyter opp.
- For å sjekke at alle brønnene har fått tilsatt samme mengde protein aktivere gelene av UV-lys vha. ChemiDoc Imaging Systemet.
 - UV-lyset aktiverer tryptofan og proteiner som inneholder denne aminosyren vil gi signal.
- Lagre bildet og legg gelen tilbake i dH₂O.

6. Blotting ved hjelp av Trans-Blot Turbo Transfer System

- Plasser et vått filterpapir i bunnen av kassetten. Denne vil fungere som bunnen i ione reservoaret. Dette er den positive delen.
- Plasser en våt membran på toppen av det våte filterpapiret.
- Plasser gelen på membranen - gelen skal ikke behandles i etanol før transferen.
- Fjern luftbobler med en botteruller.
- 2 mini geler får plass i en kasset. Plasser bunnen av gelen mot senteret i kassetten.
- Plasser et nytt transfer filterpapir på toppen av gelen. Denne vil fungere som topp ion reservoaret i stakken, den negative delen.
- Rull sandwichen med en blotteruller for å fjerne luftbobler.
- Ikke tilfør ekstra transfer buffer i kassetten.
- Skru på turboblotteren.

7. Bilde av membran og gel etter blotting

- Ta bilde av membran og gel etter blotting ved hjelp av *ChemiDoc Imaging Systemet*.
- Hell av vann og buffer
- Legg membranen i TBS

8. Laging av blokkeringsløsning

- Lag en 5% melkeløsning (5 g melkepulver + 100 ml TBS-T)
- Kontroller alltid proteinets følgeskriv for bruk av best egnet blokkeringsløsning (Bovine Serum Albumin (BSA) er et alternativ til melkepulver).

9. Blokkering

- Legg membranene i blokkeringsløsningen som ble laget i punkt 8.
- Inkuber membranene i rolige bevegelser på en risteplate i 2 timer i romtemperatur (membranene kan eventuelt blokkeres over natt i 4°C)

10. Laging av inkuberingsløsning til antistoff

- Lag en 1% melskeløsning (1 g melkepulver + 100 ml TBS-T)
- Kontroller alltid proteinets følgeskriv for bruk av best egnet inkuberingsløsning (Bovine Serum Albumin (BSA) er et alternativ til melkepulver).

11. Vasking etter blokkering

- Vask membranen for å fjerne overskudd av blokkeringsløsningen.
- Vask med romtempererte vaskeløsninger. Benytt en gyrorocker med hastighet 65.
- Vaskeprosedyre av membraner etter blokkering:
 - Skyll 2 raske ganger med TBS-T
 - Vask 2 x 2 minutter med TBS-T
- Legg membranen midlertidig i TBS før de plasseres i primært antistoff.

12. Primært antistoff

- Kontroll fortynningen av antistoff i følgeskrivet.
- Membranen kan deles i flere mindre deler slik at flere proteiner kan undersøkes samtidig.
- Kutt membranen etter vektmarkørene i brønn 1 og 10.
 - Fukt en glassplate.
 - Legg membranen med proteinsiden ned mot glassplaten.
 - Benytt en linjal og et skalpell for å dele membranen.
 - Merk hver membrandel på nytt.
- Velg inkuberingsbeholder i forhold til totalvolumet som skal lages av inkuberingsløsningen. Primært antistoff kan inkuberes i rør, små inkuberingskammere og i bokser.
- Plasser inkuberingsbeholderen med membranen på en rollermikser eller risteplate over natt i 4°C. Membranene skal inkuberes med rolige bevegelser.
- Eksempel på primært antistoff:
 - Antistoff mot Hsp70, ADI-SPA-810-F, Enzo
 - Hsp70 fortynnes 1:4000 (10 ml 1% melkeløsning + 2,5 µl antistoff)

- Nye antistoff skal alltid testes ut.

Dag 2

13. Vasking av membran etter inkubering med antistoff

- Vask membranen for å fjerne overskudd av primært antistoff.
- Vask med romtempererte løsninger. Benytt gyrorocker med hastighet 65.
- Vaskeprosedyre av membraner etter inkubering med primært antistoff:
 - Skyll 2 raske ganger med TBS-T.
 - Vask 15 minutter i TBS-T.
 - Vask 3 x 5 minutter i TBS.

14. Sekundært antistoff

- Velg sekundært antistoff som er rettet mot vertedyret i det primære antistoffet.
- Kontroller fortynning av antistoffet i følgeskrivet.
- Velg inkuberingsbeholder i forhold til totalvolumet som skal lages av inkuberingsløsningen. Sekundært antistoff kan inkuberes i rør eller i boks.
- Plasser inkuberingsbeholderen med membranen på en rollermikser eller en risteplate (rolige bevegelser) i 1 time i romtemperatur.
- Eksempel på sekundært antistoff:
 - Goat-anti-mouse IgG, Prod: 31430, Thermo Scientific.
 - Antistoffet fortynnes 1:30 000 (30 ml 1% melkeløsning + 1 µl antistoff)

15. Substratløsning

- Substratløsningen Super Signal består av to reagenser
 - Reagens A inneholder en stabil peroxid-løsning
 - Reagens B inneholder luminol
- Bland reagensene rett før bruk.
 - Bland 1 del reagens A + 1 del reagens B.
 - Løsningen er lyssensitiv, og må oppbevares i et mørkt skap eller dekkes til med aluminiumsfolie.
- Substratløsningen kan klargjøres mens membranene vaskes, se punkt 13.

16. Deteksjon

- Etter at det primære antistoffet er bundet til målproteinet, dannes et kompleks sammen med HRP-lenket sekundært antistoff. Enzymet på det sekundære antistoffet (Horseradish peroxidase) er en katalysator som starter en oksidasjon av luminol med peroxid til stede. En enzymatisk reaksjon starter når membranen inkuberes med chemiluminescenssubstratet. Oksidert luminol sender ut et svakt lys mens det går

tilbake til sin grunntilstand. Lyset som sendes ut fanges opp av kameraet i ChemiDocen og danner proteinbånd.

17. Deteksjon ved hjelp av ChemiDoc MP Imaging System

- Skru på PC og ChemiDoc.
- Åpne programmet ImageLab
 - Velg **Protocols: New single channel**
 - **Gel imaging** vil vises
 - Velg **Application: Select → Custom → Membran**
- Legg membranen (proteinsiden opp) på glassplaten i skuffen på ChemiDocen.
 - Benytt en plastpinsett.
 - Unngå luftbobler mellom membranen og glassplaten.
- Velg **Position Gel** og sentrer membranen (zoom inn til membranen fyller hele ruten).
- Velg **Run Protocol**.
- Lagre bildet av membranen med de synlige markørene.
- Legg membranen i en boks sammen med substratløsningen.
- La membranene ligge i substratløsningen i 5 minutter på et mørkt sted.
- Velg **Application: Select → Blots → Chemi Hi Sensitivity**.
 - **Image Exposure: The software will automatically optimize the exposure time for: Intense Bands.**
- Velg **Run Protocol**.
- Lagre bildene av proteinbåndene
- Lukk programmet og slå av ChemiDocen og PC.
- Vask glassplaten med dH₂O og tørk av med Kimtech tørkepapir.

18. Normalisering og analysering

- Proteinbåndene kan kvantifiseres ved hjelp av ImageLab 5.1 software.
- Åpne bilde av membranen etter blotting (punkt 7) og bilde av membran med proteinbånd.
- Velg **Lanes and Bands → Normalization channel → Add channel..**
- Plasser bilde av membran etter blotting ved **Normalization Data** og bilde av proteinbånd ved **Sample Data** og klikk OK.
- Plasser hver *Lane* rundt alle proteinbåndene for hver brønn på bildet av membranen etter blotting.
- Gå deretter til bildet med proteinbånd og trykk på **Sync Norm. Lanes**.
- Velg **Detect Bands**.
- Velg **Lane Profile** og tilpass bakgrunn og range for båndene.
- Velg **Analysis Table**.
- Velg **Export analysis table to Excel**.
- Lagre resultatene.

Vedlegg 2



| | | | | |
|---------------|------------------|----------|------------|----------------|
| Region: | Saksbehandler: | Telefon: | Vår dato: | Vår referanse: |
| REK sør-øst A | Tove Irene Klokk | 22845522 | 08.10.2019 | 31413 |

Truls Raastad

31413 Restitusjon etter eksentrisk muskelarbeid

Forskningsansvarlig: Norges idrettshøgskole

Søker: Truls Raastad

Søkers beskrivelse av formål:

Formålet er å studere hvordan kalsiumregulering i muskelfibre påvirkes av hardt muskelarbeid. I tillegg vil vi undersøke hvordan non-invasive metoder kan brukes til å klassifisere muskelskader i en tidlig fase.

Vi rekrutterer friske unge menn og kvinner i alderen 18-35 år. De gjennomfører eksentrisk muskelarbeid med én arm som fører til varierende grad av muskelødeleggelser i albuefleksorene. I tre dager etter arbeidet tar vi muskelprøver av både belastet arm og av motsatt arm (kontroll) for å se på følgende mekanismer i restitusjonsforløpet: kalsiumhåndtering, inflammasjon, strukturelle ødeleggelser, stressresponser og regenerering. I tillegg vil vi følge restitusjonen ved kraftmålinger, måling av vevsstivhet (ultralyd) og ved å se på utslipp av muskelproteiner i blod og urin.

Ekstreme treningsformer har økt forekomsten av muskelødeleggelser siste år. Våre resultater vil gi ny kunnskap om viktige restitusjonsprosesser og om nye invasive metoder tidlig kan påvise grad av muskelskade.

REKs vurdering

Vi viser til søknad om forhåndsgodkjenning av overnevnte forskningsprosjekt. Søknaden ble behandlet av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK sør-øst A) i møtet 19.09.2019. Vurderingen er gjort med hjemmel i helseforskningslovens § 10.

Formålet med prosjektet er å studere hvordan kalsiumregulering i muskelfibre påvirkes av hardt muskelarbeid. I tillegg vil prosjektet undersøke hvordan non-invasive metoder kan brukes til å klassifisere muskelskader i en tidlig fase.

Bakgrunnen for studien er at nye treningsformer, som f.eks. Crossfit, har ført til en kraftig økning av store muskelskader de siste årene. 15 friske unge menn og kvinner i alderen 18-35 år vil rekrutteres for å gjennomføre et svært belastende eksentrisk muskelarbeid med én arm som fører til varierende grad av muskelødeleggelse i albuerrefleksorene. I tre dager etter arbeidet skal det tas muskelprøver av både belastet arm og av motsatt arm (kontroll) for å se på følgende mekanismer i restitusjonsforløpet: kalsiumhåndtering, inflammasjon, strukturelle ødeleggelse, stressresponser og regenerering. Man vil også følge restitusjonen ved kraftmålinger, måling av vevsstivhet (ultralud) og ved å se på utslipp av muskelproteiner i blod og urin. Biologisk materiale som samles inn skal oppbevares i en prosjektspesifikk biobank.

Komiteen mener at dette er et nyttig prosjekt som det er forsvarlig å gjennomføre. Deltakerne kan risikere å få noe arrdannelse etter muskelbiopsier, men dette er det informert godt om i samtykkeskrivet. Komiteen har imidlertid et par merknader til informasjonsskrivet:

1. I søknadsskjema er Truls Raastad oppgitt som ansvarshavende for den prosjektspesifikke biobanken, mens det i informasjonsskrivet til deltakerne er oppgitt å være seksjonsleder Klav Madsen. Komiteen legger til grunn at prosjektleder Truls Raastad er ansvarshavende for biobanken, og dette må derfor også fremgå av informasjonsskrivet.
2. Etter helseforskningsloven skal ikke opplysninger oppbevares lengre enn det som er nødvendig for å gjennomføre prosjektet, jf. helseforskningslovens § 38. Med bakgrunn i dette anbefaler REK at opplysninger skal oppbevares i inntil 5 år etter prosjektslutt av kontrollhensyn. I informasjonsskrivet er det opplyst om at data slettes 10 år etter prosjektslutt, dette må derfor endres til 5 år.

Komiteen godkjenner derfor prosjektet på følgende vilkår:

1. Prosjektleder Truls Raastad oppgis som ansvarshavende for biobanken i informasjonsskrivet til deltakerne.
2. Under avsnittet «Hva skjer med opplysningene om deg?» i informasjonsskrivet må det endres til at opplysningene vil bli anonymisert eller slettet 5 år etter prosjektslutt.

Revidert informasjonsskriv bes sendes REK for orientering. Dette kan sendes på epost til rek-sorost@medisin.uio.no.

Vedtak

Godkjent med vilkå

REK har gjort en helhetlig forskningsetisk vurdering av alle prosjektets sider. Prosjektet godkjennes med hjemmel i helseforskningsloven § 10, under forutsetning av at ovennevnte vilkår er oppfylt.

Vi gjør samtidig oppmerksom på at etter ny personopplysningslov må det også foreligge et behandlingsgrunnlag etter personvernforordningen. Det må forankres i egen institusjon.

Godkjenningen gjelder til 01.10.2024.
Komiteens avgjørelse var enstemmig.

Komiteen godkjenner opprettelse av en spesifikk forskningsbiobank, med ansvarshavende Truls Raastad ved Norges idrettshøgskole, med samme varighet som prosjektet.

Av dokumentasjonshensyn skal opplysningene oppbevares i 5 år etter prosjektslutt. Opplysningene skal oppbevares aidentifisert, dvs. atskilt i en nøkkel- og en datafil. Opplysningene skal deretter slettes eller anonymiseres.

Vennlig hilsen

Knut Engedal Professor
dr. med. Leder REK sør-
øst A

Tove Irene Klokk
Rådgiver

Kopi: postmottak@nih.no

Vedlegg 3



Seksjon for fysisk prestasjonevne
NORGES IDRETTSHØGSKOLE

FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKTET

RESTITUSJON ETTER TUNG STYRKETRENING

Er du nysgjerrig på forskning om styrketrening og restitusjon? Lurer du på hvordan veldig tung styrketrening påvirker utrente muskler?

Dette er spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt for å undersøke mekanismene som styrer skadene som noen ganger oppstår i musklene etter tung og/eller uvant styrketrening. Vi skal undersøke hvordan én meget tung styrketreningsøkt påvirker restitusjonen i timene og dagene etter treningsøkta. Målet med studien er å undersøke om det er sammenheng mellom den akutte endringen i stivhet i muskulaturen og de skadene vi observerer i muskelvevet to døgn etter treningsøkta. Videre vil vi undersøke hvilken rolle kalsium har i restitusjonen av musklene.

For å kunne delta må du være mellom 18 og 35 år. Du kan ikke delta dersom du har trent styrketrening regelmessig (én gang per uke eller mer) det siste året, eller har sykdom som rammer muskel-skjelett-systemet eller andre tilstander som hindrer deg i å trene tung styrketrening.

HVA INNEBÆRER PROSJEKTET?

Dette prosjektet går over totalt to uker, hvorav du som forsøksperson må møte to ganger i løpet av den første uken og fem ganger (mandag-fredag) den andre uken.

Det to første gangene i uke 1 er det tilvenning til tester. Vi vil da måle din maksimale muskelstyrke i armbøyerne (biceps brachii), og ta ultralyd av de samme musklene for å måle musklens størrelse og stivhet. I tillegg vil vi undersøke hvor støl/sår du opplever musklene.

Når vi har gjennomført tilvenningstestene i uke 1, starter selve forsøket på mandag i uke 2. Du må sette av 6 timer til forsøket denne dagen. Vi skal da gjenta alle testene beskrevet ovenfor flere ganger i løpet av dagen samt ta blodprøver, urinprøver og muskelprøver. Totalt vil vi ta seks blodprøver og seks urinprøver, to blodprøver og to urinprøver på dag 1 og én blodprøve og urinprøve de resterende dagene (tirsdag-fredag). Selve forsøket går ut på å gjennomføre 50 armbøyinger eksentrisk (biceps curl). Det vil si at man skal forsøke å holde igjen når treningsapparatet presser armen ned med en kraft som overstiger din maksimale styrke. To timer etter styrketreningsøkta vil vi ta muskelprøver fra begge armene. Tre timer etter økta vil vi gi musklene elektrisk stimulering. Tirsdag, onsdag, torsdag og fredag vil vi gjennomføre alle

de samme testene som beskrevet i tilvenningsøktene og gi musklene elektrisk stimulering. I tillegg vil vi ta muskelprøver fra begge armene onsdag og fredag. Tirsdag og torsdag må du sette av to timer til testing, onsdag og fredag må du sette av tre timer til testing. Se vedlegg I for detaljert plan og tentative tidspunkt.

I prosjektet vil vi innhente og registrere opplysninger om deg. Det vil være antropometriske data (kjønn, alder, høyde, vekt) og mål på muskelstyrke, -tykkelse, -sårhet, -stivhet, samt muskelprøver, blodprøver og urinprøver. Alle data blir anonymisert og skal ikke kunne spores tilbake til deg. Blodprøvene sendes til Rikshospitalet ved avdeling for medisinsk biokjemi for analyse. Muskelprøvene og urinprøvene oppbevares i en biobank uten kommersielle interesser før de analyseres.

MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Fordeler med å delta:

Deltakelse i studien vil gi kjennskap til idrettsforskning og hvordan forsøk gjennomføres i praksis. Alle deltagere vil bli invitert til møte hvor vi presenterer resultatene. Du vil således få god kunnskap om restitusjonsprosessene som følger en tung styrketreningsøkt.

Du vil få målt din maksimale styrke i armbøyerne, som kan være av interesse dersom man ønsker å starte med styrketrening. I tillegg vil du få vite muskulaturens (m. biceps brachii) tykkelse og fibertypesammensetning.

Videre vil du få innsikt i hvordan dine muskler responderer på den tunge belastningen.

Ulemper med å delta:

Deltakelse vil kreve tid til oppmøte. Selve treningsøkten er meget anstrengende selv om du kun belaster én arm, og du vil oppleve stølhet/sårhet i muskulaturen dagene etterpå. Det er stor sannsynlighet for at du utvikler en grad av muskelskader, noe som også er hensikten med studien. Det er imidlertid en liten risiko for utvikling av rabdomyolyse¹. Vi følger opp alle deltakere hver dag, i fire dager etter styrketreningsøkten, og vil ha nær kontakt med medisinsk ansvarlig for prosjektet, Prof. Em. Haakon Breien Benestad. Videre kan blodprøvetagning og muskelprøvetagning være ubehagelig. Ved muskelprøvetakning bedøves huden og bindevevet rundt muskelen for minimere ubehag. I om lag ett døgn etter muskelprøven opplever man ømhet og stølhet i området rundt snittet, ømheten vil deretter avta og forsvinner vanligvis i løpet av én-fire dager. Enkelte personer kan få tydelig arrdannelse etter snittet i huden (se vedlegg II). Elektrisk stimulering av musklene vil få de til å trekke seg sammen og oppleves som å få et støt. Dette kan oppleves litt ubehagelig, men er ufarlig.

FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til

prosjektet, kan du kontakte Vilde Handegard, stipendiat, tlf. 48 19 41 51, e-post: vilde.handegard@nih.no eller Prof. Truls Raastad, prosjektleder, tlf. 23 26 23 28, e-post: truls.raastad@nih.no

HVA SKJER MED OPPLYSNINGENE OM DEG?

Opplysningene som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med prosjektet. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert. Du har også rett til å få innsyn i sikkerhetstiltakene ved behandling av opplysningene.

Alle opplysningene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger gjennom en navneliste. Det er kun Prof. Truls Raastad (prosjektleder) og Vilde Handegard (stipendiat) som har tilgang til denne listen.

Opplysningene om deg vil bli anonymisert og slettet fem år etter prosjektslutt, eller når resultatene er publisert. Prosjektet er planlagt avsluttet 1. oktober 2024.

DELING AV DATA OG OVERFØRINGER TIL UTLANDET

Ved å delta i prosjektet, samtykker du også til at opplysninger om muskeltykkelse, -stivhet, -styrke, samt muskelvev kan overføres til utlandet som ledd i forskningssamarbeid og publisering. Prosjektleder vil sikre at dine opplysninger blir ivaretatt på en trygg måte.

Koden som knytter deg til dine personidentifiserbare opplysninger vil ikke bli utlevert. Muskel- og urinprøvene som tas av deg skal oppbevares i en forskningsbiobank tilknyttet prosjektet.

HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Biobanken heter EIMD2019 og er lokalisert på seksjon for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole. Ansvarlig for biobanken er prosjektleder Professor Truls Raastad.

Biobanken opphører ved prosjektslutt.

Muskelprøver som tas kan bli sendt til Professor Niels Ørtenblad, ved Institut for Idræt og Biomekanikk, Syddanske Universitet, Danmark for analyser. Dersom dette blir tilfelle, skal prøvene destrueres ved prosjektslutt eller når resultatene er publisert.

FORSIKRING

Alle deltagere er forsikret gjennom Norges idrettshøgskole, som statlig institusjon, er selvassurandør.

¹ Rabdomyolyse vil si ødelagte muskelfiber, med symptomer som muskelsmerter, muskelsvakhet og colafarget urin. Diagnosen stilles gjerne på grunnlag av kreatin kinase nivåer i blodet tilsvarende 10 ganger øvre grense av normalområde ("Rabdomyolysis," n.d.)

GODKJENNING

Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk har vurdert prosjektet, og har gitt forhåndsgodkjenning [31413 (08.10.2019)]

Etter ny personopplysningslov har behandlingsansvarlig Norges idrettshøgskole og prosjektleder Truls Raastad et selvstendig ansvar for å sikre at behandlingen av dine opplysninger har et lovlig grunnlag. På oppdrag fra Norges idrettshøgskole har NSD – Norsk senter for forskningsdata AS vurdert at behandlingen av personopplysninger i dette prosjektet er i samsvar med personvernregelverket

Du har rett til å klage på behandlingen av dine opplysninger til Datatilsynet.

KONTAKTOPPLYSNINGER

Dersom du har spørsmål til prosjektet kan du ta kontakt med:

Truls Raastad, prosjektleder
Tlf: 913 68 896
E-post: truls.raastad@nih.no

Vilde Handegard, stipendiat
Tlf: 481 94 151
E-post: vilde.handegard@nih.no

Personvernombud ved institusjonen er personvernombud@nih.no



JEG SAMTYKKER TIL Å DELTA I PROSJEKTET OG TIL AT MINE PERSONOPPLYSNINGER
OG MITT BIOLOGISKE MATERIALE BRUKES SLIK DET ER BESKREVET

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn med trykte bokstaver

Vedlegg I: Forsøksprotokoll

| | Dag 1 Mandag | | | | | | | Dag 2 Tirsdag | | Dag 3 Onsdag | | Dag 4 Torsdag | | Dag 5 Fredag | | |
|----------------------------|-----------------|------|---|-------|------|---|------|------------------|------|-----------------|------|------------------|------|-----------------|------|------|
| Blodprøve | ⇓ | | | | | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | |
| Urinprøve | ⇓ | | | | | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | |
| Styrketest | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | |
| El.stimulering | | | | | | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | |
| Sårhet/stølhet | ⇓ | | | ⇓ | | | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | ⇓ | | |
| Svelling | ⇓⇓ | | | ⇓⇓ | | | ⇓⇓ | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | |
| Muskelprøve | | | | | | | | | | | ⇓⇓ | | | | ⇓⇓ | |
| Ultralyd, muskelstivhet | ⇓⇓ | |  | ⇓⇓⇓⇓⇓ | |  | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | | ⇓⇓ | |
| Aktivitet | | | | | | Lunsj | | | | | | | | | | |
| Tentativ tid | 0830 | 0930 | 1015 | 1030 | 1100 | 1130 | 1230 | 1330 | 0930 | 1030 | 0930 | 1030 | 0930 | 1030 | 0930 | 1030 |
| Timer etter treningsøkt | | | | 0 | ½ | 1 | 2 | 3 | 23 | 24 | 47 | 48 | 71 | 72 | 95 | 96 |

Vedlegg II: Bilde av arr etter muskelprøve



Bildet viser arr etter tre muskelprøver i armbøyerne. Det er over 10 år siden muskelprøvene ble tatt.

